



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO**



PPGCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIA ANIMAL

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Deteção sorológica, molecular e diversidade genética de *Anaplasma* spp. em pequenos ruminantes da microrregião do Baixo Parnaíba, Maranhão

Orientadora: Profa. Dra. Alcina Vieira Carvalho Neta

Coorientadora: Larissa Sarmiento dos Santos

Mestranda: Ellainy Maria Conceição Silva

São Luís – MA

2021

ELLAINY MARIA CONCEIÇÃO SILVA

Detecção sorológica, molecular e diversidade genética de *Anaplasma* spp. em pequenos ruminantes da microrregião do Baixo Parnaíba, Maranhão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciência Animal como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Alcina Vieira Carvalho Neta

Coorientadora: Larissa Sarmiento dos Santos

Mestranda: Ellainy Maria Conceição Silva

São Luís – MA

2021

Silva, Ellainy Maria Conceição.

Detecção sorológica, molecular e diversidade genética de *Anaplasma* spp. em pequenos ruminantes da microrregião do Baixo Parnaíba, Maranhão. – São Luís, 2022.

55 f

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2022.

Orientadora: Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta
Coorientadora: Profa. Dra. Larissa Sarmiento dos Santos

1. Anaplasmosse. 2. Caprino - Maranhão. 3. Ovino - Maranhão. 4. Nordeste
I. Título.

CDU: 636.3.09:616.993.19(812.1)

Elaborado por Giselle Frazão Tavares - CRB 13/665

ELLAINY MARIA CONCEIÇÃO SILVA

Detecção sorológica, molecular e diversidade genética de *Anaplasma* spp. em pequenos ruminantes da microrregião do Baixo Parnaíba, Maranhão

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr.^a Alcina Vieira de Carvalho Neta Universidade
Estadual do Maranhão – Orientadora

Prof^ª. Dra. Larissa Sarmiento dos Santos
Universidade Estadual do Maranhão – Coorientadora

Prof^ª. Dra. Andrea Pereira da Costa
Universidade Estadual do Maranhão - Membro interno

Prof^ª. Dra. Rosangela Zacarias Machado
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP – Membro externo

À Kathia Maria Conceição Silva
(In memoriam)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, meu Senhor misericordioso, que me deu forças para chegar onde eu cheguei. Obrigada, Pai.

Ao meu pai, Francisco, por ser o meu pilar, me apoiar incondicionalmente e por estar ao meu lado o tempo, mesmo que as vezes silenciosamente. À minha mãe, Kathia, que agora reside ao lado de Deus, você é o meu exemplo e sempre será. És meu apoio e eu sei que mesmo de longe a senhora conforta o meu coração nos momentos mais difíceis. Eu amo vocês!

À minha irmã querida, que assumiu um papel maternal após a nossa perda. Muito obrigada pela paciência e por entender as minhas ausências, eu sei que não é fácil. Saiba que eu não poderia ter recebido “irmãe” melhor. Eu te amo!

À minha orientadora mais do que querida, Professora Alcina, hoje posso dizer que traçamos uma história que vai além da profissional, baseada no respeito e também na amizade. Obrigada por oportunizar meu crescimento profissional, me fazer sair da zona de conforto, pelos puxões de orelha (bem necessários) e por acreditar no meu potencial! Eu sou e sempre serei profundamente grata pela sua participação na minha vida!

À minha co-orientadora querida Larissa Sarmiento, a quem não canso de agradecer sempre por todo apoio, por acreditar e me ajudar de todas as formas possíveis. Você tem sempre uma palavra de conforto e tranquilização e nos mostra que tudo na vida tem solução! Obrigada por estar ao meu lado todo esse tempo!

À professora Rosangela Machado e ao professor Marcos André, que abriram as portas do Laboratório de Imunoparasitologia e ofereceram suporte para a execução dessa pesquisa, e nos deram direcionamentos importantíssimos para a construção do trabalho que temos hoje. Muito obrigada.

À todos os funcionários da Imunodot Diagnósticos, principalmente à Márcia Jusi por toda a paciência, a ajuda e os conhecimentos, muito obrigada por nos receberem no seu ambiente de trabalho de portas abertas!

Às amigas queridas da UNESP, Vic e Jaque, quando fui para o laboratório nunca imaginei que encontraria pessoas tão maravilhosas, “gente como a gente” e que nos déssemos tão bem que pareceu que já nos conhecíamos a anos! Vic, eu agradeço especialmente a você, por tudo que você muito humanamente nos ensinou no período de estivemos com você, obrigada pela paciência e se nós conseguimos realizar esses experimentos foi por sua ajuda

inestimável! Deus fez de você um ser humano incrível! Muito obrigada, você mora no meu coração!

Ao Renan e Amanda, também da UNESP, que nos ajudaram a realizar as análises desse trabalho. A ajuda de vocês foi essencial! Muito obrigada.

À minha irmã de alma, Ingrid, agradeço por você estar ao meu lado em todos os momentos mais importantes da minha vida, os bons e os ruins. Agradeço a Deus pela sua existência e mais ainda por ter te colocado no meu caminho. Saber que posso contar com o seu apoio e amor me ajudou e ajuda a enfrentar todas as provações da vida até agora. Obrigada por me oferecer a sua amizade e irmandade. Eu te amo!

Agradeço também a toda equipe do laboratório de Patologia Molecular, especialmente a amiga querida, Natalia Lustosa, obrigada por nos ajudar na bancada diversas vezes, por se disponibilizar sempre de boa vontade! Muito obrigada!

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (PPGCA) e a Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), pelo apoio estrutural e financeiro que permitiram a realização desta pesquisa.

RESUMO

A anaplasmoze, causada por bactérias do gênero *Anaplasma*, é importante enfermidade transmitida por carrapatos que geram prejuízos às criações de animais de produção em muitos países. Os caprinos e ovinos são suscetíveis a infecções por bactérias desse gênero e tem sido amplamente relatado em diferentes regiões do mundo. Apesar da importância deste patógeno para a sanidade animal, poucas pesquisas tem sido realizadas a fim de detectar a ocorrência desse patógeno em pequenos ruminantes, no Brasil. Desse modo, esta pesquisa teve como objetivo detectar e determinar a diversidade genética de *Anaplasma* spp. em pequenos ruminantes e carrapatos da região do Baixo Parnaíba Maranhense. Para isso, foram coletadas amostras de sangue de 161 animais, sendo 70 ovinos e 91 caprinos, oriundos de 4 municípios da região do Baixo Parnaíba, todos clinicamente saudáveis no momento da coleta. Foram confeccionados esfregaços sanguíneos, corados com Giemsa, para a observação de inclusões de *Anaplasma* spp. pela microscopia de luz. O soro dos ovinos e caprinos foram submetidos ao método de diagnóstico sorológico, por meio do iELISA, utilizando proteína de superfície de membrana recombinante (MSP5) e o sangue, ao diagnóstico molecular para a detecção de *A. marginale* por meio da qPCR e cPCR. As amostras positivas foram então sequenciadas e em seguida submetidas a análise da diversidade genética pelo programa RepeatAnalyzer. Com isso, não foi possível observar inclusões sugestivas de *Anaplasma* spp. em nenhum dos esfregaços sanguíneos analisados. O levantamento sorológico detectou a presença de anticorpos anti-*A. marginale* em 18 animais (11,1%), sendo 2,8% ovinos e 17,5% caprinos. Foi possível identificar o DNA de *A. marginale* em 2 caprinos (1,24%) por meio da qPCR. Essas amostras positivas foram então submetidas a snPCR, baseada no gene *msp1α* e ambas foram positivas. A análise do sequenciamento das amostras demonstrou porcentagens de identidade variando de 90.97% a 98.79% com *A. marginale*, e com relação a diversidade genética, foram caracterizadas duas estirpes distintas $\alpha\beta$ e $\alpha\beta\Gamma;\gamma;\Gamma;\gamma;\Gamma;\gamma;\Gamma;\gamma$, cada uma em um animal diferente, nunca relatadas em pequenos ruminantes. Ambas estirpes foram pertencentes ao genótipo H. Foi demonstrado alta diversidade genética das estirpes entre si e na região estudada. Com base no exposto, foi possível confirmar a circulação de *A. marginale* em ovinos e caprinos no Estado do Maranhão, utilizando as abordagens sorológica e molecular.

Palavras-chave: Anaplasmoze, caprino, ovinos, nordeste

ABSTRACT

Anaplasmosis, caused by bacteria of the genus *Anaplasma*, is an important disease transmitted by ticks that cause damage to livestock farms in many countries. Goats and sheep are susceptible to infections by bacteria of this genus and have been widely reported in different regions of the world. Despite the importance of this pathogen for animal health, little research has been carried out in order to detect the occurrence of this pathogen in small ruminants in Brazil. Thus, this research aimed to detect and determine the genetic diversity of *Anaplasma* spp. in small ruminants from the Baixo Parnaíba Maranhense region. For this, blood samples were collected from 161 animals, 70 sheep and 91 goats, from 4 municipalities in the Baixo Parnaíba region, all clinically healthy at the time of collection. Blood smears, stained with Giemsa, were made to observe inclusions of *Anaplasma* spp. by light microscopy. The serum of sheep and goats was subjected to serological diagnostic methods, using iELISA, recombinant membrane surface protein (MSP5) and blood, to the molecular diagnosis for the detection of *A. marginale* using qPCR and snPCR. Positive samples were then sequenced and then subjected to analysis of genetic diversity by RepeatAnalyzer program. Thus, it was not possible to observe inclusions suggestive of *Anaplasma* spp. in any of the blood smears analyzed. The serological survey detected the presence of anti-*A. marginale* antibodies in 18 animals (11.1%), with 2.8% goats and 17.5% sheep. It was possible to identify the DNA of *A. marginale* in 2 sheep (1.24%) using qPCR. These positive samples were then subjected to snPCR, based on the *msslα* gene, and both were positive. The sequencing analysis of the samples showed identity percentages ranging from 90.97% to 98.79% with *A. marginale*, and with respect to genetic diversity, two distinct strains α β and α β Γ ; γ ; Γ ; γ ; Γ ; γ , were characterized, each in a different animal, never reported in small ruminants, both belonging to the H genotype and with respect to genetic diversity, two distinct strains were characterized, each in a different animal, never reported in small ruminants. Both strains belonging to the H genotype. High genetic diversity of the strains was demonstrated among themselves and in the studied region. Based on the above, it was possible to confirm the circulation of *A. marginale* in sheep and goats in the State of Maranhão, using the serological and molecular approaches.

Keywords: Anaplasmosis; goat; sheeps; northeast

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1. Lista de iniciadores utilizados para a PCR convencional e em tempo real utilizados nesta pesquisa	29
Tabela 2. Frequência de infecção por <i>A. marginale</i> de acordo com a espécie e gênero, por meio do ELISA (rMSP5).	32
Tabela 3. Distribuição dos animais soropositivos na pesquisa de anticorpos IgG anti- <i>A. marginale</i> utilizando a rMSP5 e a dados da quantificação da Densidade Óptica das amostras.	33
Tabela 4. Frequência de positividade para <i>Anaplasma</i> sp. nos testes moleculares de ovinos, caprinos e carrapatos.	34
Tabela 5. Caracterização dos genótipos e estirpes das amostras positivas para o gene <i>msp1α</i> de <i>A. marginale</i> , com número do animal, estimativa da riquetsemia por qPCR absoluta e localização.	35
Figura 1. Mapa da microrregião do Baixo Parnaíba, Maranhão.	26

LISTA DE ABREVIATURAS

cELISA	<i>Competive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos Trifosfatos
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
IBGE	Brasileiro de Geografia e Estatística
iELISA	<i>Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Ig	Imunoglobulina
IMESC	Instituto Maranhense de Estudos Socioeconômicos e Cartográficos
mtDNA	DNA mitocondrial
pb	Pares de Base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogênico
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
RIFI	Reação de Imunofluorescência Rndireta
rRNA	RNA ribossômico
snPCR	Semi-Nested PCR
TBF	<i>Tick-Bourne-Fever</i>
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
MSP	<i>Major Surface Protein</i>
FC	Fixação de Complemento
rMSP	<i>Recombinant Major Surface Protein</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Caracterização da caprino-ovinocultura no Maranhão	15
2.2 Anaplasrose: Agentes etiológicos, Ciclo Biológico e Transmissão	16
2.2.1 Vetores	18
2.3 Anaplasrose em pequenos ruminantes	19
2.3.1 Diagnóstico	20
2.3.2 Prevenção, controle e tratamento	22
2.4 Epidemiologia da anaplasrose em pequenos ruminantes ao redor do mundo	23
2.5 Diversidade Genética de <i>Anaplasma</i> spp.	24
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Considerações éticas	27
4.2 Local de Estudo	27
4.3 Animais e Coleta de amostras	28
4.4 Esfregaços sanguíneos	28
4.5 Pesquisa de anticorpos anti-<i>Anaplasma marginale</i> por meio do ELISA indireto (iELISA)	28
4.6 Extração de DNA	29
4.7 Análises moleculares do DNA extraído a partir de amostras de sangue	29
4.7.1 Detecção do gene endógeno Citocromo <i>b</i> (<i>Cyt b</i>)	29
4.7.2 qPCR para <i>Anaplasma marginale</i> baseada no gene <i>msp1β</i>	30
4.7.3 snPCR para detecção de <i>A. marginale</i> baseada no gene <i>msp1α</i>	31
4.7.4 Purificação e sequenciamentos dos produtos amplificados	31

4.7.5 Análise das sequências consenso baseadas no gene <i>msp1α</i>	31
4.7.6 Classificação de genótipos de <i>A. marginale</i> e identificação da diversidade genética	32
4.8 Análise Estatística	32
5 RESULTADOS	33
5.1 Análise dos esfregaços sanguíneos	33
5.2 Anticorpos IgG contra <i>A. marginale</i> (rMSP5)	33
5.3 Ensaios de qPCR para <i>A. marginale</i> baseados no gene <i>msp1β</i> e semi-nested PCR baseadas no gene <i>msp1α</i> em ovinos e caprinos	34
5.4 Análise de diversidade genética de <i>A. marginale</i> baseada no gene <i>msp1α</i>	35
6 DISCUSSÃO	36
7 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

A anaplasmose é causada por bactérias gram-negativas pertencentes ao gênero *Anaplasma*, que se replicam no interior de células sanguíneas de animais e seres humanos (DUMLER et al., 2001). As espécies que são comumente associadas aos pequenos ruminantes são *Anaplasma ovis* e *Anaplasma phagocytophilum* (HORNOK et al., 2007; YANG et al., 2015; BILGIC et al., 2017), sendo que esta última causa uma infecção considerada uma zoonose (DUMLER et al., 2007). A infecção por *A. ovis* geralmente apresenta desenvolvimento subclínico, podendo se tornar mais severa em animais em situações de estresse ou debilidade, além de predispor a infecções secundárias (KOCAN et al., 2004). A infecção por *A. phagocytophilum*, conhecida como Febre das Pastagens, é severa e gera grandes prejuízos econômicos para as criações de ruminantes (STUEN, GRANQUIST e SILAGHI, 2013).

A abundância e diversidade de espécies de carrapatos no Brasil pode representar riscos potenciais para a saúde pública animal e humana, devido a esses artrópodes atuarem na transmissão de diversos patógenos. Os carrapatos da família *Ixodidae*, em especial a espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, são os principais espécimes associados à transmissão de anaplasmose ao gado bovino e também são amplamente encontrados parasitando ovinos e caprinos (SUASSUNABEZERRA et al., 2010; GARCIA et al., 2014; SOUZA et al., 2018).

Em diversas regiões endêmicas, a anaplasmose leva a perdas econômicas significativas com diminuição da produção de carne e leite devido à alta bacteremia e mortalidade (CARACAPPA, 1999; GRØVA et al., 2011). Os animais que se recuperaram da infecção aguda ou apresentem infecção subclínica possuem papel epidemiológico importante, servindo como reservatórios nos rebanhos por infectar continuamente os vetores (ZAUGG et al., 1986)

O Brasil possui o maior rebanho de ovinos e caprinos do continente americano, sendo o maior produtor de carne ovina e o segundo de carne caprina e, quanto ao consumo, é o segundo maior consumidor de ambas as carnes (EMBRAPA, 2017). Nesse cenário, a região nordeste apresenta destaque, detendo a maior parte do quantitativo de ambas as espécies em todo território nacional, e vem contribuindo positivamente para o crescimento do setor. Do rebanho da região nordestina, o estado do Maranhão detém 3,71% do efetivo caprino e 1,54% do efetivo ovino brasileiro (IBGE, 2019).

Até o presente momento, pouca informação a respeito de espécies de *Anaplasma* em ovinos e caprinos tem sido publicada no Brasil (ARAÚJO et al. 2008; CABRAL et al.,

2009; SILVA et al., 2018; BARBOSA et al., 2020). Entretanto, é importante considerar que esse patógeno ocorre no país, associado principalmente aos bovinos; que os carrapatos, principais vetores desses agentes, estão amplamente distribuídos e atuam ativamente na transmissão nos rebanhos, e, ainda, há proximidade das criações de ovinos e caprinos juntamente a bovinos ou outros animais susceptíveis, o que pode tornar esse ambiente propício para ocorrência desses agentes em diferentes espécies animais. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de *Anaplasma* spp. em ovinos e caprinos da microrregião do baixo Parnaíba, Maranhão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização da caprino-ovinocultura no Maranhão

A caprino-ovinocultura é uma atividade pecuária fortemente desenvolvida no Brasil, apresentando marcante crescimento produtivo em todas as regiões, com destaque para a região Nordeste, que detém cerca de 74,5% dos estabelecimentos agropecuários voltados para essa atividade, além de conter os maiores quantitativos de caprinos e ovinos (10.687,777 milhões e 13.512,739 milhões, respectivamente) registrados no país (IBGE, 2019). Com isso, é evidente que há uma concentração de rebanhos desses animais, fato que pode ser associado a esta atividade constituir-se como uma importante contribuição para a atividade econômica da agricultura familiar, contribuindo para a fixação do homem, além de fonte de renda para pequenos produtores (BATISTA et al., 2015).

De modo semelhante, a caprino-ovinocultura no Estado do Maranhão tem apresentado crescimento significativo nas últimas duas décadas, totalizando, atualmente, um rebanho caprino com 359.757 cabeças e ovino com cerca de 292.217 cabeças, colocando o estado na 7ª e 12ª posição, respectivamente, do *ranking* nacional, sendo a cadeia produtiva voltada para a produção de carne (Pesquisa Pecuária Municipal, 2018).

Mesmo esse segmento demonstrando grande potencial de crescimento e esteja em expansão no Estado, com dados numericamente expressivos, de modo geral, a exploração dessa atividade no Maranhão segue o mesmo padrão observado em toda região nordestina, com grande parte das criações desenvolvidas sob o sistema de produção extensivo, sendo caracterizado pelo uso quase que exclusivo de pastagens nativas, reduzido emprego de técnicas de manejo; que incluem os aspectos reprodutivos, sanitários e nutricionais e, por conseguinte, com baixos resultados zootécnicos, além de ser voltada sobretudo, para subsistência familiar (GONÇALVES et al., 2008; ALVES et al., 2017).

Um estudo realizado por Teixeira et al. (2015), avaliando o perfil zoonótico dos rebanhos de caprinos e ovinos nas mesorregiões Leste, Norte e Oeste maranhenses, demonstrou que a composição racial do rebanho é predominantemente sem raça definida ou mestiços oriundos de cruzamentos das raças Anglo Nubiana, Boer, Saanen, Alpina e Savana, para os caprinos e as raças Santa Inês, Somalis, Dorper e Texel, para os ovinos, que eram usados como base para os cruzamentos. Outra característica apontada por Silva et al. (2016), é que em muitas propriedades, observa-se um sistema de produção associativo, composto pela criação de caprinos, ovinos e/ou outra criação e atividade de roça, diversidade muito característica de pequenas e médias propriedades rurais, visando melhor exploração de recursos e fonte de renda.

Com relação à sanidade, esta constitui um dos principais entraves para o desenvolvimento da caprino-ovinocultura. De acordo com Oliveira e Albuquerque (2008), as principais enfermidades associadas às perdas produtivas estão as ectoparasitoses, causadas por ácaros, carrapatos e insetos. Silva et al. (2016), em seu trabalho avaliando condições zootécnicas dos rebanhos de caprinos e ovinos em área de assentamento no Estado do Maranhão, observaram a ocorrência de diarreia, linfadenite caseosa e miíases e alta infestação por carrapatos nos rebanhos. Esses autores apontam ainda que a falta de manejo sanitário é uma situação recorrente, e incluem a ausência de práticas elementares como limpeza de instalações, queima ou enterro de carcaças, vacinação, vermifugação, etc.

Notavelmente, situação semelhante ocorre em outras regiões do Estado e a ausência de controle sanitário básico pode propiciar um ambiente favorável para a proliferação de enfermidades, com destaque àquelas que são transmitidas por carrapatos, visto que esses artrópodes ocorrem amplamente no estado, provocando infestações nos rebanhos de ovinos e caprinos, que são hospedeiros susceptíveis a diversas enfermidades, dentre as quais destaca-se a anaplasmose que apresenta importância médica-veterinária e para a Saúde Pública.

2.2 Anaplasmose: Agentes etiológicos, Ciclo Biológico e Transmissão

As bactérias incluídas no gênero *Anaplasma*, são microrganismos intracelulares obrigatórios e gram-negativos, classificadas como pertencentes à classe Alpha-proteobacteria, ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae e gênero *Anaplasma* (DUMLER et al., 2001). Após a reorganização da ordem Rickettsiales por Dumler et al. (2001), foram incluídos no gênero seis espécies, sendo elas: *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, *Anaplasma bovis*, amplamente associadas a infecções em ruminantes; *A. phagocytophilum*, que tem sido descrita em infecções em seres humanos, causando a Anaplasmose Granulocítica Humana (HGA)

(AGUERO-ROSENFELD et al., 2002; LEE et al., 2018; NELDER et al., 2019) e também em ruminantes (Hoar et al., 2008; Silagui et al., 2011; Shabana et al., 2018); *Anaplasma platys*, que tem sido associada a infecções em cães e ruminantes (ZOBBA et al., 2014; OKAL et al., 2020; SILI et al., 2021); *A. ovis*, descrita em ovinos, caprinos e ruminantes selvagens (AKTAS e ÖZÜBEK, 2018; CABEZAS-CRUZ et al., 2019), e um único relato de uma variante dessa espécie em seres humanos (CHOCHLAKIS et al., 2010) e as descritas mais recentemente *Anaplasma odocoilei*, identificados em veados de cauda branca, nos Estados Unidos e *Anaplasma. capra*, um patógeno zoonótico identificado em cabras na China (TATE et al., 2013; LI et al. 2015).

No que diz respeito a morfologia e caracterização desses microrganismos, as bactérias desse gênero são cocos pleomórficos com tamanho variando de 0.4 a 1.3 μm , podendo chegar a 2 μm . A membrana externa da bactéria é frequentemente enrugada, o que cria um espaço periplasmático irregular e não há camada de cápsula. Essas bactérias se replicam em vacúolos ligados à membrana (vacúolos parasitóforos), dentro do citoplasma das células hospedeiras eucarióticas. Por meio da microscopia pode-se observar esses microrganismos agrupados no interior desses vacúolos intracitoplasmáticos em estruturas chamadas mórulas. (POPOV et al. 1998; RIKIHISA et al. 2010).

O ciclo biológico envolve a participação de hospedeiros vertebrados, que atuam como reservatórios devido à infecção persistente nesses animais; e invertebrados, que atuam como vetores, nos quais a transmissão desses agentes pode ocorrer de modo interestadial, ou seja, quando há infecção em um estágio e transmissão para o estágio seguinte ou intraestadial quando ocorre no mesmo estágio, não sendo relatada a transmissão transovariana (STICH et al., 1989; RIKIHISA, 1991; KOCAN et al., 2010).

A infecção ocorre quando o carrapato não infectado efetua o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, ingerindo eritrócitos parasitados pela bactéria. No interior do vetor, a bactéria se instala nas células intestinais, onde irá se desenvolver e, em seguida, migrar para outros tecidos, como a glândula salivar. Na glândula salivar do carrapato, por sua vez, a bactéria forma colônias que podem conter centenas de organismos, que se reproduzem por divisão binária. A primeira forma da bactéria dentro destas colônias é chamada de corpúsculos reticulados (forma vegetativa). Em seguida a forma reticulada se transforma nos corpúsculos densos, que é a forma infectante e pode sobreviver fora das células do hospedeiro por um certo período de tempo. Uma vez infectado, o carrapato pode transmitir as bactérias aos mamíferos

durante o próximo repasto (KOCAN et al., 2010; PRUNEAU et al., 2014; SILAGHI et al., 2017).

Uma vez no sangue do animal, as bactérias penetram no eritrócito, invaginando a membrana celular de modo a formar um vacúolo, dividindo-se e formando um corpúsculo de inclusão contendo até oito corpúsculos iniciais. Após a infecção, o número de eritrócitos infectados aumenta geometricamente. Eritrócitos infectados são posteriormente fagocitados pelas células do sistema fagócito mononuclear (SFM), resultando no desenvolvimento de anemia leve a grave e icterícia, sem hemoglobinemias ou hemoglobinúrias. Os sinais clínicos incluem febre, perda de peso, aborto, letargia e, muitas vezes, óbito (RISTIC, 1977). Dependendo da espécie de *Anaplasma*, há tropismo para tipos específicos de células, geralmente células de origem hematopoiética; *A. marginale*, *A. centrale* e *A. ovis* infectam eritrócitos; *A. platys* infecta plaquetas e neutrófilos; *A. odocoilei* infecta plaquetas; *A. phagocytophilum* infecta granulócitos; *A. bovis*, infecta monócitos e macrófagos (DUMLER, 2001; RAR e GOLOVLJOVA, 2011).

2.2.1 Vetores

A literatura científica aponta que os carrapatos são os principais vetores biológicos desses agentes, e pelo menos 20 espécies destes ectoparasitas atuam como vetores em diferentes partes do mundo (KOCAN et al., 2010), particularmente os carrapatos dos gêneros *Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Amblyomma*. De acordo com Kocan et al. (2010) e Silaghi et al. (2017), em áreas temperadas os carrapatos do gênero *Ixodes* e *Dermacentor* são os mais associados a transmissão de *Anaplasma*, enquanto que em regiões tropicais, as espécies do gênero *Rhipicephalus*, são os principais vetores.

No Brasil, os carrapatos *R. (Boophilus) microplus*, estão associados a transmissão de *Anaplasma* e têm sido demonstrado parasitando bovinos (Dos SANTOS et al., 2019; MARTINS et al., 2020) e pequenos ruminantes (SUASSUNABEZERRA et al., 2010; GARCIA et al., 2014; SOUZA et al., 2018). Esses carrapatos possuem ciclo monóxeno e estão presentes em todo o Brasil, onde a sua maior ou menor ocorrência está associada diretamente a fatores ambientais, como temperatura e precipitação (ESTRADA-PEÑA et al. 2005)

Nessas espécies monoxênicas, em que os estágios (larvas, ninfas e adultos) dificilmente mudam de hospedeiros, a forma de transmissão intrastadial é muito importante, especialmente para os carrapatos machos, que são considerados bio ampliadores eficientes da infecção de *Anaplasma* spp., pois, devido ao seu comportamento intermitente eles se tornam

persistentemente infectados com o patógeno e podem transmiti-lo repetidamente quando se transferem entre bovinos. Os carrapatos machos, então, servem como hospedeiros reservatórios dessas riquetsias, assim como os animais infectado persistentemente (KESSLER 2001; SCOLES et al., 2005).

Com relação à transmissão mecânica de *Anaplasma* spp., esta pode ser efetuada pela picada de moscas hematófagas, principalmente dos gêneros *Tabanus* e *Stomoxys*. Embora não se saiba a contribuição real desta forma de transmissão do agente no Brasil, estudos realizados por Scoles et al. (2005), nos Estados Unidos, forneceram evidências de que certas cepas circulantes de *Anaplasma* são efetivamente transmitidas por moscas hematófagas e sugerem que esta pode ser a principal via de disseminação da bactéria em locais onde as populações de carrapatos são limitadas. Adicionalmente, são relatados ainda a transmissão por meio de fômites contaminados com sangue, incluindo agulhas, serras de descorna, pinças para nariz, instrumentos de tatuagem, dispositivos de marcação de orelha e instrumentos de castração (LEIBY e GILL 2004; AUBRY e GEALE 2011; RENNEKER et al. 2013)

2.3 Anaplasmosose em pequenos ruminantes

A anaplasmosose em ovinos e caprinos é causada principalmente pelas espécies *A. ovis*; *A. phagocytophylum*, que causa uma enfermidade conhecida como “febre do carrapato” (TBF do inglês *tick-bourne-fever*), e também há relatos a ocorrência de *A. marginale* nesses animais (WOLDEHIWET, 2010; YOUSEFI et al., 2017; CABEZAS-CRUZ et al., 2019). Os sinais clínicos são caracterizados por febre ($> 41^{\circ}\text{C}$), fraqueza, anorexia, diminuição da produção de leite, aborto, e ocasionalmente pode levar ao óbito (STUEN et al., 2011). Em infecções causadas por *A. marginale*, além dos sintomas supracitados, um quadro anêmico também pode ser observado, resultante da destruição de eritrócitos e em infecções agudas causadas por *A. phagocytophylum*, há predisposição dos animais a infecções bacterianas secundárias, especialmente em ovinos, devido ao efeito imunossupressor desse agente (WOLDEHIWET, 2006; STUEN et al., 2013).

Embora os sinais clínicos em animais na fase aguda da infecção sejam marcantes, é necessário destacar que, na maioria dos casos, as infecções em pequenos ruminantes, sobretudo em caprinos, comumente têm um curso subclínico ou em alguns casos, os animais que conseguem se recuperar, tornam-se uma fonte contínua para a transmissão biológica ou mecânica do patógeno (WOLDEHIWET, 2006; 2010).

2.3.1 Diagnóstico

O diagnóstico da anaplasmose pode ser baseado no exame microscópico de esfregaços de sangue corados com Giemsa, procedimentos sorológicos e diagnósticos moleculares (SHABANA et al., 2018).

O diagnóstico microscópico consiste na visualização de formas compatíveis com espécies de *Anaplasma* em esfregaços sanguíneos, por meio de microscópio de luz, no qual observa-se normalmente as mórulas da bactéria nas células do hospedeiro coradas em azul escuro a roxo com ampliação de 400 ou 1000x. As colorações comumente utilizadas nesta técnica consistem em Giemsa, Wright Giemsa ou coloração Diff-Quick, por facilitarem a demonstração desses organismos (POTGIETER E STOLTSZ, 1994).

A pesquisa de *Anaplasma* em esfregaços sanguíneos, embora seja uma técnica menos sensível, especialmente naqueles animais portadores de infecções persistentes (que caracteristicamente apresentam ciclos de baixos níveis de ricketsemia), ainda é tradicionalmente utilizada (SHABANA et al., 2018). Esfregaços de sangue periférico preparados diretamente após punção digital ou punção venosa superficial ou de sangue venoso coletado em anticoagulante, obtido durante a fase aguda inicial dos sintomas e antes do início da terapia antimicrobiana eficaz, são considerados os melhores para a visualização de bactérias em animais e humanos (EDDLESTONE et al. 2007).

Como as diferentes espécies de *Anaplasma* podem ter tropismo por grupos celulares específicos, Eddlestone et al. (2007) apontam ainda que, para espécies leucocitotrópicas (*A. bovis* e *A. phagocytophilum*), os esfregaços de camada leucocitária são preferidos a preparações regulares de sangue total, pois devido à leucopenia, poucos leucócitos infectados podem estar presentes. A camada leucocitária também é considerada útil para a detecção de mórulas de *A. platys* nas plaquetas. É apontada ainda a pesquisa no exame *post-mortem* que pode ser realizada em impressões ou esfregaços de tecido (baço, fígado, rim, coração, pulmão e, em particular, vasos sanguíneos) na tentativa de visualizar *Anaplasma* spp. (KOCAN et al. 2010).

Diferentes técnicas sorológicas têm sido utilizadas para a detecção de anticorpos específicos contra *Anaplasma*, dentre as quais pode-se citar a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e o teste de Fixação de Complemento (FC) (GOFF et al., 1990; BRADWAY et al., 2001; OZLEM et al., 2011; STUEN et al., 2011).

O teste ELISA tem sido utilizado para o diagnóstico de infecções causadas por *Anaplasma* sp. em ruminantes domésticos como bovinos, ovinos e caprinos e ruminantes selvagens (DREHER et al., 2005; SHARMA et al., 2015; WANG et al., 2017; SHABANA, et al., 2018). Com o objetivo de melhorar o diagnóstico da anaplasmoze, pesquisas pioneiras foram desenvolvidas com foco na identificação e caracterização de antígenos de membrana das bactérias desse gênero, especialmente *A. marginale*, devido à sua grande importância para a pecuária bovina. Seis proteínas de superfície principais (MSPs) foram inicialmente descritas: MSP1 α , MSP1 β , MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5 (PALMER et al. 1986, OBERLE et al. 1988, VISSER et al. 1992). Dentre estas, a imunodominante MSP5 com 19 kDa, tem sido a mais amplamente utilizada nos testes sorológicos (STRIK et al. 2007; RAMOS et al., 2008; AUBRY e GEALE, 2011; RAMOS et al., 2019).

Com relação às diferentes modalidades do ELISA, o ELISA competitivo (cELISA) (VMRD Inc., Pullman, WA, USA), baseada no anticorpo monoclonal ANAF16C1 que reconhece a proteína de superfície principal MSP5, apresenta a capacidade de reconhecer anticorpos contra *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis* e *A. phagocytophilum* (VISSER et al., 1992; DREHER et al., 2005). De fato, a reação cruzada com diferentes espécies de *Anaplasma* já foi demonstrada utilizando esse teste (MUNODZANA et al., 1998), uma vez que a MSP5 é altamente conservada entre cepas e espécies de *Anaplasma*. Por esse motivo, apesar da grande capacidade de diagnóstico desta técnica, podendo a sensibilidade chegar 95% e especificidade de 98% em áreas não endêmicas o seu emprego em estudos epidemiológicos em áreas em que co-infecções ocorrem, deve ser cuidadoso devido a possibilidade de ocorrência de infecções mistas (DE LA FUENTE et al., 2004; LIN et al., 2004).

Visando aumentar a especificidade e sensibilidade desta técnica, Morzaria et al. (1999), desenvolveram uma técnica de ELISA baseado em uma MSP5 recombinante (rMSP5), para a detecção de anticorpos anti- *A. marginale*. Um estudo realizado por Strik et al. (2007), buscou avaliar a ocorrência de reações cruzadas em ensaios de ELISA utilizando a MSP5 e rMSP5 em infecções por diferentes espécies de *Anaplasma* e utilizando as modalidades do cELISA e iELISA. Esses autores demonstraram que o cELISA utilizando rMSP5 de *A. marginale* parece distinguir infecções por *A. marginale* e *A. phagocytophilum*, indicando que o epítipo reconhecido pelo anticorpo monoclonal usado neste ensaio não está presente em *A. phagocytophilum*.

As ferramentas de diagnóstico molecular são cada vez mais utilizadas por apresentarem sensibilidade e especificidade elevadas, além de especificarem as espécies de *Anaplasma* que

podem estar ocorrendo nos animais (SHABANA et al., 2018; HAMZAH et al., 2019). Dentre estas ferramentas, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas modalidades têm auxiliado no esclarecimento da epidemiologia molecular de diferentes hemoparasitas, como as bactérias do gênero *Anaplasma*, e também permitiram, nas últimas décadas, a organização da família Anaplasmataceae (DUMLER, 2001), e a descoberta da grande diversidade genética dessas riquetsias (DE LA FUENTE et al., 2002; 2003; HUHN et al., 2014; QIU et al., 2016; IWERIEBOR et al., 2017; PENG et al., 2018; BARBOSA et al., 2020).

Entre os genes direcionados para o diagnóstico de *Anaplasma* spp. tem-se utilizado o *16S rRNA* (rrs) da bactéria, a proteína de choque térmico (*groEL*), citrato sintase (*gltA*) e as proteínas de superfície principais : *msp1*, *msp2*, *msp4* e *msp5* (de LA FUENTE et al., 2007; TORINA et al., 2012; ATIF, 2015). Dentre estas, destacam-se as MSPs, que são amplamente utilizadas nos ensaios de PCR. Seis MSPs foram descritas em *A. marginale* infectando eritrócitos de bovinos e cultura de células (KOCAN et al., 2000). Três delas, a *msp1 α* , *msp4* e *msp5*, são codificados por um único gene e não variam sua expressão durante a multiplicação da bactéria, enquanto outras três; *msp1 β* , *msp2* e *msp3*, são de famílias multigênicas e podem variar antigenicamente devido à combinação de genes que é expressa (KOCAN et al., 2003)

Vários métodos de diagnóstico molecular com altos níveis de sensibilidade e especificidade foram desenvolvidos, como *blotting* de linha reversa, a PCR convencional (cPCR), semi-nested e nested PCR e PCR em tempo real (qPCR). Esta última técnica apresenta algumas vantagens, como rapidez na obtenção dos resultados, quantificação do nível de infecção e menor probabilidade de contaminação (FRENCH et al., 1998; MOLAD et al., 2006; DECARO et al., 2008)

Outra vantagem da PCR em relação ao diagnóstico da anaplasmosose é a possibilidade de utilizar diferentes materiais biológicos para a detecção, tais como amostras de sangue, baço (especialmente em animais portadores de infecções persistentes, sendo este órgão um local secundário de replicação do microrganismo), e outros órgãos como fígado, pulmão, linfonodos, medula óssea e biópsias de pele (EDDLESTONE et al. 2007, GAUNT et al. 2010).

2.3.2 Prevenção, controle e tratamento

De maneira geral, as medidas de prevenção, controle e tratamento empregadas para a anaplasmosose bovinas, podem também serem utilizados em caprinos e ovinos. Essas medidas podem variar de acordo com a localização geográfica e do status epidemiológico da doença (KOCAN et al., 2000).

As medidas de controle e prevenção incluem a manutenção de rebanhos livres de *Anaplasma* por meio de importação e controle de movimentação, teste e eliminação de gado transportador; pelo controle de vetores, que deve ser realizado de forma cautelosa, principalmente ao risco de populações de carrapatos resistentes e a presença de resíduos acaricidas na carne e no leite; prevenção da transmissão iatrogênica; administração de antibióticos; e pré-imunização com vacinas vivas atenuadas e imunização com vacinas mortas (AUBRY e GAELE, 2010).

2.4 Epidemiologia da anaplasmosse em pequenos ruminantes ao redor do mundo

A infecção por bactérias do gênero *Anaplasma* em pequenos ruminantes é amplamente registrada em diversos continentes, sendo considerada endêmica em zonas tropicais e subtropicais (KHAN et al., 2019).

Em países alguns da Europa, foram descritos trabalhos recentes nos quais observou-se um percentual significativo de infecção, principalmente em ovinos, como descrito por Dahman et al. (2017), na França, onde esses autores observaram cerca de 59,05% de ovinos positivos para *A. ovis* em seu estudo, assim como Lacasta et al., (2020), que descreveram um surto em cordeiros, na Espanha, associado à ocorrência de *A. ovis*, com 86,04% de animais positivos utilizando a qPCR. No continente asiático pesquisas têm demonstrado que os pequenos ruminantes domésticos são comumente infectados por *A. ovis* e *A. phagocitophylum* (YANG et al., 2016; SHABANA et al., 2018; HAMZAH et al., 2019). Assim como pesquisas na América do Norte tem demonstrado infecções por ambas as espécies em ovinos e caprinos (MASSUNG et al., 2006; SCOLES et al., 2008; THOMAS et al., 2012).

Na América do Sul, incluindo o Brasil, as pesquisas acerca da ocorrência de *Anaplasma* spp. em pequenos ruminantes são pouco relatadas, mesmo a anaplasmosse bovina sendo endêmica no País. Até o presente momento, de acordo com o encontrado na literatura científica, já existem evidências sorológicas e moleculares da ocorrência desses microrganismos na região Nordeste, como reportado por Cabral et al. (2009), que realizaram um levantamento sorológico em ovinos no Estado do Alagoas e encontraram cerca de 8,9% de animais soropositivos para anticorpos anti-*Anaplasma* spp, utilizando a proteína recombinante MSP5 (rMSP5) de *A. marginale*. De modo semelhante, Ramos et al. (2008), relataram a presença de anticorpos anti-*A. marginale* em 11,93% e 16,17% dos caprinos e ovinos em seu estudo, respectivamente, no Estado do Pernambuco.

Com relação aos estudos moleculares, apenas duas pesquisas são reportadas em todo país. Silva et al. (2018) detectaram a infecção por *A. marginale* em 2,73% dos caprinos incluídos em seu estudo, realizado na Paraíba. Recentemente, Barbosa et al. (2020), pesquisando o agente em caprinos e ovinos na mesma localidade, reportaram 1,7% de caprinos positivos para *A. marginale*.

2.5 Diversidade Genética de *Anaplasma* spp.

Os ensaios buscando avaliar a diversidade genética de bactérias do gênero *Anaplasma* são mais amplamente realizados nas espécies *A. marginale*, que causam inúmeros prejuízos à pecuária e *A. phagocytophilum*, cuja infecção representa uma importante zoonose. Para tal, a caracterização das cepas que ocorrem inclui a morfologia, sequência de proteínas, antigenicidade e sua capacidade de serem transmitidas por carrapatos ((AUBRY e GEALE, 2011).

A diversidade genética de *A. marginale* é classificada pela análise de proteínas de superfície principais, como MSP1A, MSP4 e MSP5, que são codificadas por genes únicos. Destas proteínas, enquanto *msp4* e *msp5* são expressas por genes individuais, e não variam antigenicamente dentre os isolados, *msp1 α* , *msp1 β* , *msp2* e *msp3* são expressas por famílias multigênicas e podem variar antigenicamente (KOCAN et al., 2003). Esses genes têm sido amplamente utilizados para caracterização molecular de *A. marginale* (AUBRY e GEALE, 2011).

Pesquisas realizadas em diferentes regiões do mundo, baseadas na análise do gene *msp1 α* , como as de Jimenez-Ocampo et al. (2012) e Mutshembele et al. (2014), demonstraram a elevada heterogeneidade genética dessa riquetsia. De La Fuente et al. (2007), usando *msp1 α* encontraram 79 sequências de repetição diferentes em 131 cepas, corroborando a conhecida heterogeneidade genética de *A. marginale*. Usando os marcadores moleculares *msp1 α* e *groEL*, Ybanez et al. (2014) demonstraram alta diversidade genética em bovinos nas filipinas. Esses autores identificaram 20 sequências novas e exclusivas organizadas em 44 genótipos, curiosamente as repetições mostraram uma identidade de 90-96% para aquelas encontradas no México, Brasil, Argentina, África do Sul, Venezuela, Japão, Israel, China, Estados Unidos e Itália. Em algumas amostras, foram observadas infecções múltiplas de até três e quatro genótipos diferentes de *A. marginale*, sendo as infecções duplas os casos mais comuns.

No Brasil, as análises de diversidade de espécies de *A. marginale* são mais amplamente realizadas em bovinos. Machado et al. (2015), relataram surtos de anaplasmosose em dois

municípios do Brasil, Lins e Mambai. De acordo com a análise das estruturas de repetição em tandem de *msp1 α* , nove cepas diferentes foram encontradas em Lins e duas em Mambai. Os autores também descreveram três novas repetições de *msp1 α* (191, 192 e 193) e associaram as cepas τ -10-15 e α - β 3 - Γ à ocorrência de anaplasiose clínica e mortalidade em bezerros, novilhas e vacas em lactação. Já Baeta et al. (2015), relataram duas cepas de *A. marginale*, AmRio1 e AmRio2, que foram isoladas e propagadas em células IDE8 do sangue de dois bovinos. Adicionalmente, esses autores demonstraram que novas combinações de repetições em tandem podem dar a essas cepas vantagens adaptativas sobre os fatores de pressão seletiva. Eles observaram que a população de *A. marginale* oriundas do Brasil e Argentina formam dois grandes aglomerados: α e τ ; e o cluster τ tem maior variabilidade genética do que o cluster α , sugerindo que as linhagens pertencentes a esses dois clusters podem estar sob diferentes fontes de pressão seletiva, especificamente a imunidade do hospedeiro e transmissão de carrapatos.

Com relação aos pequenos ruminantes, Silva et al. (2018) relataram a ocorrência de cepas de *A. marginale* com base no gene *msp1 α* que exibiam a repetição F. Barbosa et al. (2020), avaliando a diversidade de *A. marginale* na mesma localidade, utilizando a análise de sequenciamento de microssatélites *msp1 α* , reportou a ocorrência da mesma repetição F, e classificou as estirpes encontradas como pertencentes ao genótipo B com uma distância SD-ATG de 23 nucleotídeos. De acordo com esses autores, esse genótipo foi anteriormente associado a gado do sul (ESTRADA-PENA et al., 2009) e sudeste do Brasil (POHL et al., 2013), cuja disseminação pode ter sido facilitada pelo transporte de gado de corte (QUIROZ-CASTAÑEDA, et al., 2016). A estirpe F/91 de *A. marginale* caracterizada nos estudos de Silva et al. (2018) e Barbosa et al. (2020) até o presente momento foram detectados apenas em caprinos. Esses autores hipotetizaram que, possivelmente, no Brasil, dessa estirpe seja relacionada a caprinos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Detectar e determinar a diversidade genética de *Anaplasma* spp. em pequenos ruminantes da região do Baixo Parnaíba, Maranhão.

3.2 Objetivos específicos

- Pesquisar a presença de *Anaplasma* spp. em esfregaços sanguíneos de caprinos e ovinos por meio de microscopia direta;
- Detectar, por meio de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireto (iELISA), a presença de anticorpos anti-*Anaplasma* spp. em amostras de soro de caprinos e ovinos;
- Quantificar o DNA de *Anaplasma marginale* em amostras de sangue por meio de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR);
- Caracterizar a diversidade genética de *Anaplasma* spp. com base no gene *msp1 α* em pequenos ruminantes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

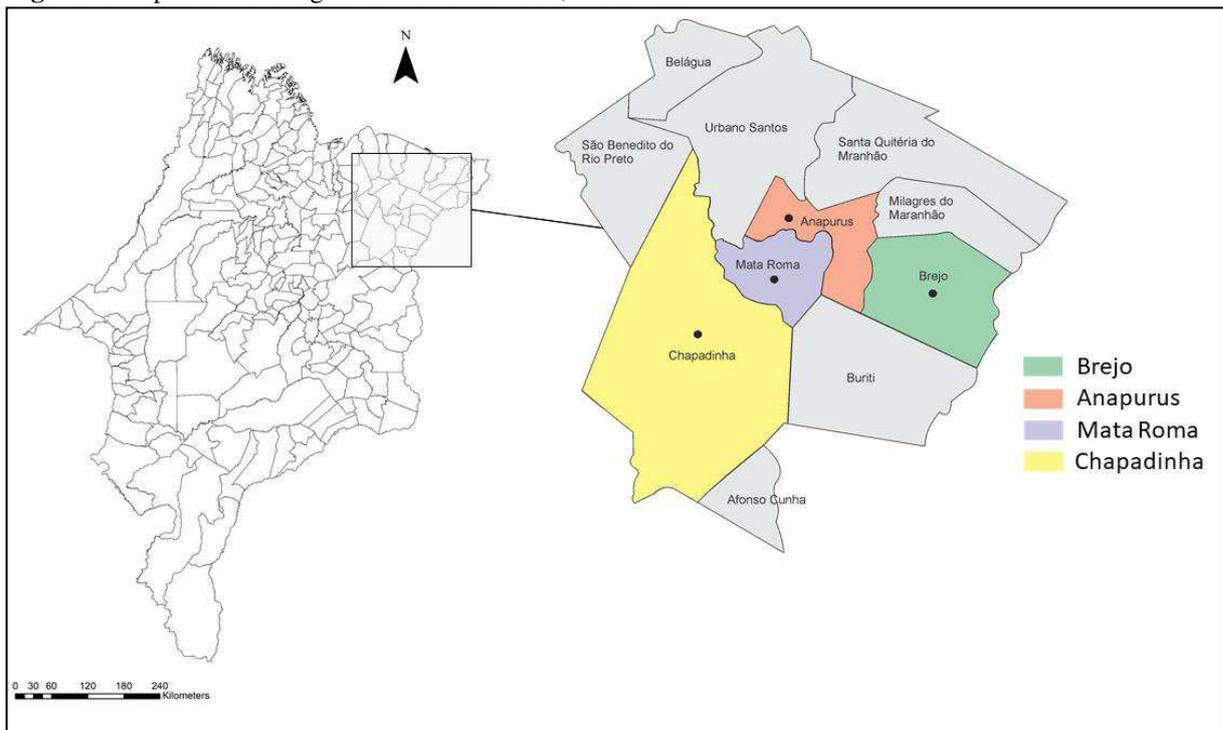
4.1 Considerações éticas

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual do Maranhão (CEEAA-UEMA) e aprovada com protocolo de número 019/2019.

4.2 Local de Estudo

As coletas de amostras de pequenos ruminantes foram realizadas na região do Baixo Parnaíba, na Mesorregião Leste <https://www.diretorioderuas.com/BR/Maranhao/Mesorregiao-Leste-Maranhense/> do Maranhão, situada entre as coordenadas geográficas 02°18' e 04°00' de latitude Sul e 41°37' e 43°30' de longitude Oeste. A região é composta por onze municípios, a saber: Afonso Cunha, Anapurus, Belágua, Brejo, Buriti, Chapadinha, Mata Roma, Milagre do Maranhão, Santa Quitéria do Maranhão, São Benedito do Rio Preto e Urbano Santos. A microrregião possui uma área total de 12.600,342 km², apresenta clima úmido seco, com índices pluviométricos anuais variando entre 1.600 a 2.000 mm, com clima predominantemente seco e chuvas irregulares ao longo do ano (IMESC, 2018; IBGE, 2020).

Figura 1. Mapa da microrregião do Baixo Parnaíba, Maranhão.



Destaque para os municípios de Brejo, Anapurus, Mata Roma e Chapadinha onde foram realizadas as coletas. Fonte: Do autor.

4.3 Animais e Coleta de amostras

Neste estudo, foram utilizados 161 animais, sendo 91 caprinos e 70 ovinos mestiços ou sem raça definida, oriundos de propriedades aleatoriamente selecionadas, localizadas em 4 municípios da microrregião do Baixo Parnaíba, sendo quatro (4) propriedades em Chapadinha, (1) em Anapurus, (1) em Brejo e (1) Mata Roma (Figura 1). As coletas foram realizadas no período de novembro a dezembro e todos os animais e todos os animais encontravam-se aparentemente saudáveis.

Foram coletados 8 mL de sangue da veia jugular de cada animal, utilizando-se seringas e agulhas descartáveis, os quais foram acondicionados em tubos esterilizados contendo anticoagulante universal EDTA e tubos sem anticoagulante e devidamente identificados e armazenados para posteriores análises laboratoriais. Para obtenção de soro sanguíneo, as amostras de sangue total foram centrifugadas a 1.500 rpm durante 10 minutos, aliqüotadas em microtubos estéreis de 1,5mL e armazenadas a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

Concomitante ao procedimento de obtenção de amostras, foram colhidas informações relacionadas aos animais e ao seu sistema de criação, finalidade, criações de múltiplas espécies e controle de ectoparasitas.

4.4 Esfregaços sanguíneos

O exame direto, para detecção e identificação de *Anaplasma* spp. em amostras de sangue de caprinos e ovinos, foi realizado por meio da utilização de sangue venoso, com o qual foram confeccionados esfregaços sanguíneos finos, de acordo com o protocolo padrão descrito por Benjamin (2005). Sucintamente, as lâminas foram deixadas para secar em temperatura ambiente antes de serem fixadas com metanol absoluto. Em seguida, os esfregaços fixos foram corados com solução de Giemsa e examinados em microscópio óptico, com uso de óleo de imersão (KESSLER e SCHENK, 1998) e as inclusões de *Anaplasma* spp. foram pesquisadas com base em sua morfologia (BOWMANN, 2009).

4.5 Pesquisa de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* por meio do ELISA indireto (iELISA)

Todas as amostras de soro de ovinos e caprinos foram testadas para anticorpos *anti-A. marginale* utilizando-se antígenos da proteína de superfície recombinante 5 (MSP5)

(Imunodot Diagnósticos, Jaboticabal, BR), de acordo com a metodologia previamente padronizada por Barbosa et al. (2020).

Foram adicionadas alíquotas de 100 µL de antígenos solúveis de *A. marginale*, diluído na concentração de 2 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6, em cada cavidade da microplaca (Maxisorp Nunckon TM Surface, Nunc. Danamark). Após a incubação por 8 a 10 horas em câmara úmida a 4 °C, o excesso de antígeno foi removido por três lavagens consecutivas com tampão PBS 0,01 M, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween 20). Em seguida as placas foram bloqueadas com PBS-Tween 20, acrescido de 6% de leite em pó, em câmara úmida a 37 °C, por 90 minutos. Após nova lavagem e retirada do bloqueador, foram adicionados em duplicata 100 µL dos soros testes e dos soros de referência positivos e negativos diluídos a 1:100 em PBS-Tween 20. Então as microplacas foram novamente incubadas a 37 °C, por 60 minutos e submetidas a lavagem. Em seguida, 100 µL do conjugado caprino ligado a fosfatase alcalina (Ig de coelho anti IgG de caprino, Sigma Aldrich, St. Louis, USA), diluído a 1:60.000 em PBS-Tween 20, foram adicionados a cada cavidade da placa, seguindo-se de uma nova incubação e lavagem, como as realizadas anteriormente. O substrato da enzima fosfatase alcalina (paranitrofenilfosfato diluído a 1 mg/mL em tampão dietanolamina pH 9,8, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) foi adicionado e em seguida incubou-se a reação por 30 minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse período, a leitura foi realizada em um leitor de microplacas de ELISA (iMark, Bio-Rad), a um comprimento de onda de 405 nm. O valor de absorbância discriminante (*cut-off*) foi determinado como 2,5 vezes o valor médio de absorbância do negativo.

4.6 Extração de DNA

Para a extração de DNA a partir de amostras de sangue total, foi utilizado o kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega®), seguindo as instruções do fabricante. A concentração e qualidade do DNA extraído foi avaliada e determinada através de leitura em espectrofotômetro.

4.7 Análises moleculares do DNA extraído a partir de amostras de sangue

4.7.1 Detecção do gene endógeno Citocromo b (Cyt b)

Com o intuito de verificar a qualidade da extração, a integridade do DNA obtido e/ou a presença de inibidores da reação, todas as amostras foram submetidas à PCR para confirmação da presença do gene conservado Citocromo b (*Cyt b*) do DNA mitocondrial de vertebrados

(mtDNA), previamente descritos por Steuber, Abdel-Rady e Clause (2005), que produz um fragmento de 359 pares de base (Tabela 1). Cada reação teve um volume total de 12,5 μ L, sendo: 6,25 μ L de PCR Master mix Promega® (Taqpolymerase, dNTPs, MgCl₂, buffer); 0,5 μ L de cada primer (10pmol); 4,25 μ L de água DNase e RNase free; e 1 μ L de amostra de DNA extraído (100ng/reação). Foram utilizados controles positivos e negativos em cada reação. O protocolo de amplificação foi o seguinte: uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação (94°C por 30 segundos, 52°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Tabela 1. Lista de iniciadores utilizados para a PCR convencional e em tempo real utilizados nesta pesquisa.

Gene	Agentes/alvo	Sequência de Oligonucleotídeos (5'-3')	Referência
(mtDNA): 359 pb	<i>Cyt b</i>	Cytb F: CCAAAGTTGTCATGGATGACC Cytb R: CCAAAGTTGTCATGGATGACC	Steuber, Abdel-Rady e Clause (2005)
Proteína de Superfície de Membrana 1β	<i>Msp1β</i>	Msp1 β F: TTGGCAAGGCAGCAGCTT Msp1 β R5-TTCCGCGAGCATGTGCAT	Carelli et al. (2007)
Proteína de Superfície de Membrana 1α	<i>Msp1α</i>	Msp1 α R: GTGCTTATGGCAGACATTTCC Msp1 α FCTCAACACTCGCAACCTTGG	Castañeda-Ortiz et al. (2015)

4.7.2 qPCR para *Anaplasma marginale* baseada no gene *msp1 β*

As amostras positivas na PCR convencional baseada no gene *Cyt b* foram submetidas a ensaio de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para *A. marginale* baseada no gene MSP1 β , seguindo protocolo previamente descrito por Carelli (2007). As reações de amplificação foram conduzidas em aparelho termociclador CFX96 Thermal Cycler® (BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos). Todas as amostras foram testadas em duplicatas. A quantificação do número de cópias de DNA/ μ L foi realizada com a utilização do gBlocks (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA) contendo a sequência alvo para amplificação do DNA de *A. marginale*. Diluições seriadas foram feitas a fim de construir padrões com diferentes concentrações de DNA contendo a sequência-alvo (2,0 x 10⁷ cópias/ μ L a 2,0 x 10⁰ cópias/ μ L). Água estéril ultrapura (Qiagen®, Madison, Estados Unidos) foi utilizada como controle-negativos da

reação. Alíquota de DNA da amostra Jaboticabal de *A. marginale* foi utilizada como controle positivo da reação.

4.7.3 *snPCR para detecção de A. marginale baseada no gene msp1a*

As amostras positivas na qPCR para *A. marginale* baseada no gene *msp1β* foram submetidas à snPCR para o referido agente baseada no gene *msp1a*, utilizando protocolo previamente descrito por Castañeda-Ortiz (2015). Água ultrapura (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) foi utilizada como controle negativo em todos os ensaios de PCR. Alíquota de DNA da amostra Jaboticabal de *A. marginale* foi utilizada como controle positivo das reações. Todos os produtos dos ensaios de PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,0% corado com Brometo de Etídeo (0,625 µL/mL) em tampão de corrida TBE pH 8,0 para visibilização dos resultados. A eletroforese foi realizada a 90 V/ 150 mA durante 50 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados, utilizou-se um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA). Os resultados foram visibilizados e analisados por um transiluminador de luz ultravioleta acoplado a um programa computacional de análise de imagens (Chemi-Doc MP Imaging System, Bio-Rad®)

4.7.4 *Purificação e sequenciamentos dos produtos amplificados*

Os produtos amplificados foram purificados utilizando-se o kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®), de acordo com as recomendações dos fabricantes. A quantificação do DNA purificado foi realizada por meio de leitura em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, San Jose CA, USA).

O sequenciamento foi realizado de acordo com o método de terminação de cadeia de dideoxinucleotídeo (SANGER et al., 1977) no sequenciador ABI PRISM 3700 Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). O sequenciamento foi feito no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica da Universidade Estadual de São Paulo (CREBIO/FCAV/UNESP).

4.7.5 *Análise das seqüências consenso baseadas no gene msp1a*

As seqüências de nucleotídeos obtidas foram inseridas no programa Phred Phrap (Compact ALignment Format) para triagem e avaliação da qualidade dos eletroferogramas. Bases com qualidade acima de 20 foram consideradas confiáveis. O programa BLASTn foi

usado para comparar as identidades dos nucleotídeos obtidos com sequências depositadas no GenBank.

4.7.6 Classificação de genótipos de *A. marginale* e identificação da diversidade genética

Para identificação o genótipo foi feito a classificação proposta por Estrada-Peña et al. (2009) seguindo os seguintes passos: encontrou-se a região chamada de Shine-Dalgarno (GTAGG) e logo em seguida o próximo códon 26 de iniciação da tradução (ATG). Dentro deste intervalo (GTAGG-ATG) foram contabilizados os GTT, chamando-os de “m” e os GT, chamando-os de “n”. A análise de sequências repetidas foi realizada conforme a nomenclatura proposta por De la Fuente et al. (2007). 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, segundo critérios descritos por de la Fuente et al. (2002).

A diversidade genética foi calculada pelo software RepeatAnalyzer e dividida em duas categorias: a primeira categoria de métricas (GDM1) foi centralizada na quantidade e mensura a porcentagem de repetições únicas em uma região, enquanto a segunda (GDM2) foi centralizada na distribuição e mensura a regularidade com a qual as repetições são distribuídas. GDM1 e o GDM2 foram apresentados em duas variantes, local e global, dependendo se o cálculo métrico é uma média dos valores de cada genótipo ou de sua região, respectivamente (CATANESE, BRAYTON e GEBREMEDHIN, 2016)

4.8 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise descritiva, em que foram calculados os percentuais de positividade obtidos por cada método de diagnóstico. Associação entre a presença (amostras de soro positivas e negativas) de *Anaplasma* e parâmetros como a espécie e sexo dos animais, foram avaliados com base no teste qui-quadrado de Pearson (χ^2) e o teste Exato de Fisher, utilizando o programa GraphPad Prism (OSB Software[®]). Um valor $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Análise dos esfregaços sanguíneos

No exame microscópico para detecção direta em esfregaço sanguíneo, não foram observadas inclusões intra-eritrocitários sugestivas de *Anaplasma* spp.

5.2 Anticorpos IgG contra *A. marginale* (rMSP5)

O teste sorológico iELISA, utilizando proteína recombinante rMSP5 de *A. marginale* revelou a presença de anticorpos IgG anti-*A. marginale* em 11,18% (18/161) das amostras de soros dos animais testados. Destes, 2 animais eram de espécie ovina e dezesseis animais pertencentes à espécie caprina. Houve maior frequência de positividade em caprinos do que em ovinos, com diferença estatística significativa, e, com relação ao gênero, a taxa de positividade foi maior entre as fêmeas do que em machos. Os dados estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2. Frequência de infecção por *A. marginale* de acordo com a espécie e gênero, por meio do iELISA (rMSP5).

	rMSP5 iELISA		
	Pos/neg	Frequência (%)	Valor de p
Espécie			
Ovinos	2/70	2,85	0,043*
Caprinos	16/91	17,58	
Gênero			
Machos	4/44	8,33	0,5891
Fêmeas	14/99	12,39	

pos/neg= amostras positivas/negativas

*Estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Observou-se ainda, que os títulos de anticorpos contra *A. marginale* foram próximos ao ponto de corte (0,235) em muitos dos animais amostrados, com apenas dois animais (2/18) apresentando títulos elevados (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição dos animais soropositivos na pesquisa de anticorpos IgG anti-*A. marginale* usando antígeno total e a rMSP5 e a dados da quantificação da Densidade Ótica das amostras.

Identificação	DO (ponto de corte 0,235)	Local
---------------	---------------------------	-------

OVI03	0,303	Chapadinha, Maranhão, Brasil
OVI09	0,319	Chapadinha, Maranhão, Brasil
CAP31	0,797	Chapadinha, Maranhão, Brasil
CAP33	0,292	Chapadinha, Maranhão, Brasil
CAP37	0,257	Chapadinha, Maranhão, Brasil
CAP39	0,470	Chapadinha, Maranhão, Brasil
CAP44	0,490	Chapadinha, Maranhão, Brasil
CAP48	0,370	Chapadinha, Maranhão, Brasil
CAP51	0,355	Chapadinha, Maranhão, Brasil
CAP53	0,237	Chapadinha, Maranhão, Brasil
CAP65	0,308	Chapadinha, Maranhão, Brasil
CAP67	0,410	Chapadinha, Maranhão, Brasil
CAP86	0,272	Chapadinha, Maranhão, Brasil
CAP89	0,239	Anapurus, Maranhão, Brasil
CAP90	0,869	Anapurus, Maranhão, Brasil
CAP96	0,270	Anapurus, Maranhão, Brasil
CAP101	0,320	Anapurus, Maranhão, Brasil
CAP109	0,426	Anapurus, Maranhão, Brasil

DO= Densidade ótica.

5.3 Ensaio de qPCR para *A. marginale* baseados no gene *msp1β* e semi-nested PCR baseadas no gene *msp1α* em ovinos e caprinos

Todas as amostras testadas amplificaram com sucesso o gene endógeno *Cyt b*. Dos 161 animais amostrados, 2 (1,24%) foram positivos para *A. marginale*, pela qPCR do gene *msp1β*, sendo ambas as amostras pertencentes à espécie caprina (Tabela 4). Nenhum desses animais foram positivos na sorologia. A quantificação foi de $1,43 \times 10^3$ e $2,49 \times 10^3$ cópias de um fragmento do gene *msp1β*/μL. Os parâmetros dos ensaios foram 104% de eficiência (E), 0,999 de coeficiente de determinação (R^2), -3,10 para inclinação (slope) e 38,22 no intercepto do eixo

y (y-int). As amostras positivas na qPCR foram submetidas a snPCR com base no gene *MSP1 α* e todas foram positivas (Tabela 4). Ambas as amostras positivas foram sequenciadas e foi possível obter sequências com qualidade referente ao gene *mSP1 α* , por meio da análise realizada pelo programa Phred Phrap. As sequências obtidas, quando submetidas ao BLASTn, revelaram porcentagens de identidade variando de 90.97% a 98.79% com sequências de *A. marginale* previamente depositadas no GenBank e cobertura entre 97% a 99%.

Tabela 4. Frequência de positividade para *Anaplasma* sp. na qPCR *mSP1 β* e nested PCR *mSP1 α* de amostras de ovinos e caprinos.

Espécie	Gene Alvo		
	qPCR <i>mSP1β</i> e nested PCR <i>mSP1α</i>		
	Nº Positivo	Nº Negativo	(%)
Ovinos	0	70	-
Caprinos	2	91	2,2
Total	2	161	1,24

5.4 Análise de diversidade genética de *A. marginale* baseada no gene *mSP1 α*

Utilizando o software RepeatAnalyzer para a classificação genotípica alfanumérica e identificação de estirpes, foram encontradas 2 estirpes, cada uma pertencente a uma amostra positiva para *A. marginale* dos caprinos, ambas as amostras apresentaram genótipo H, com com a distância SD-ATG de 23 nucleotídeos cada, de acordo com a classificação de Estrada-Paña et al. (2009) (Tabela 5).

Os índices métricos de diversidade genética de *A. marginale*, GDM1-Local (0.86) e GDM1-Global (0.25) obtidos em ovinos amostrados, revelaram alto valor, sendo os índices medidos de 0 a 1. Isto indica que as repetições de sequências curtas (SSRs) foram bastante diversas entre si e na região estudada. Com relação aos índices GDM2-Local (0.056) e GDM2-Global (0.036), estes mostraram-se baixos, indicando que as SSRs se apresentam em quantidades iguais entre si, ou seja, ocorreram aproximadamente o mesmo número de vezes e que a distribuição entre estes animais foi uniforme. Estes baixos valores de GDM2 indicam que as SSRs são pouco dispersas.

Tabela 5. Caracterização dos genótipos e estirpes das amostras positivas para o gene *msp1 α* de *A. marginale*, com número do animal, estimativa da riquetsemia por qPCR absoluta e localização.

Identificação	Estirpe	SD-ATG	Genótipo (Estrada- Peña et al., 2009)	Riquetsemia absoluta qPCR (<i>msp1β</i> / μ L)	Local
CAP127	$\alpha \beta$	23	H	$1,43 \times 10^3$	Brejo – Maranhão, Brasil
CAP155	$\alpha \beta \Gamma; \gamma; \Gamma; \gamma; \Gamma; \gamma; \Gamma; \gamma$	23	H	$2,49 \times 10^3$	Brejo – Maranhão, Brasil

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, durante a análise dos esfregaços sanguíneos não foi possível identificar inclusões intra-citoplasmáticas sugestivas de *Anaplasma* sp, diferentemente do reportado por Shabana et al. (2018), que em seu estudo comparativo sobre técnicas de diagnóstico da anaplasmoze ovina e caprina, reportaram a identificação de espécies de *Anaplasma* em 43,6% das lâminas analisadas, utilizando a mesma técnica.

A ausência de detecção da bactéria nos esfregaços sanguíneos não é um resultado particularmente inesperado, tendo em vista que esta técnica apresenta sensibilidade muito variada. Dentre os fatores que podem interferir na detecção desses microrganismos, a fase de infecção é a mais amplamente discutida. A análise de esfregaços é mais eficiente em infecções agudas, em que se observa elevada bacteremia, o que aumenta as chances de encontrar inclusões bacterianas nas células analisadas (RENNEKE et al., 2012; SILAGHI et al., 2016; SHABANA et al., 2018). Esta situação também foi demonstrada por Yasini et al. (2012), que realizaram infecção experimental em ovinos e acompanharam as alterações parasitológicas em esfregaços sanguíneos. Esses autores observaram que a porcentagem de corpos de inclusão de *Anaplasma* aumentou significativamente com o progresso da infecção e atingiu um pico 12 dias após a infecção e desse ponto até o dia 38, houve um declínio gradual na porcentagem de parasitemia.

Adicionalmente, Woldehiwet (2010), também relatou que em animais infectados em condições de campo, similar aos do presente estudo, a detecção do organismo no sangue periférico parece ser afetada pelo número e frequência de infestação por carrapatos. Esfregaços

de sangue de animais persistentemente infectados demonstraram resultados negativos devido ao baixo número de células infectadas por *Anaplasma* em circulação (STUEN et al. 2007, 2008; Kocan et al. 2010). A doença em pequenos ruminantes tende a ter um curso subclínico (WOLDEHIWET, 2010; ATIF et al., 2015) e, especificamente neste estudo, no momento das coletas das amostras nenhum dos animais apresentavam sinais clínicos compatíveis com a anaplasmosose ou infestações intensas por carrapatos.

Embora essas situações possam interferir na sensibilidade dessa técnica, o exame microscópico apresenta as vantagens de ser considerado uma técnica de baixo custo e de rápida realização, e sua eficiência na fase aguda da infecção é útil, pois nesta etapa os testes sorológicos têm valor limitado, devido à ausência de anticorpos detectáveis (THOMAS, DUMLER e CARLYON, 2009).

Comparando os percentuais encontrados no presente estudo, onde encontrou-se 11,1% de animais soropositivos, sendo 17,5% deles caprinos e 2,2% ovinos observa-se que as taxas aqui registradas não diferem muito das encontradas em outras localidades do Brasil, como em estudos sorológicos anteriores que evidenciaram a exposição de *Anaplasma* sp em pequenos ruminantes, como a pesquisa realizada por Ramos et al. (2008), no Estado do Pernambuco, que detectaram soropositividade em 11,9% dos caprinos e 16,17% em ovinos, no teste ELISA utilizando a proteína recombinante rMSP5 de *A. marginale*. Utilizando metodologia semelhante, Cabral et al. (2009), detectaram anticorpos anti-*A. marginale* em 8,9% dos ovinos amostrados. Um estudo mais recente publicado por Barbosa et al. (2020), no estado da Paraíba, obteve 39.5 % de soropositividade em caprinos e 3% em ovinos em rMSP5-ELISA de *A. marginale*.

No presente estudo observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,043$) nos percentuais de positividade entre ovinos e caprinos. Excetuando-se a pesquisa de Barbosa et al. (2020), as pesquisas sorológicas realizadas no Brasil demonstram uma maior taxa de positividade em ovinos em relação a caprinos, assim como Shabana et al. (2017), que também reportaram maior taxa de positividade em ovinos em seu estudo realizado na Arábia Saudita, onde foram utilizados ambos os testes cELISA e IFA.

Observou-se ainda, que os títulos de anticorpos contra *A. marginale* foram próximos ao ponto de corte em muitos dos animais amostrados (ponto de corte 0,235), o que pode indicar uma baixa resposta sorológica nesses animais. Este quadro é semelhante ao que tem sido reportado em infecções por *A. marginale* em bovinos (ZHUANG et al., 2007; BROWN et al.,

2012), onde observa-se que a resposta na produção de anticorpos diminui nos animais à medida que a infecção se torna persistente. Essa resposta já foi observada também em infecções por outras espécies de *Anaplasma*, como em infecção por *A. ovis*, em caprinos, demonstrado por Ndung'u et al. (1995), que observaram um decréscimo progressivo na resposta sorológica após a infecção, sugerindo que as cabras permanecem persistentemente infectadas, semelhante ao que ocorre em bovinos em infecções por *A. marginale*, nas quais os níveis de anticorpos diminuem mas permanecem constantes e detectáveis nos testes sorológicos (FRENCH et al., 1998). Com isso podemos supor que a resposta sorológica contra *A. marginale* em ovinos e caprinos observada nesta pesquisa possa seguir o mesmo padrão observado na literatura.

Este é o primeiro levantamento sorológico, até onde sabemos, realizado no Estado do Maranhão, a fim de determinar a presença de anticorpos contra *A. marginale* em rebanhos de pequenos ruminantes. Buscando dados na literatura científica brasileira observou-se que além deste, apenas outros três estudos foram conduzidos em todo país com o mesmo objetivo (RAMOS et al., 2008, CABRAL et al., 2009; BARBOSA et al., 2020), todos realizados em rebanhos oriundo da região Nordeste. Esta situação demonstra que esses estudos ainda são escassos e concentrados em uma única região do país, e evidenciam a exposição dos pequenos ruminantes com esses agentes infecciosos. Diante disso, pode-se supor que a ocorrência da infecção por *Anaplasma* spp. em ovinos e caprinos seja muito maior do que se tem estimado.

A detecção de DNA de *A. marginale* por meio da qPCR baseada no gene *msp1β* foi baixa no presente estudo (1,24%). No entanto, o percentual encontrado foi próximo ao relatado por Silva et al. (2018), que detectaram o DNA de *A. marginale* em 2,73% caprinos, no Estado da Paraíba; e também foi similar ao encontrado por Barbosa et al. (2020), na mesma localidade, que detectaram o DNA de *A. marginale* em 1,7 % dos caprinos incluídos no pesquisa.

Comparando-se com pesquisas realizadas em diferentes partes do mundo, observa-se que a ocorrência de *A. marginale* em pequenos ruminantes só foi reportada uma única vez por Yousefi et al. (2017), no Irã, em ovinos. Por outro lado, nota-se que a espécie mais associada a esses animais é *A. ovis*, como relatado na Europa (DAHMANI et al., 2017; LACASTA et al., 2020), na China (PENG et al., 2018) e na África (RINGO et al., 2019), o que difere do que tem sido reportado em estudos moleculares no Brasil, os quais, até o presente momento, identificaram somente infecções por *A. marginale* (SILVA et al., 2018; BARBOSA et al., 2020).

Analisando as duas sequências positivas para *A. marginale*, baseada no gene *msp1a*, obtidas neste estudo, ambas foram classificadas como pertencentes ao genótipo H, de acordo com a classificação proposta por Estrada-Peña et al. (2009). Diferentemente do que foi reportado em uma pesquisa anterior realizada em pequenos ruminantes (utilizando o mesmo critério de classificação), por Barbosa et al. (2020), no estado da Paraíba, na qual os autores demonstraram a ocorrência do genótipo B. Extrapolando a comparação para outros estudos realizados em bovinos no Brasil, observa-se que o genótipo H (pela classificação de Estrada-Peña et al., 2009) foi previamente demonstrado na cidade de Lins (MACHADO et al., 2015) e também na cidade de Itú (GARCIA et al., 2020) (ainda não publicado) ambas localizadas no Estado de São Paulo.

Um estudo ainda não publicado, realizado em bovinos na região do Médio Mearim, no estado do Maranhão (GOMES et al., 2020), verificou a alta diversidade genética de *A. marginale* em bovinos, onde o genótipo H foi o mais frequente. Essa situação, aliada aos dados do presente estudo demonstra a ocorrência de genótipos em ovinos no estado do Maranhão que até então eram associados somente a bovinos. É importante considerar que a propriedade em que esses animais estavam alocados era voltada principalmente para a criação de gado de corte, sendo a criação de pequenos ruminantes realizada de forma secundária. Observou-se ainda, que as instalações destinadas ao confinamento de bovinos, caprinos e ovinos eram próximas umas das outras (dados não mostrados). Embora não se tenha testado os bovinos nessas propriedades, tem sido descrito que cenários semelhantes a este podem facilitar a transmissão interespecie de patógenos, como foi descrito por Silva et al. (2015), que detectou uma única cepa de *A. marginale* infectando bovinos, búfalos e carrapatos *R.(Boophilus) microplus* no Estado do Rio de Janeiro.

Além disso, nessa propriedade também foi detectada a presença de carrapatos *R. (Boophilus) microplus*, considerados principais vetores da anaplasmose no Brasil, parasitando os animais. Com isso, ainda que não tenham sido realizadas análises específicas para esta finalidade, não se pode desconsiderar a possibilidade de carrapatos estarem realizando a passagem dessas estirpes entre os bovinos e os pequenos ruminantes.

Com relação à análise das repetições em tandem pelo programa RepeatAnalyzer, demonstrou-se a ocorrência de duas estirpes diferentes, compostas pelas repetições α β e α β Γ ; γ , não relatadas anteriormente em pequenos ruminantes. Essas estirpes foram diferentes das anteriormente relatadas em estudos de diversidade genética de *A. marginale* em ovinos e caprinos, no estado da Paraíba, em que os autores descreveram a ocorrência da estirpe

F/91 em todos os animais (SILVA et al., 2018; BARBOSA et al., 2019). Esses autores sugeriram ainda que a ocorrência desta estirpe pode estar associada apenas a caprinos no Brasil, considerando que até o presente momento ela foi descrita apenas nesta espécie.

Analisando os índices de diversidade genética GDM1 pelo RepeatAnalyzer, o elevado valor desse índice encontrado nesta pesquisa demonstrou que as estirpes apresentaram-se diversas entre si e na região do presente estudo. Os baixos valores dos índices GDM2 revelaram uma baixa taxa de dispersão dessas novas cepas. Essa situação também foi observada em estudo semelhante realizado em bovinos no estado de São Paulo, realizado por Ramos et al. (2019), onde também foi observado um alto grau de diversidade genética e baixa dispersão de estirpes.

É relatado na literatura alguns fatores que podem levar à diversidade genética de *A. Marginale*, como a introdução de cepas geneticamente diversas pela movimentação do gado em diferentes regiões geográficas (Battilani et al., 2017). Além disso, em um estudo realizado na África do Sul, Zamantungwa et al. (2016), constataram que o aumento no número de novos genótipos/linhagens circulantes indicaria uma maior circulação destes na natureza pela ação da pressão de seleção e consequente mutação. Os animais positivos amostrados neste estudo eram nativos desta região do Baixo Parnaíba, porém criados em associação a bovinos, com isso, hipotetiza-se que mais de um dos fatores citados acima possam ter contribuído para a diversidade observada neste estudo.

Nenhum dos animais positivos por meio do ELISA foi positivo na qPCR. Este resultado não é surpreendente, tendo em vista as diferenças intrínsecas de cada técnica e se os animais se encontram em fase de infecção aguda ou crônica. Estudos já vem demonstrando que os anticorpos contra *Anaplasma* podem ser detectados no soro por longos períodos após a exposição do animal ao agente (WAAL, 2012), por isso a importância da realização de levantamentos sorológicos aliados a ferramentas moleculares, especialmente nos casos de rebanhos persistentemente infectados. Com relação a qPCR, autores demonstram a sua elevada sensibilidade e além desta técnica permitir a quantificação das bactérias, especialmente na fase de bacteremia (CARELLI et al., 2007; SHABAN et al., 2018). Adicionalmente Silaghi (2017), apontam que a própria sensibilidade da detecção molecular depende de fatores como a natureza e qualidade das amostras e número de cópias genômicas dos genes-alvo, que pode ser baixo nos animais portadores de infecções persistentes.

7 CONCLUSÃO

Foi possível detectar a exposição de caprinos a *A. marginale*, por meio do iELISA baseado em proteína recombinante msp5; confirmar a infecção utilizando-se a qPCR, snPCPR em dois caprinos, na região do Baixo Parnaíba Maranhense. Conclui-se ainda, que há diversidade genética de *A. marginale*, com a caracterização de duas estirpes distintas, não descritas previamente em ovinos, pertencentes ao mesmo genótipo.

REFERÊNCIAS

- AGUERO-ROSENFELD, M. E.; DONNARUMMA, L.; ZENTMAIER, L.; JACOB, J.; FREY, M.; NOTO, R.; WORMSER, G. P. Seroprevalence of antibodies that react with *Anaplasma phagocytophila*, the agent of human granulocytic ehrlichiosis, in different populations in Westchester County, New York. **Journal of clinical microbiology**, 40(7), 2612-2615.
- AKTAS, M.; ÖZÜBEK, S. *Anaplasma ovis* genetic diversity detected by major surface protein 1a and its prevalence in small ruminants. **Veterinary microbiology**, v. 217, p. 13-17, 2018.
- ALVES, A. R.; VILELA, M. D. S.; ANDRADE, M. V. M. D.; PINTO, L. D. S.; LIMA, D. B. D.; LIMA, L. L. L. Caracterização do sistema de produção caprino e ovino na região sul do estado do Maranhão, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 24, n. 3, p. 515-524, 2017.
- ATIF, F. A. *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: *Rickettsiales* pathogens of veterinary and public health significance. **Parasitology research**, v. 114, n. 11, p. 3941-3957, 2015.
- AUBRY, P.; GEALE, D. W. A review of bovine anaplasmosis. **Transboundary and emerging diseases**, v. 58, n. 1, p. 1-30, 2011.
- BAÊTA, B. A.; RIBEIRO, C. C.; TEIXEIRA, R. C.; CABEZAS-CRUZ, A.; PASSOS, L. M.; 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.
- BARBOSA, I. C.; ANDRÉ, M. R.; DO AMARAL, R. B.; VALENTE, J. D.; VASCONCELOS, P. C.; OLIVEIRA, C. J.; VIEIRA, R. F. *Anaplasma marginale* in goats from a multispecies grazing system in northeastern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, p. 101592, 2020.
- BATISTA, N. L.; DE SOUZA, B. B. Caprinovinocultura no semiárido brasileiro-fatores limitantes e ações de mitigação. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 11, n. 1, p. 01-09, 2015.
- BATTILANI, M.; DE ARCANGELI, S.; BALBONI, A.; DONDI, F. Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 49, p. 195-211, 2017.

BENJAMIN, M. M. **Outline of veterinary clinical pathology**. III ed. New Delhi: Kalyani Publishers; 2005.

BILGIC, H. B.; BAKIRCI, S.; KOSE, O.; UNLU, A. H.; HACILARLIOGLU, S.; EREN, H.; KARAGENC, T. Prevalence of tick-borne haemoparasites in small ruminants in Turkey and diagnostic sensitivity of single-PCR and RLB. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 211, 2017.

BOWMANN, D. D. **George's parasitology for veterinarians**. 9th ed. Louis: Saunders Elsevier, St; 2009.

BRADWAY, D. S.; DE ECHAIDE, S. T.; KNOWLES, D. P.; HENNAGER, S. G.; MCELWAIN, T. F. Sensitivity and specificity of the complement fixation test for detection of cattle persistently infected with *Anaplasma marginale*. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 13, n. 1, p. 79-81, 2001.

BROUQUI, P.; MATSUMOTO, K. 13 Bacteriology and Phylogeny of *Anaplasmataceae*. **Rickettsial diseases**, p. 179, 2007.

BROWN, W. C. Adaptive immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation: implications for bacterial persistence. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 35, n. 3, p. 241-252, 2012.

CABEZAS-CRUZ, A.; GALLOIS, M.; FONTUGNE, M.; ALLAIN, E.; DENOUAL, M.; MOUTAILLER, S.; CHARTIER, C. Epidemiology and genetic diversity of *Anaplasma ovis* in goats in Corsica, France. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2019.

CABRAL, D. A.; ARAÚJO, F. R.; RAMOS, C. A. D. N.; ALVES, L. C.; PORTO, W. J. N.; DA GLORIA F., M. A. Serological survey of "*Anaplasma*" sp. in sheep from State of Alagoas, Brazil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 3, 2009.

CARACAPPA, S. Livestock production and animal health in Sicily, Italy. **Parassitologia**, v. 41, p. 17-23, 1999.

CARELLI, G.; DECARO, N.; LORUSSO, A.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; MARI, V.; BUONAVOGLIA, C. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. **Veterinary microbiology**, v. 124, n. 1-2, p. 107-114, 2007.

CASTAÑEDA-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, n. 3, p. e0120748, 2015.

CATANESE, H. N.; BRAYTON, K. A.; GEBREMEDHIN, A. H. RepeatAnalyzer: a tool for analysing and managing short-sequence repeat data. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 422, 2016.

CHOCHLAKIS, D.; IOANNOU, I.; TSELENTIS, Y.; PSAROULAKI, A. Human anaplasmosis and *Anaplasma ovis* variant. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 6, p. 1031, 2010.

COSTA, V. M. D. M.; RIBEIRO, M. F. B.; DUARTE, A. L. L.; MANGUEIRA, J. M., PESSOA, A. F. A.; AZEVEDO, S. S.; LABRUNA, M. B. Soroprevalência e fatores de risco para anaplasmoze, babesiose e tripanosomíase bovina em uma região semiárida do Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 207-213, 2013.

DAHMANI, M., DAVOUST, B.; TAHIR, D.; RAOULT, D.; FENOLLAR, F.; MEDIANNIKOV, O. Molecular investigation and phylogeny of *Anaplasmataceae* species infecting domestic animals and ticks in Corsica, France. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 302, 2017.

DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B. B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends in parasitology**, v. 28, n. 10, p. 437-446, 2012.

DE LA FUENTE, J.; RUYBAL, P.; MTSHALI, M. S.; NARANJO, V.; SHUQING, L.; MANGOLD, A. J.; TORINA, A. Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. **Veterinary microbiology**, v. 119, n. 2-4, p. 382-390, 2007.

DE LA FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHIE, R.A.; GARCIA GARCIA, J.C.; RODRÍGUEZ, S.D.; GARCIA, M.A.; GUGLIELMONE, A.A.; MANGOLD, A.J.; FRICHE PASSOS, L.M.; BARBOSA RIBEIRO, M.F.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M. Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. **Veterinary microbiology**, v. 88, n. 3, p. 275-285, 2002.

DE LA FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHIE, R.A.; PRADO, T.; KOCAN, K.M. *Anaplasma marginale msp1a* genotypes evolved under positive selection pressure but are not markers for geographic isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1609-1616, 2003

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.; ANDRÉ, M. R. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in beef cattle in the Brazilian Pantanal. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 10, n. 4, p. 805-814, 2019.

DE WAAL, T. Advances in diagnosis of protozoan diseases. **Veterinary Parasitology**, v. 189, n. 1, p. 65-74, 2012.

DECARO, N.; CARELLI, G.; LORUSSO, E.; LUCENTE, M. S.; GRECO, G.; LORUSSO, A.; BUONAVOGLIA, C. Brief research reports. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 606-611, 2008.

DREHER, U. M.; HOFMANN-LEHMANN, R.; MELI, M. L.; REGULA, G.; CAGIENARD, A. Y.; STÄRK, K. D.; LUTZ, H. Seroprevalence of anaplasmosis among cattle in Switzerland in 1998 and 2003: no evidence of an emerging disease. **Veterinary microbiology**, v. 107, n. 1-2, p. 71-79, 2005.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. C.; 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*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

DUMLER, J. S.; MADIGAN, J. E.; PUSTERLA, N.; BAKKEN, J. S. (Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. **Clinical infectious diseases**, v. 45, n. Supplement_1, p. S45-S51, 2007.

EDDLESTONE, S. M.; GAUNT, S. D.; NEER, T. M.; BOUDREAUX, C. M.; GILL, A.; HASCHKE, E.; CORSTVET, R. E. PCR detection of *Anaplasma platys* in blood and tissue of dogs during acute phase of experimental infection. **Experimental parasitology**, v. 115, n. 2, p. 205-210, 2007.

EKICI, O. D.; SEVINC, F. Comparison of cELISA and IFA tests in the serodiagnosis of anaplasmosis in cattle. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 10, p. 1188-1191, 2011.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Ovinocultura e Caprinocultura Conjuntura econômica, aspectos produtivos de 2017 e perspectivas para 2018**. Boletim do Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos. Sobral, CE, n. 2, dezembro de 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/>> Acesso em junho de 2020.

ESTRADA-PEÑA, A.; ACEDO, C. S.; QUÍLEZ, J.; DEL CACHO, E. A retrospective study of climatic suitability for the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in the Americas. **Global Ecology and Biogeography**, v. 14, n. 6, p. 565-573, 2005.

ESTRADA-PENA, A.; BOUATTOUR, A.; CAMICAS, J.; WALKER, A. Ticks of domestic animals in the Mediterranean region. **University of Zaragoza, Spain**, v. 131, 2004.

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

EWING, C. A.; RUMSEY, D. H.; LANGBERG, A. F.; SANDLER, S. G. Immunoprophylaxis using intravenous Rh immune globulin should be standard practice when selected D-negative patients are transfused with D-positive random donor platelets. **Immunohematology**, v. 14, n. 4, p. 133-137, 1998.

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

GARCIA, A. B. **diversidade genética de anaplasma Marginale em bovinos amostrados em Itú, Estado de São Paulo. 2020**. Dissertação. Universidade Estadual Paulista Faculdade De Ciências Agrárias E Veterinárias Câmpus de Jaboticabal. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/>> Acesso em 05 jan.

GARCIA, M. V.; ANDREOTTI, R.; REIS, F. A.; AGUIRRE, A. D. A. R.; BARROS, J. C.; MATIAS, J.; KOLLER, W. W. Contributions of the hair sheep breed Santa Ines as a

maintenance host for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in Brazil. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 515, 2014.

GAUNT, S. D.; BEALL, M. J.; STILLMAN, B. A.; LORENTZEN, L.; DINIZ, P. P. V. P.; CHANDRASHEKAR, R.; BREITSCHWERDT, E. B. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 33, 2010.

GOFF, W. L.; STILLER, D.; ROEDER, R. A.; JOHNSON, L. W.; FALK, D.; GORHAM, J. R.; MCGUIRE, T. C. Comparison of a DNA probe, complement-fixation and indirect immunofluorescence tests for diagnosing *Anaplasma marginale* in suspected carrier cattle. **Veterinary microbiology**, v. 24, n. 3-4, p. 381-390, 1990.

GONÇALVES, A. L.; LANA, R. P.; VIEIRA, R. A. M.; HENRIQUE, D. S.; MANCIO, A. B.; PEREIRA, J. C. Avaliação de sistemas de produção de caprinos leiteiros na região sudeste do Brasil. **Rev Bras Zootec.** v.37, p. 366-76, 2008;

GRØVA, L.; OLESEN, I.; STEINSHAMN, H.; STUEN, S. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection and effect on lamb growth. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 53, n. 1, p. 30, 2011.

HAMZAH, K. J.; HASSO, S. A. Molecular prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in sheep from Iraq. **Open veterinary journal**, v. 9, n. 3, p. 238–245, 2019.

HORNOK, S.; ELEK, V.; DE LA FUENTE, J.; NARANJO, V.; FARKAS, R. First serological and molecular evidence on the endemicity of *Anaplasma ovis* and *A. marginale* in Hungary. **Veterinary microbiology**, v. 122, n. 3-4, p. 316-322, 2007.

HUSEYIN, B. B.; SERKAN, B.; ONUR, K.; AHMET, H. U.; SELIN, H.; HASAN, E.; WILLIAM, W.; TULIN, K. Prevalence of tick-borne haemoparasites in small ruminants in Turkey and diagnostic sensitivity of single-PCR and RLB. **Parasit Vectors**, v. 10, n. 1, p. 211, 2017.

IBGE. Pesquisa Pecuária Municipal 2018. **Produção da Pecuária Municipal de 2018**. Disponível em: <biblioteca.ibge.gov.br >. Acesso em junho de 2020.

IBGE. **Tabela 3939 - Efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho**. 2019. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>>. Acesso em: 22 jun. 2020.

IMESC- Instituto Maranhense de Estudos Socioeconômicos e Cartográficos. **Regiões de Desenvolvimento do Estado do Maranhão: proposta avançada (2018)**. Disponível em: <<http://imesc.ma.gov.br/portal/Post/view/proposta/347>>. Acesso em 20 jun. 2020.

IWERIEBOR, B. C.; MMBAGA, E. J.; ADEGBORIOYE, A.; IGWARAN, A.; OBI, L. C.; OKOH, A. I. Genetic profiling for *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ticks collected in the Eastern Cape Province of South Africa. **BMC microbiology**, v. 17, n. 1, p. 45, 2017.

JIMÉNEZ OCAMPO, R.; VEGA Y MURGUÍA, C. A.; OVIEDO ORTEGA, N.; ROJAS RAMÍREZ, E. E.; GARCÍA ORTIZ, M. Á.; PRECIADO DE LA TORRE, J. F.; RODRÍGUEZ CAMARILLO, S. D. Diversidad genética de la región variable de los genes *msp1a* y *msp4* en cepas de *Anaplasma marginale* de México. **Revista mexicana de ciencias pecuarias**, v. 3, n. 3, p. 373-386, 2012.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology-Cambridge**, v. 129, p. S3, 2004.

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

KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. Diagnóstico parasitológico da tristeza parasitária bovina. In: **CURSO SOBRE CONTROLE DO CARRAPATO EM BOVINOS**, 1998, Campo Grande. Compilação dos trabalhos apresentados. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1998.

KHAN, A.; MITCHELL III, R. D.; NIAZ, S.; AYAZ, S.; KHATTAK, I.; NAEEM, H.; ZAMAN, M. A. Seroprevalence of *Anaplasma* spp. among sheep and goats in Charsadda District, Pakistan. **Small Ruminant Research**, v. 176, p. 5-10, 2019.

KOCAN K. M.; HALBUR T.; BLOUIN E. F.; ONET V.; DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA J. C.; SALIKI J. T. 2001. Immunization of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture. **Veterinary parasitology**, v. 102, n. 1-2, p. 151-161, 2001.

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

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

KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E.F.; GARCIA-GARCIA, J.C. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host–pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S285-S300, 2004.

KOH, F. X.; PANCHADCHARAM, C.; SITAM, F. T.; TAY, S. T. Molecular investigation of *Anaplasma* spp. in domestic and wildlife animals in Peninsular Malaysia. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 13, p. 141-147, 2018.

LACASTA, D.; FERRER, L. M.; SANZ, S.; LABANDA, R.; GONZÁLEZ, J. M.; BENITO, A. Á.; RAMOS, J. J. Anaplasmosis outbreak in lambs: First report causing carcass condemnation. **Animals**, v. 10, n. 10, p. 1851, 2020.

LEE, S. H.; PARK, S.; LEE, Y. S.; LEE, H. K.; DO HWANG, S. Diagnosis and molecular characteristics of human infections caused by *Anaplasma phagocytophilum* in South Korea. *Journal of Microbiology*, 56(11), 847-853.

LEIBY, David A.; GILL, Jennifer E. Transfusion-transmitted tick-borne infections: a cornucopia of threats. **Transfusion medicine reviews**, v. 18, n. 4, p. 293-306, 2004.

LI, H.; ZHENG Y. C.; MA, L.; JIA, N.; JIANG, B. G.; JIANG, R. R.; SONG, Y. D. Human infection with a novel tick-borne *Anaplasma* species in China: a surveillance study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 663-670, 2015.

LIU, Z.; MA, M.; WANG, Z.; WANG, J.; PENG, Y.; LI, Y.; YIN, H. Molecular survey and genetic identification of *Anaplasma* species in goats from central and southern China. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 2, p. 464-470, 2012.

MACHADO, R. Z.; TEIXEIRA, M. M. G.; RODRIGUES, A.C.; ANDRÉ, M.R.; GONÇALVES, L.R.; DA SILVA, J.B.; PEREIRA, C.L. Molecular diagnosis and genetic

diversity of tick-borne *Anaplasmataceae* agents infecting the African buffalo *Syncerus caffer* from Marrromeu Reserve in Mozambique. *Parasites & Vectors*, London, v. 9, n. 1, p. 454, 2016.

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

MAGGI, R. G.; KRÄMER, F.. A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. ***Parasites & vectors***, v. 12, n. 1, p. 145, 2019.

MASON, K. L.; GONZALEZ, M. V.; CHUNG, C.; MOUSEL, M. R.; WHITE, S. N.; TAYLOR, J. B.; SCOLES, G. A. Validation of an improved *Anaplasma* antibody competitive ELISA for detection of *Anaplasma ovis* antibody in domestic sheep. ***Journal of Veterinary Diagnostic Investigation***, v. 29, n. 5, p. 763-766, 2017.

MEDLOCK, J. M.; HANSFORD, K. M.; BORMANE, A.; DERDAKOVA, M.; ESTRADA-PEÑA, A.; GEORGE, J. C.; KAZIMIROVA, M. Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. ***Parasites & vectors***, v. 6, n. 1, p. 1, 2013.

MOLAD, T.; MAZUZ, M. L.; FLEIDEROVITZ, L.; FISH, L.; SAVITSKY, I.; KRIGEL, Y.; SHKAP, V. Molecular and serological detection of *A. centrale*-and *A. marginale*-infected cattle grazing within an endemic area. ***Veterinary microbiology***, v. 113, n. 1-2, p. 55-62, 2006.

MUNODZANA, D.; MCELWAIN, T. F.; KNOWLES, D. P.; PALMER, G. H. Conformational Dependence of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 5 Surface-Exposed B-Cell Epitopes. ***Infection and Immunity***, v. 66, n. 6, p. 2619-2624, 1998.

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

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

NELDER, M. P.; RUSSELL, C. B.; LINDSAY, L. R.; DIBERNARDO, A.; BRANDON, N. C.; PRITCHARD, J.; PATEL, S. N. Recent emergence of *Anaplasma phagocytophilum* in Ontario, Canada: early serological and entomological indicators. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 101, n. 6, p. 1249-1258, 2019.

OBAIDAT, M. M.; SALMAN, A. E. B. *Anaplasma* spp. in dairy ruminants in Jordan: high individual and herd-level seroprevalence and association with abortions. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 31, n. 3, p. 481-484, 2019.

OKAL, M. N.; ODHIAMBO, B. K.; OTIENO, P.; BARGUL, J. L.; MASIGA, D., VILLINGER, J.; KALAYOU, S. *Anaplasma* and *Theileria* Pathogens in Cattle of Lambwe Valley, Kenya: A Case for Pro-Active Surveillance in the Wildlife–Livestock Interface. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1830, 2020.

PALMER, G. H.; RURANGIRWA, F. R.; MCELWAIN, T. F. Strain Composition of the Ehrlichia *Anaplasma marginale* within Persistently Infected Cattle, a Mammalian Reservoir for Tick Transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 631-635, 2001.

PEIRCE, M. A.; PARSONS, N. J. *Babesia ugwidiensis*, a new species of avian piroplasm from Phalacrocoracidae in South Africa. **Parasite**, v. 19, n. 4, p. 375, 2012.

PENG, Y.; WANG, K.; ZHAO, S.; YAN, Y.; WANG, H.; JING, J.; NING, C. Detection and phylogenetic characterization of *Anaplasma capra*: an emerging pathogen in sheep and goats in China. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, p. 283, 2018.

POHL, A. E.; CABEZAS-CRUZ, A.; RIBEIRO, M. F. B.; SILVEIRA, J. A. G. D.; SILAGHI, C.; PFISTER, K.; PASSOS, L.M.F. Detection of genetic diversity of *Anaplasma marginale* isolates in Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, n. 1, p. 129-135, 2013.

POPOV, V. L.; HAN, V. C.; CHEN, S. M.; DUMLER, J. S.; FENG, H. M.; ANDREADIS, T. G.; WALKER, D. H. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. **Journal of medical microbiology**, v. 47, n. 3, p. 235-251, 1998.

POTGIETER, F. T.; STOLTSZ, WHO. Bovine anaplasmosis. **Infectious diseases of livestock with special reference to southern Africa**, v. 1, p. 351-370, 1994.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E.; AMARO-ESTRADA, I.; RODRÍGUEZ-CAMARILLO, S. D. *Anaplasma marginale*: diversity, virulence, and vaccine landscape through a genomics approach. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

RAMOS, R. A.; RAMOS, C. A.; ARAÚJO, F. R.; MELO, E. S.; TEMBUE, A. A.; FAUSTINO, M. A.; SOARES, C. O. Detecção de anticorpos para *Anaplasma* sp. em pequenos ruminantes no semi-árido do estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 2, p. 115-117, 2008.

RAR, V.; GOLOVLJOVA, I.. *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and “*Candidatus Neoehrlichia*” bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 8, p. 1842-1861, 2011.

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

RIKIHISA, Yasuko. Molecular events involved in cellular invasion by *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum*. **Veterinary parasitology**, v. 167, n. 2-4, p. 155-166, 2010.

RINGO, A. E.; ABOGE, G. O.; MOUMOUNI, P. F. A.; LEE, S. H.; JIRAPATTHARASATE, C.; LIU, M.; GALON, E. M. MOLECULAR detection and genetic characterisation of pathogenic *Theileria*, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species among apparently healthy sheep in central and western Kenya. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 86, n. 1, p. 1-8, 2019.

RISTIC, M.; CARSON, C. A. Methods of immunoprophylaxis against bovine anaplasmosis with emphasis on use of the attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. In: **Immunity to blood parasites of animals and man**. Springer, Boston, MA, 1977. p. 151-188.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SHABANA, I. I.; ALHADLAG, N. M.; ZARAKET, H. Diagnostic tools of caprine and ovine anaplasmosis: a direct comparative study. **BMC veterinary research**, v. 14, n. 1, p. 165, 2018.

SHARMA, A.; SINGLA, L. D.; KAUR, P.; BAL, M. S. PCR and ELISA vis-à-vis microscopy for detection of bovine anaplasmosis: a study on associated risk of an upcoming problem in North India. **The Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.

SILAGHI, C.; SANTOS, A. S.; GOMES, J.; CHRISTOVA, I.; MATEI, I. A.; WALDER, G.; OTEO, J. A. Guidelines for the direct detection of *Anaplasma* spp. in diagnosis and epidemiological studies. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 1, p. 12-22, 2017.

SILI, G.; BYARUHANGA, C.; HORAK, I.; STEYN, H.; CHAISI, M.; OOSTHUIZEN, M. C.; NEVES, L. Ticks and tick-borne pathogens infecting livestock and dogs in Tchicala-Tcholoanga, Huambo Province, Angola. **Parasitology Research**, p. 1-6, 202

SILVA, J. B.; GONÇALVES, L. R.; DE MELLO VARANI, A.; 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**, Amsterdam, v. 6, n. 4, p. 499-507, 2015.

SILVA, J. V da. **Caracterização dos sistemas de produção de ovinos e caprinos no Estado do Maranhão. 2011. 110p.** 2016. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado)–Universidade Federal da Paraíba, Areia. Disponível em:< <http://www.cca.ufpb.br/ppgz/>.> Acesso em: 03 nov.

SILVA, N. B.; TAUS, N. S.; JOHNSON, W. C.; MIRA, A.; SCHNITTGER, L.; VALENTE, J. D.; VIDOTTO, O.; MASTERSON, H. E.; VIEIRA, T. S. W.; UETI, M. W.; VIEIRA, R. F. First report of *Anaplasma marginale* infection in goats, Brazil. **PloS one**, v. 13, n. 8, p. e0202140, 2018.

SOUZA, F. D. A. L.; LIARTE, A. D. S. C.; CASTRO, K. N. D. C.; BESERRA, E. E. A.; BERNARDI, J. C. M.; SOUSA, G. V. D.; SILVA, S. M. M. D. S. Dynamics of natural infection by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in dairy cattle from an enzootic instability area in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, n. AHEAD, p. 0-0, 2018.

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

STRIK, N. I.; ALLEMAN, A. R.; BARBET, A. F.; SORENSON, H. L.; WAMSLEY, H. L.; GASCHEN, F. P.; KNOWLES, D. P. Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* major surface protein 5 and the extent of its cross-reactivity with *A. marginale*. **Clinical and vaccine immunology**, v. 14, n. 3, p. 262-268, 2007.

STUEN, S. *Anaplasma phagocytophilum*-the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. **Veterinary research communications**, v. 31, n. 1, p. 79-84, 2007.

STUEN, S.; BRÅTEN, M.; BERGSTRÖM, K.; BÅRDSSEN, K. Cyclic variation in lambs infected with *Anaplasma phagocytophilum*. 2008.

STUEN, S.; GRANQUIST, E. G.; SILAGHI, C. *Anaplasma phagocytophilum*—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, p. 31, 2013.

STUEN, S.; GRØVA, L.; GRANQUIST, E. G.; SANDSTEDT, K.; OLESEN, I.; STEINSHAMN, H. A comparative study of clinical manifestations, haematological and serological responses after experimental infection with *Anaplasma phagocytophilum* in two Norwegian sheep breeds. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 53, n. 1, p. 1-8, 2011.

SUASSUNABEZERRA, A. D.; AHID, S. M. M.; DA SILVA VIEIRA, L.; SOARES, H. S. Ectoparasitos em caprinos e ovinos no município de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 110-116, 2010.

TATE, C. M.; HOWERTH, E. W.; MEAD, D. G.; DUGAN, V. G.; LUTTRELL, M. P.; SAHORA, A. I.; YABSLEY, M. J. *Anaplasma odocoilei* sp. nov.(family *Anaplasmataceae*) from white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Ticks and tick-borne diseases**, v. 4, n. 1-2, p. 110-119, 2013.

TEIXEIRA, W. C.; SANTOS, H. P.; DA SILVA, J. C. R.; RIZZO, H.; MARVULO, M. F. V.; DE CASTRO, R. S. Perfil zoonosológico dos rebanhos caprinos e ovinos em três mesorregiões do estado do Maranhão, Brasil. **Acta Veterinaria Brasílica**, v. 9, n. 1, p. 34-42, 2015.

THOMAS, RACHAEL J.; DUMLER, J. STEPHEN; CARLYON, JASON A. Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 7, n. 6, p. 709-722, 2009.

TIBBITTS, T.; GOFF, W.; FOREYT, W.; STILLER, D. Susceptibility of two Rocky Mountain bighorn sheep to experimental infection with *Anaplasma ovis*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 28, n. 1, p. 125-129, 1992.

TORINA, A.; AGNONE, A.; BLANDA, V.; ALONGI, A.; D'AGOSTINO, R.; CARACAPPA, S.; MARINO, A. M. F.; DI MARCO V.; DE LA FUENTE, J. Development and validation of two PCR tests for the detection of and differentiation between *Anaplasma ovis* and *Anaplasma marginale*. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 3, n. 5-6, p. 283-287, 2012.

UETI, M. W.; PALMER, G. H.; KAPMEYER, L. S.; STATDFIELD, M.; SCOLES, G. A.; KNOWLES, D. P. Ability of the vector tick *Boophilus microplus* to acquire and transmit *Babesia equi* following feeding on chronically infected horses with low-level parasitemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3755-3759, 2005.

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

WANG, Z.; YANG, J.; NIU, Q.; BRAYTON, K. A.; LUO, J.; LIU, G.; LIU, Z. Identification of *Anaplasma ovis* appendage-associated protein (AAP) for development of an indirect ELISA and its application. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2017.

WOLDEHIWET, Z. *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants in Europe. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, n. 1, p. 446-460, 2006.

WOLDEHIWET, Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. **Veterinary parasitology**, v. 167, n. 2-4, p. 108-122, 2010.

YANG, J.; LI, Y.; LIU, Z.; LIU, J.; NIU, Q.; REN, Q.; YIN, H. Molecular detection and characterization of *Anaplasma* spp. in sheep and cattle from Xinjiang, northwest China. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 108, 2015.

YANG, J.; LIU, Z.; NIU, Q.; LIU, J.; HAN, R.; LIU, G.; YIN, H. Molecular survey and characterization of a novel *Anaplasma* species closely related to *Anaplasma capra* in ticks, northwestern China. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2016.

YASINI, S. P.; KHAKI, Z.; RAHBARI, S.; KAZEMI, B.; AMOLI, J. S.; GHARABAGHI, A.; JALALI, S. M. Hematologic and clinical aspects of experimental ovine anaplasmosis caused by *Anaplasma ovis* in Iran. **Iranian journal of parasitology**, v. 7, n. 4, p. 91, 2012.

YOUSEFI, A.; RAHBARI, S.; SHAYAN, P.; SADEGHI-DEHKORDI, Z.; BAHONAR, A. Molecular detection of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma ovis* in sheep and goat in west highland pasture of Iran. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 5, p. 455-459, 2017.

ZAMANTUNGWA, T. H. K.; CATANESE, H. N.; LIESCHING, N.; PAIDASHE, H.; COLLINS, N. E.; CHAISI, M. E.; GEBREMEDHIN, A. H.; OOSTHUIZEN, M. C.; BRAYTON, K. A. Characterization of *Anaplasma marginale* subsp. *centrale* strains by use of msp1aS genotyping reveals a wildlife reservoir. **Journal of clinical microbiology**, v. 54, n. 10, p. 2503-2512, 2016.

ZAUGG, J. L.; STILLER, D.; COAN, M. E.; LINCOLN, S. D. Transmission of *Anaplasma marginale* Theiler by males of *Dermacentor andersoni* Stiles fed on an Idaho field-infected, chronic carrier cow. **American journal of veterinary research**, v. 47, n. 10, p. 2269-2271, 1986.

ZHANG, Y.; LV, Y.; ZHANG, F.; ZHANG, W.; WANG, J.; CUI, Y.; NING, C. Molecular and phylogenetic analysis of *Anaplasma* spp. in sheep and goats from six provinces of China. **Journal of veterinary science**, v. 17, n. 4, p. 523-529, 2016.

ZHUANG, Y.; FUTSE, J. E.; BROWN, W. C.; BRAYTON, K. A.; PALMER, G. H. Maintenance of antibody to pathogen epitopes generated by segmental gene conversion is highly dynamic during long-term persistent infection. **Infection and immunity**, v. 75, n. 11, p. 5185-5190, 2007.

ZOBBA, R.; ANFOSSI, A. G.; PARPAGLIA, M. L. P.; DORE, G. M.; CHESSA, B.; SPEZZIGU, A.; ROCCA, S.; VISCO, S.; PITTAU, M.; ALBERTI, A. Molecular investigation and phylogeny of *Anaplasma* spp. in Mediterranean ruminants reveal the presence of neutrophil-tropic strains closely related to *A. platys*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 271-280, 2014.7