

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

DINÂMICA DA INFECÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE *ANAPLASMA MARGINALE* DE ORIGEM CONGÊNITA EM BEZERRAS NATURALMENTE INFECTADAS

DOUGLAS RODRIGUES DO NASCIMENTO GONZAGA

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2024

Douglas Rodrigues do Nascimento Gonzaga

DINÂMICA DA INFECÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE *ANAPLASMA MARGINALE* DE ORIGEM CONGÊNITA EM BEZERRAS NATURALMENTE INFECTADAS

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinária

Orientador: Elias Jorge Facury Filho
Coorientadores: Camila de Valgas e Bastos
Tiago Facury Moreira

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2024**

G643d Gonzaga, Douglas Rodrigues do Nascimento, 1992-
Dinâmica da infecção e análise filogenética de *Anaplasma Marginale* de origem congênita em Bezerras naturalmente infectadas/ Douglas Rodrigues do Nascimento Gonzaga.-2024.
98f: il

Orientador: Elias Jorge Facury Filho
Coorientadores: Camila de Valgas e Bastos
Tiago Facury Moreira

Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinária.
Bibliografia: f. 83 – 93
Anexos: f. 94 – 98.

1. Bovino – Doenças - Teses – 2. Bezerra – Doenças - Teses – 3. Anaplasmoses - Teses – I. Facury Filho, Elias Jorge – II. Bastos, Camila de Valgas e – III. Moreira, Tiago Facury – IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V. Título.

CDD – 639.089 4

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ATA DE DEFESA DE TESE - DOUGLAS RODRIGUES DO NASCIMENTO GONZAGA

Às 09:00 horas do dia 18 de março de 2024, reuniu-se, na Escola de Veterinária UFMG a Comissão Examinadora de Tese, para Julgar em exame final, a defesa da tese intitulada:

“DINÂMICA DA INFECÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE ANAPLASMA MARGINALE DE ORIGEM CONGÊNITA EM BEZERRAS NATURALMENTE INFECTADAS”

como requisito final para a obtenção do Grau de Doutor em Ciência Animal, área de concentração em MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Elias Jorge Facury Filho**, após informar aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Tese, passou a palavra ao candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da Tese, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

Examinador / Prof. (a) / Dr. (a)	Aprovado(a)	Reprovado(a)
Elias Jorge Facury Filho	x	
Antonio Ultimo de Carvalho	x	
Lorena Lopes Ferreira	x	
DANIEL SOBREIRA RODRIGUES	x	
Julia Gomes de Carvalho Jorge	x	

Face os resultados, o (a) aluno (a) foi considerado(a):

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Para concluir o Doutorado, o(a) candidato(a) deverá entregar a versão final da Tese, acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de aceite de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado do Curso. Para tanto, terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo(a) Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 18 de março de 2024.

Assinatura dos membros da banca:



Documento assinado eletronicamente por **Elias Jorge Facury Filho, Professor do Magistério Superior**, em 27/03/2024, às 16:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lorena Lopes Ferreira, Professora do Magistério Superior**, em 28/03/2024, às 08:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Julia Gomes de Carvalho Jorge, Usuário Externo**, em 31/03/2024, às 09:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Sobreira Rodrigues, Usuário Externo**, em 01/04/2024, às 11:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Ultimo de Carvalho, Professor do Magistério Superior**, em 01/04/2024, às 15:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3129287** e o código CRC **DA9A93F0**.

AGRADECIMENTOS

Esta conquista é o resultado de um esforço coletivo e de uma jornada repleta de desafios e aprendizados. Gostaria de expressar meus agradecimentos a cada um que desempenhou um papel fundamental em minha trajetória acadêmica.

Primeiramente, agradeço a Deus por sua orientação constante, força inspiradora e graça divina que me sustentaram nos momentos mais desafiadores. Sua luz iluminou meu caminho e fortaleceu minha determinação ao longo de toda a jornada acadêmica.

Aos meus pais, agradeço por serem a fonte inesgotável de amor, apoio e encorajamento. Seu sacrifício e dedicação foram o alicerce sobre o qual construí meu percurso acadêmico. A cada desafio, suas palavras de incentivo foram o impulso que me fez ir a diante.

À minha querida família, amigos e colegas, expresso minha profunda gratidão. Suas palavras de estímulo, paciência e compreensão foram cruciais em cada etapa desta jornada.

Ao Arthur por estar sendo apoio constante, companheirismo e por ter colaborado em todos os aspectos pessoais e profissionais.

Aos meus estagiários, em especial Guilherme Meneses e Luís Ruas, cuja dedicação e entusiasmo contribuíram para o desenvolvimento de minha pesquisa, agradeço sinceramente. Seu trabalho incansável e contribuições valiosas não passaram despercebidas e foram fundamentais para o sucesso deste projeto.

Aos meus padrinhos Bernardo e Ana Vasconcellos, por todo apoio, carinho e companheirismo.

À Escola de Veterinária que me acolheu, proporcionando um ambiente de aprendizado enriquecedor, agradeço por recursos, oportunidades e um corpo docente exemplar

Aos orientadores, Elias Jorge Facury Filho, Camila Bastos e Tiago Facury, expresso minha profunda gratidão.

Ao CNPq pelo financiamento e concessão de bolsa.

Neste momento de conclusão, reconheço que esta jornada não foi apenas uma busca acadêmica, mas também uma jornada de crescimento pessoal.

“Ama-se mais o que se conquista com esforço”

Benjamin Disraeli

RESUMO

A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é um conjunto de doenças complexas em bovinos causadas principalmente por protozoários e riquetsias, resultando em sérias perdas econômicas na pecuária. Essas perdas incluem altas taxas de mortalidade, redução na produção de leite, abortos, atraso no desenvolvimento e gastos extras com medicamentos. A Anaplasmoze bovina, causada principalmente por *Anaplasma marginale*, é uma doença infecciosa predominante em regiões tropicais, causando prejuízos econômicos significativos globalmente. A transmissão de *A. marginale* está associada a carrapatos, moscas, mosquitos e fômites contaminados, e pela via congênita, que estudos recentes sugerem impactos significativos nos rebanhos. No Brasil e em outras regiões, estudos revelaram frequências consideráveis de transmissão vertical de *A. marginale* que pode resultar em abortos, nascimento de bezerras infectadas ou assintomáticas, bem como casos de Anaplasmoze congênita. Acompanhou-se 74 bezerras Holandesas, divididas em grupos positivos (G1) e negativos (G2) para *A. marginale* no nascimento. A análise revelou uma frequência de transmissão congênita (24,4%) e não foram observadas diferenças na dinâmica da Anaplasmoze na reinfecção. No entanto, o grupo infectado necessitou de menos tratamentos e apresentou menor riquetsemia, sugerindo uma resposta diferenciada à doença. Três novas repetições em tandem foram descritas nas amostras de origem congênita. Esses resultados contribuem para a compreensão da dinâmica da doença e podem guiar estratégias de manejo e controle mais eficazes.

Palavras-chave: Anaplasmoze; bovinos; transmissão vertical; bezerras; hemoparasitoses.

ABSTRACT

Bovine Tick Fever (BTF) is a complex set of diseases in cattle caused mainly by protozoa and rickettsia, resulting in serious economic losses in livestock. These losses include high mortality rates, reduced milk production, abortions, delayed development, and extra expenses on medications. Bovine Anaplasmosis, primarily caused by *Anaplasma marginale*, is a predominant infectious disease in tropical regions, causing significant economic losses globally. The transmission of *A. marginale* is associated with ticks, flies, mosquitoes, contaminated fomites, and congenital transmission, which recent studies suggest have significant impacts on herds. In Brazil and other regions, studies have revealed considerable frequencies of vertical transmission of *A. marginale*, which can result in abortions, birth of infected or asymptomatic calves, as well as cases of congenital Anaplasmosis. Seventy-four Dutch heifer calves were monitored, divided into positive (G1) and negative (G2) groups for *A. marginale* at birth. The analysis revealed a congenital transmission frequency of 24.4%, and no differences were observed in the dynamics of Anaplasmosis upon reinfection. However, the infected group required fewer treatments and exhibited lower rickettsia levels, suggesting a differentiated response to the disease. Three new tandem repeats were described in congenital origin samples. These results contribute to understanding the disease dynamics and can guide more effective management and control strategies.

Keywords: Anaplasmosis; cattle; vertical transmission; calves; hemoparasitoses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Localização do município de Sete Lagoas, Mesorregião de Belo Horizonte, Minas Gerais.	46
Figura 2 — Visão interna de galpão do tipo <i>compost barn</i> , com bezerras separadas em grupos de acordo com peso.	46
Figura 3 — Frequência de coletas e avaliações em bezerras da raça Holandesa do nascimento até 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para <i>A. marginale</i> ao nascimento e G2 – bezerras negativas)	49
Figura 4 — Frequência de bezerras da raça Holandesa nPCR positivas para <i>A. marginale</i> do nascimento até 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para <i>A. marginale</i> ao nascimento e G2 – bezerras negativas).....	61
Figura 5 — Valores médios da riquetsemia de bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para <i>A. marginale</i> ao nascimento e G2 – bezerras negativas)	64
Figura 6 — Valores médios da riquetsemia de bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para <i>A. marginale</i> ao nascimento e G2 – bezerras negativas)	65
Figura 7 — Valores médios do volume globular de bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para <i>A. marginale</i> ao nascimento e G2 – bezerras negativas).....	69
Figura 8 — Valores de riquetsemia e curva do volume globular de bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para <i>A. marginale</i> ao nascimento e G2 – bezerras negativas)	70
Figura 9 — Valores médios da temperatura retal de bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para <i>A. marginale</i> ao nascimento e G2 – bezerras negativas).....	71
Figura 10 — Valores médios do tratamento para Anaplasmosose em bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para <i>A. marginale</i> ao nascimento e G2 – bezerras negativas)	72
Figura 11 — Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) de cepas de <i>A. marginale</i> com base em sequências parciais de aminoácidos de MSP1 α	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Distribuição e características dos grupos amostrais para avaliação do comportamento da anaplasmose de origem de infecção congênita em bezerras Holandês.....	47
Tabela 2 — Sequência de iniciadores utilizados e os respectivos produtos obtidos para a primeira e segunda reação para diagnóstico de <i>A. marginale</i>	50
Tabela 3 — Programa utilizado para realização de nPCR para identificação de <i>A. marginale</i>	50
Tabela 4 — Valores de densidade óptica dos soros controles e ponto de corte utilizados em teste de ELISA.....	52
Tabela 5 — Valores de temperatura retal, hematócrito, riquetsemia e recuperação utilizados como base para criação de Escore de Grau de severidade da Anaplasmose.	53
Tabela 6 — Interpretação da Severidade da Anaplasmose bovina, segundo grau de Escore de classificação proposto por Silva (2017).....	53
Tabela 7 — Sequência de iniciadores utilizados e os respectivos produtos obtidos para a reação de diagnóstico de <i>A. marginale</i>	54
Tabela 8 — Programa utilizado para realização de PCR para identificação de <i>A. marginale</i>	54
Tabela 9 — Frequência transmissão congênita de <i>A. marginale</i> em bezerras da raça Holandesa	58
Tabela 10 — Frequência de transmissão congênita de <i>A. marginale</i> em bovinos descrita na literatura científica.....	58
Tabela 11 — Frequência de bezerras da raça Holandesa nPCR positivas para <i>A. marginale</i> do nascimento até 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para <i>A. marginale</i> ao nascimento e G2 – bezerras negativas).....	60
Tabela 12 — Frequência de esfregaços sanguíneos positivos de bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para <i>A. marginale</i> ao nascimento e G2 – bezerras negativas)	63
Tabela 13 — Valores médios da riquetsemia de bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para <i>A. marginale</i> ao nascimento e G2 – bezerras negativas).....	63
Tabela 14 — Valores alvos para a avaliação da transferência de imunidade passiva (TIP) e percentual de bezerras da raça Holandesa, enquadradas de acordo com os valores de Proteína Total às 48 horas de vida	66

Tabela 15 — Frequência de bezerras da raça Holandesa positivas para <i>A. marginale</i> no teste de ELISA do nascimento até 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para <i>A. marginale</i> ao nascimento e G2 – bezerras negativas).....	67
Tabela 16 — Número de tratamentos para Anaplasmosose em bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para <i>A. marginale</i> ao nascimento e G2 – bezerras negativas)	72
Tabela 17 — Intensidade clínica da Anaplasmosose em bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para <i>A. marginale</i> ao nascimento e G2 – bezerras negativas).....	74
Tabela 18 — Doenças diagnosticadas em bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida.	74
Tabela 19 — Dinâmica da Anaplasmosose em bezerras holandesas entre 4 e 24 semanas de idade de acordo com sua condição em relação a anaplasmosose ao nascimento. (G1- bezerras nascidas com PCR positivo para <i>Anaplasma marginale</i> e G2- bezerras negativas ao nascimento).....	75
Tabela 20 — Sequência de repetições em Tandem de MSP1 α em amostras congênicas de <i>Anaplasma marginale</i> em bezerras da raça Holandesa.....	76
Tabela 21 — Estrutura das repetições em tandem de mps1 α encontradas nas cepas de <i>A. marginale</i> de origem congênita em bezerras da raça Holandesa.	76
Tabela 22 — Valores médios de volume globular, riquetsemia, temperatura retal, frequência de anemia e número de tratamento para Anaplasmosose em bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para <i>A. marginale</i> ao nascimento e G2 – bezerras negativas)	94
Tabela 23 — Frequência de anemia em bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para <i>A. marginale</i> ao nascimento e G2 – bezerras negativas)	95

LISTA DE ABREVIATURAS

°C = Grau Celcius

µL = Microlitro

ATP = adenosina trifosfato

cELISA = Ensaio imunabsorvente ligado a enzimas competitivo

CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais

DNA = Ácido desoxirribonucleico

EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético

G = Grupo

IDE8 = Linhagem de células embrionárias de Ixodes scapularis

IgG = Imunoglobulina da classe G

mL = Mililitro

mM = milimolar

MSP = Major Surface Protein (Proteína principal de superfície)

nPCR = Reação em cadeia da polimerase tipo nested

pb = Pares de base

PBS = Phosphate Buffered Saline (Solução de tampão fosfato)

PCR = Polimerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

RIFI = Reação de imunofluorescência indireta

RNA = Ácido ribonucleico

TAE = Tampão Tris-Acetato

TPB = Tristeza parasitária bovina

UFMG = Universidade Federal de Minas Gerais

VG = Volume globular, hematócrito

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 HIPÓTESE	16
3 OBJETIVOS	17
3.1 Geral:.....	17
3.2 Específicos:	17
4 CAPÍTULO I — REVISÃO DE LITERATURA	18
4.1 ANAPLASMOSE BOVINA	18
4.2 DISTRIBUIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DA ANAPLASMOSE BOVINA	22
4.2.1 Prevalência e Distribuição Global.....	24
4.2.2 Anaplasnose no Brasil.....	25
4.3 RESPOSTA IMUNE NA ANAPLASMOSE BOVINA	27
4.3.1 Imunidade passiva.....	32
4.4 EPIDEMIOLOGIA DA TRANSMISSÃO VERTICAL DO <i>A. MARGINALE</i>	32
4.5 DIAGNÓSTICO E TIPIFICAÇÃO DE <i>A. MARGINALE</i>	37
4.5.1 Diagnóstico molecular de <i>A. marginale</i>	37
4.5.1.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	37
4.5.1.2 Genotipagem e tipificação	39
4.5.1.3 Amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP)	40
4.5.2 Diagnóstico direto.....	40
4.5.3 Diagnóstico indireto	41
4.5.3.1 Resposta imunológica e proteínas de fase aguda.....	41
4.5.3.2 ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática).....	42
4.5.3.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	43
4.5.3.4 Fixação do complemento	43
4.5.3.5 Técnicas de Aglutinação	43
5 CAPÍTULO II — EXPERIMENTO	45
5.1 MATERIAL E MÉTODOS	45
5.1.1 Considerações éticas	45
5.1.2 Local e período.....	45
5.1.3. Animais e grupos experimentais	47
5.1.3.1 Cálculo do tamanho da amostra.....	47
5.1.4 Manejo e coleta de materiais.....	48

5.1.5 Exames laboratoriais	49
5.1.5.1 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e Ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA).....	49
5.1.5.2 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)	51
5.1.5.3 Exames de esfregaço sanguíneo e microhematócrito.....	52
5.1.6 Resposta clínica de bezerras frente a reinfeção natural e tratamento.....	52
5.1.7 Avaliação clínica de bezerras com Anaplasmosose	53
5.1.8 Ocorrências de saúde	54
5.1.9 Tipificação dos isolados responsáveis pela infecção congênita.....	54
5.1.9.1 Alinhamento e análise filogenética	55
5.1.10 Análises estatísticas	56
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
6.1 Frequência de transmissão congênita.....	58
6.2 Dinâmica da infecção através de técnicas moleculares e esfregaço sanguíneo.	60
6.3 Comportamento da resposta imune	66
6.4 Ocorrência e intensidade dos casos clínicos de Anaplasmosose	68
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
8 CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS.....	83
ANEXOS	94

1 INTRODUÇÃO

A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é um complexo de doenças causadas principalmente por protozoários e rickettsias (De Vos, 1992). Essa condição resulta em graves perdas econômicas na pecuária, incluindo altas taxas de mortalidade, redução na produção de leite, abortos durante a fase aguda da doença, atraso no desenvolvimento ponderal e gastos adicionais com medicamentos (Vidal, 2000).

As principais espécies envolvidas na TPB são *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* (agentes da Babesiose bovina) e *Anaplasma marginale* (principal agente da Anaplasmosse bovina) (Kessler, 2001). A Anaplasmosse bovina, causada principalmente pelo patógeno intracelular obrigatório *A. marginale*, é uma doença infectocontagiosa predominante em regiões tropicais, gerando prejuízos econômicos em todo o mundo (Vidal, 2000)

A transmissão de *A. marginale* está associada à presença de carrapatos, considerados vetores biológicos, além de vetores mecânicos, como moscas e mosquitos, e fômites contaminados (revisado por Kocan *et al.*, 2010). Embora a transmissão vertical (ou transplacentária) de *A. marginale* tenha sido considerada de pouca importância epidemiológica, estudos sugerem que ela pode ter um impacto significativo nos rebanhos (Ribeiro *et al.*, 2003).

No Brasil, pesquisas como a de Meneses (2013) revelaram uma frequência média de 10% de bezerros infectados por transmissão vertical. Resultados semelhantes foram observados em outras regiões do mundo, como na África do Sul (Potgieter; Van Rensburg, 1987). Além disso, estudos conduzidos por Coelho (2022) relataram uma frequência de 41,6% de transmissão vertical em bovinos mestiços ½ Angus na região de Minas Gerais.

Animais que sobrevivem à fase aguda da Anaplasmosse desenvolvem infecções persistentes, funcionando como reservatórios de sangue infectado para os vetores biológicos e mecânicos, além de desempenharem um papel importante na transmissão vertical (Kocan *et al.*, 2010). A transmissão vertical ocorre frequentemente em vacas com infecção crônica, resultando em aborto ou nascimento de bezerros infectados (Ribeiro *et al.*, 1995).

Observações de campo, como as descritas por Grau *et al.*, (2013), que avaliaram a transmissão transplacentária de *A. marginale* em vacas cronicamente infectadas, sem histórico de Anaplasmosse aguda durante a gestação, revelaram uma

frequência de 10,5% de resultados positivos ao nascimento no teste de PCR. Outros estudos relatam casos de bezerros que nascem com Anaplasmosse congênita e morrem rapidamente. Adicionalmente, há relatos de bezerros que nascem com baixa riquetsemia e desenvolvem a Anaplasmosse, mas respondem ao tratamento com antibióticos (Carvalho, Júlia - comunicação pessoal, 2024). Além disso, frequentemente são observadas bezerras que nascem como portadoras assintomáticas, as quais constituem o principal objeto de estudo desta pesquisa.

Compreender as formas de transmissão é fundamental para estabelecer práticas de manejo que reduzam a severidade ou a ocorrência dessas doenças nas propriedades. O acompanhamento imunológico e clínico dos bezerros infectados por *A. marginale* de origem congênita é essencial para avaliar se a transmissão congênita pode beneficiar esses animais frente a novas infecções.

2 HIPÓTESE

Bezerras infectadas congenitamente por *Anaplasma marginale* apresentam resposta imune e comportamento frente a reinfeções diferentes de bezerras negativas ao nascimento.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

Avaliar a dinâmica da Anaplasmosose em bezerras naturalmente infectadas por *A. marginale* pela via congênita.

3.2 Específicos:

Este trabalho tem como objetivos específicos avaliar os seguintes parâmetros em bezerras naturalmente infectadas por *A. marginale* pela via congênita:

- Frequência de transmissão congênita,
- Dinâmica da infecção através de técnicas moleculares e esfregaço sanguíneo.
- Comportamento da resposta imune.
- Ocorrência e intensidade dos casos clínicos de anaplasmosose.
- Tipificação dos isolados de *A. marginale* de origem congênita e análise filogenética

4 CAPÍTULO I — REVISÃO DE LITERATURA

4.1 ANAPLASMOSE BOVINA

A Anaplasmosse é uma doença comumente encontrada em bovinos, sendo causada por uma riquetsia gram-negativa que se reproduz dentro dos glóbulos vermelhos do sangue. Sua propagação ocorre por meio de transmissão biológica, mecânica e transplacentária. Embora seja mais prevalente em regiões de clima tropical e subtropical, também pode ser observada em áreas de clima temperado. Essa enfermidade é endêmica em várias partes do mundo, incluindo regiões da África, Ásia, Europa (especialmente países do Mediterrâneo), sul dos Estados Unidos, bem como em muitos países da América Central e do Sul, com exceção de áreas desérticas e de altitudes elevadas (revisado por Kocan *et al.*, 2010).

A Anaplasmosse representa uma das principais limitações para a pecuária em várias nações (Battilani *et al.*, 2017). A primeira descrição documentada da infecção por *A. marginale* remonta a 1910, quando Arnold Theiler observou "pontos marginais" em eritrócitos de gado sul-africano, ocasionando a doença que ele denominou de "mal da bile". Relatos semelhantes foram feitos por Salmon e Smith em 1896, descrevendo pontos em esfregaços de sangue de bovinos como estruturas minúsculas e azuladas localizadas na borda dos corpúsculos. Essas descobertas pioneiras estabeleceram as bases para a compreensão posterior da anaplasmosse e de seu agente causador, *A. marginale*.

As síndromes clínicas da anaplasmosse são classificadas em superaguda, aguda e crônica, conforme descrito por Vidotto e Marana (2001). Os sinais clínicos característicos incluem anemia variando de discreta a intensa, icterícia sem hemoglobinemia e hemoglobinúria, febre, perda de apetite e de peso, desidratação, aborto e letargia (Souza *et al.*, 2001; Kocan *et al.*, 2003).

A rápida multiplicação do agente patogênico resulta em intensa hemocaterese, tornando a bile espessa, grumosa e amarelada e pode levar à icterícia dos tecidos (Souza *et al.*, 2000). Geralmente, há uma queda no volume globular de 30 a 50%, com a anemia se agravando após o estágio agudo da doença (Brown, 2012; Radostits *et al.*, 2016).

Sintomas como fraqueza e letargia podem surgir em casos de anemias graves, que podem se assemelhar a problemas respiratórios, já que o animal precisa respirar mais rapidamente e profundamente para compensar a deficiência na oxigenação do

sangue (Feitosa, 2008). Em inoculações experimentais, notou-se a ocorrência de acidose metabólica, indicada pela diminuição do pH sanguíneo, diminuição da pCO₂, redução dos níveis de bicarbonato e do excesso de base, assim como aumento compensatório da frequência respiratória em bezerros como resultado da anemia (Coelho, 2007).

A presença de febre e variações na temperatura é comumente relatada como um sinal clínico frequente na Anaplasmosse, especialmente durante o período de aumento da parasitemia, embora sua manifestação não seja uniforme em todos os casos (Richey, 1993). Por isso, muitas propriedades no Brasil realizam o monitoramento do rebanho aferindo semanalmente a temperatura dos animais em fase de recria e realizando esfregaço sanguíneo dos indivíduos que apresentaram hipertermia. O aumento na temperatura é um bom indicador de uma possível infecção por *A. marginale*, pois o pico de parasitemia está associado ao aumento de temperatura (Coelho, 2007).

A transmissão de *A. marginale*, a principal espécie da família *Anaplasmataceae* que afeta os bovinos no Brasil, ocorre por meio de diversos mecanismos. Biologicamente, é realizada pelo carrapato *Rhipicephalus microplus* e mecanicamente por moscas hematófagas (Guglielmone, 1995). Além disso, há a possibilidade de transmissão por fômites contaminados, conforme destacado por Kocan *et al.* (2003). Registros de transmissão vertical também existem na literatura (Passos; Lima, 1984; Ribeiro *et al.*, 1995; Benesi *et al.*, 1999), cuja relevância ainda não está completamente esclarecida, mas pode interferir na epidemiologia da doença em determinadas regiões e causar perdas significativas nos rebanhos.

A transmissão mecânica, por sua vez, ocorre quando bovinos são picados por insetos hematófagos como mutucas (tabanídeos), mosca-dos-estábulos (*Stomoxys calcitrans*) e mosca-do-chifre (*Haematobia irritans*), ou entram em contato com objetos contaminados com sangue parasitado, como agulhas, brincos de identificação, tatuagens, anéis nasais e instrumentos cirúrgicos (Kocan *et al.* 2003). Essa forma de transmissão é uma das principais rotas de transmissão da Anaplasmosse, onde as hemácias infectadas são transferidas para os bovinos suscetíveis sem a etapa de multiplicação no vetor. Isso se torna um meio de transmissão significativo, especialmente em áreas onde a população de carrapatos não se estabelece adequadamente, como em confinamentos.

A transmissão biológica envolve a interação dos carrapatos em um relacionamento de parasitismo com os bovinos, resultando na infecção dos bovinos pela ingestão de eritrócitos infectados pela riquetsia. Esse método de transmissão pode ocorrer de três maneiras diferentes: durante a troca de estágios (transestadial), dentro do mesmo estágio (intraestadial) e por meio dos ovos (transovariana) (de la Fourniere *et al.*, 2023). A primeira ocorre durante a transição de ninfa para fase adulta do carrapato. Na segunda, a transmissão de *A. marginale* ocorre durante o estágio atual do artrópode, sendo uma das principais formas de contágio. Espécies como *R. microplus* e *Dermacentor albipictus* são as mais relevantes como vetores da doença e têm apenas um hospedeiro (monoxênico). Os machos adultos desempenham um papel significativo nesse processo, pois se deslocam entre os hospedeiros sem mudar de estágio (Kocan *et al.*, 2003). A terceira forma de transmissão (transovariana), embora menos comum, desempenha um papel crucial na disseminação de *A. marginale*. Nesse processo, a bactéria é transmitida da teleógina para sua prole durante o desenvolvimento. Esse mecanismo de transmissão é particularmente importante para compreender a persistência e a disseminação da infecção em populações de bovinos, uma vez que permite que a bactéria seja transmitida de uma geração para a próxima, sem a necessidade de completar um novo ciclo no hospedeiro (de la Fourniere *et al.*, 2023).

O ciclo de desenvolvimento de *A. marginale* está intrinsecamente ligado ao ciclo de alimentação do carrapato adulto, especialmente o *R. microplus* (Martins; Corrêa, 1995). Durante o repasto sanguíneo, o carrapato adquire o patógeno dos eritrócitos infectados. O *Anaplasma spp.* se desenvolve no intestino do carrapato e pode infectar outras células deste hospedeiro, resultando em uma infecção generalizada que permite a persistência da riquetsia nos carrapatos machos (Ribeiro *et al.*, 1996).

Dentro de cada local de infecção no carrapato, *A. marginale* se desenvolve em um vacúolo ou colônia ligado à membrana, formado pela invaginação da membrana celular. Essa é a primeira forma encontrada durante o desenvolvimento, conhecida como forma vegetativa ou reticulada. Essas formas se reproduzem por fissão binária dentro da colônia, e cada forma vegetativa pode conter de quatro a oito bactérias, as quais, durante uma infecção aguda, podem ser encontradas em 70% ou mais dos eritrócitos bovinos. As colônias aumentam de tamanho a cada ciclo de replicação e podem conter centenas de riquetsias em até 48 horas. A partir da forma reticulada,

surge a forma densa ou infectiva, capaz de iniciar um novo ciclo infeccioso quando transmitida pela glândula salivar do carrapato para um novo bovino (Kocan *et al.*, 2003).

Nos bovinos, *A. marginale* infecta aparentemente células endoteliais, facilitando a infecção célula a célula e a replicação dentro de eritrócitos maduros, proporcionando um ambiente de proteção das células do sistema imunológico e servindo como um reservatório para novas infecções. A entrada de *A. marginale* nas hemácias do bovino ocorre por meio de endocitose dependente de moléculas de adesão expressas na membrana celular da bactéria, e sua saída acontece no quarto dia por um processo controlado pelas membranas externa e interna do eritrócito bovino (Kocan *et al.*, 2004).

Em bovinos imunocompetentes, *A. marginale* pode sobreviver e se multiplicar por pelo menos sete anos, mantendo a infecção persistente através de variantes antigênicas geradas pelas proteínas de superfície MSP2 e MSP3, permitindo ao microrganismo evadir a resposta imune do hospedeiro (De la Fuente 2001; Brayton *et al.*, 2005). Nos bovinos persistentemente infectados, o ciclo replicativo tem uma duração média de 5 semanas. Devido ao tempo de vida dos eritrócitos, que é aproximadamente 120 dias, a manutenção da infecção persistente ocorre através da reinfeção contínua dos eritrócitos, evitando a resposta imune gerada pelas variantes antigênicas de *A. marginale* (Kieser *et al.*, 1990).

A evolução da doença pode ser dividida em quatro estágios: período de incubação ou pré-patente, fase de desenvolvimento ou de patência, período convalescente e fase de portador (Richey, 1993).

Em regiões endêmicas, em rebanhos autóctones com práticas de manejo extensivo e/ou semi-extensivo e uma alta densidade de vetores, os animais adquirem o *A. marginale* nos primeiros dias de vida, e o parasito torna-se detectável entre 50 e 74 dias de idade. Assim, um equilíbrio é estabelecido cedo, pois esses animais se infectam logo após o nascimento, resultando em uma parasitemia moderada (Eriks *et al.*, 1989). O pico da parasitemia varia de 2 a 13% (com uma média de 7%) e ocorre de uma a quatro semanas após o surgimento das primeiras hemácias parasitadas. Durante este período, apenas as hemácias parasitadas com alterações celulares são eliminadas. Conforme a patogenia avança, auto-anticorpos surgem, ligando-se aos eritrócitos infectados e não infectados, aumentando a fagocitose das hemácias pelos

macrófagos, principalmente no baço. Isso resulta em diminuição do volume globular e anemia, que podem levar o animal à morte (Melo, 2018).

Os bezerros demonstram uma menor susceptibilidade à infecção por *A. marginale*, e mesmo sintomas clínicos menos evidentes (Guglielmone, 1995; Palmer, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003). O mecanismo para essa menor susceptibilidade dos bezerros não é totalmente compreendido; no entanto, de acordo com Melo (1999), isso pode estar relacionado à imunidade passiva, uma resposta imunológica mais eficiente através da imunidade celular resultante da persistência do timo, da alta atividade eritropoiética da medula óssea e proteção conferida pela hemoglobina fetal.

4.2 DISTRIBUIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DA ANAPLASMOSE BOVINA

A Anaplasmosse é uma doença endêmica com uma ampla e crescente distribuição em diversas regiões do mundo, abrangendo os Estados Unidos, México, América Central, América do Sul, ilhas do Caribe, e partes da Ásia e África. Na América Latina, ela é enzoótica em todo o território, exceto em áreas desérticas e cadeias montanhosas como os Andes. Na Europa, a Anaplasmosse bovina é predominantemente encontrada em países do Mediterrâneo, documentada em bovinos e diversas espécies de animais selvagens (Kocan *et al.*, 2003).

Essa ampla distribuição provavelmente resulta do transporte de animais portadores, seguido pela transmissão mecânica e biológica para bovinos suscetíveis. No Brasil, o *A. marginale* é endêmico em todo o território (Vidotto, Marana 2001), causando significativos problemas econômicos e sanitários, incluindo alta morbidade e mortalidade em rebanhos suscetíveis, diminuição da produtividade, casos de aborto e custos relacionados ao tratamento e controle da doença (Melo, 2018; Meneses, 2013; Nazar; Shah, 2018; Paramanandham *et al.*, 2019).

As perdas anuais causadas pela Anaplasmosse nos Estados Unidos ultrapassam os 300 milhões de dólares, enquanto na América Latina esse valor chega a 800 milhões de dólares (Kocan *et al.*, 2003). No Brasil, calcular os prejuízos é desafiador devido a fatores ambientais e intrínsecos a cada sistema de manejo, como tipo de pastagem, densidade animal e vetores, além das medidas de controle adotadas em cada propriedade (Andrade, 2021).

Cada região pode ser categorizada epidemiologicamente como uma área de estabilidade ou instabilidade enzoótica. Utilizando a Babesiose como modelo,

Mahoney e Ross (1972) definiram a estabilidade enzoótica como uma condição em que há alta incidência de animais infectados, mas a manifestação clínica é rara. Por outro lado, a instabilidade enzoótica ocorre quando os animais têm pouca exposição aos vetores nos primeiros meses de vida, resultando em quadros clínicos graves e altas taxas de mortalidade, embora este conceito não se aplique integralmente a todos os cenários epidemiológicos (Madruga *et al.*, 2001; Mahoney; Ross, 1972).

Estudos sorológicos são fundamentais para avaliar o risco da doença e caracterizar epidemiologicamente o rebanho, contribuindo para a diferenciação entre zonas estáveis e instáveis da Anaplasmosse. Fatores como condições climáticas, controle de ectoparasitas e sistema de produção podem interferir na infecção precoce dos bovinos, influenciando o ciclo biológico dos vetores e a exposição dos animais ao patógeno (Melo *et al.*, 2001; Marana *et al.*, 2009).

Embora os estudos de soroprevalência no Brasil tenham contribuído para diferenciar zonas estáveis e instáveis da Anaplasmosse, a compreensão sobre surtos ainda é limitada (Madruga *et al.*, 1986; Vespasiano, 2016). Surtos esporádicos em zonas estáveis estão associados ao transporte de animais de áreas instáveis, alta infestação de vetores e introdução de animais do grupo *Bos taurus taurus*. A Anaplasmosse bovina figura na lista da Office International des Epizooties (OIE) devido ao seu impacto significativo na saúde dos animais domésticos, resultando em perdas diretas de produção e aumento da taxa de mortalidade. Embora mais evidente em bovinos, outras espécies de ruminantes também podem ser infectadas por *A. marginale*, desempenhando um papel significativo na epidemiologia da doença (Brown, 2012; Chomel *et al.*, 1994).

A preocupação com a transmissão entre a vida selvagem e o gado doméstico está em ascensão, especialmente em áreas onde animais selvagens e gado compartilham pastagens comuns. Isso é exemplificado pelos casos de Anaplasmosse registrados em rebanhos bovinos de várias regiões do Canadá entre 2000 e 2009, aumentando a preocupação sobre a transmissão de agentes infecciosos pelos animais selvagens (Chomel *et al.*, 1994). A prevalência mais elevada de Anaplasmosse em bovinos pode ser atribuída tanto às preferências da espécie hospedeira quanto à disponibilidade de um maior número de estudos de prevalência para bovinos do que para outros ruminantes (Kocan *et al.*, 2010).

4.2.1 Prevalência e Distribuição Global

Os resultados da meta-análise conduzida por Paramanandham *et al.* (2019) revelaram uma alta prevalência de espécies de *Anaplasma* na América do Sul (82%), seguida pela Europa (42%), América do Norte (36%), África (35%) e Ásia (33%). A análise da prevalência ao longo do tempo indicou uma tendência decrescente em todos os cinco continentes durante o período de 2011 a 2017, em comparação com estudos anteriores. Os métodos de diagnóstico mais utilizados nos estudos de prevalência foram a sorologia (46%), seguida por técnicas baseadas em ácido nucléico (PCR) (42%) e o método de exame de esfregaço sanguíneo (21%).

As estimativas de prevalência ao longo do tempo para a Anaplasmoze bovina mostram uma tendência decrescente durante os anos de 2011 a 2017 em comparação com o período anterior a 2011, tanto no Brasil quanto nos cinco continentes do mundo. Essa redução pode ser atribuída a práticas de tratamento mais eficazes, métodos de diagnóstico mais precisos e a conscientização sobre carrapatos e doenças transmitidas por eles entre os fazendeiros (Kocan *et al.*, 2010).

A distribuição da Anaplasmoze pode ser impactada no futuro pela mudança climática, que influencia a população de vetores (Jonsson; Reid., 2000). Além disso, a mudança climática pode alterar a prevalência da Anaplasmoze ao afetar a distribuição geográfica de ruminantes e hospedeiros de carrapatos (Grau *et al.*, 2013; Jonsson; Reid., 2000; Junsiri *et al.*, 2022; Kocan *et al.*, 2010).

No estudo conduzido por Paramanandham *et al.* (2019), a prevalência na América do Sul foi observada como superior em comparação com outros continentes, corroborando relatos anteriores de países sul-americanos, tais como Venezuela (57,7%), Colômbia (64–100%), Brasil (67,3%), Paraguai (92%) e Argentina (7–61%) (Kocan *et al.*, 2003). Essa disparidade pode ser atribuída à maior densidade populacional de carrapatos e às condições agroclimáticas favoráveis à ocorrência da doença.

Por outro lado, as estimativas de prevalência no continente asiático foram menores, o que pode ser atribuído a diferentes zonas agroclimáticas, variação na disponibilidade da população de vetores (Kocan *et al.*, 2010; Nazar *et al.*, 2018; Nazifi *et al.*, 2012) e diferentes cepas de *A. marginale* presentes em cada país. Em uma análise de associação filogenética de cepas na Índia, observou-se proximidade com cepas do México, além da identificação de uma população heterogênea de cepas de

A. marginale causando Anaplasmosose (George *et al.*, 2017). Um estudo de diversidade genética no Brasil indicou a circulação de três cepas de *A. marginale* na área de estudo (Paramanandham *et al.*, 2019).

4.2.2 Anaplasmosose no Brasil

A compreensão da epidemiologia da Anaplasmosose bovina no Brasil é desafiadora devido à diversidade dos biomas e à escassez de estudos disponíveis. Nesta revisão, é apresentada uma classificação geral para auxiliar na previsão do comportamento da doença em diferentes regiões. As zonas de estabilidade enzoótica incluem o cerrado nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, a Mata Atlântica nas regiões Nordeste e Sudeste, e a Amazônia na região Norte, abrangendo cerca de 82% do território brasileiro. Por outro lado, as zonas de instabilidade enzoótica compreendem a Caatinga no Nordeste, o Pantanal no Centro-Oeste e a região Sul, correspondendo a aproximadamente 18% do território (Puentes; Riet-Correa, 2023).

No Brasil, estudos recentes identificaram uma alta prevalência de Anaplasmosose em diversas regiões, evidenciando a distribuição ampla e preocupante da doença. Melo (2001) e Meneses (2013) destacaram uma incidência significativa em quatro regiões de Minas Gerais: Alto Paranaíba, Zona Metalúrgica, Sul de Minas e Triângulo Mineiro. Da mesma forma, Souza *et al.* (2013) observaram uma alta prevalência no Norte Fluminense, no estado do Rio de Janeiro, enquanto Barros *et al.* (2005) constataram elevados índices na região semiárida da Bahia. Em Araguaína, Tocantins, foi verificada uma soroprevalência de 89,9% (Trindade *et al.*, 2010).

A condição soroprevalência no estado do Pará foi de 75,18% (506/673), enquanto no estado do Tocantins, entre as raças Nelore e Tabapuã, atingiu 89,9% (455/506) (Trindade *et al.*, 2010). No entanto, na Caatinga brasileira, a prevalência de anticorpos para *A. marginale* é mais baixa, devido à redução da infestação por carrapatos. Na Paraíba, nas mesorregiões do Sertão Paraibano e Borborema, a soroprevalência observada foi de 17,72%, enquanto no semiárido de Pernambuco, foi de 39,8% (Santos *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2011).

Além disso, estudos realizados no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, Município de Patos, Paraíba, revelaram a ocorrência de surtos de tristeza parasitária entre 2000 e 2009. Durante esse período, a maioria dos surtos foi causada por *A. marginale*, com uma média de morbidade de 11,6% e mortalidade

de 4,15%. A transmissão foi predominantemente atribuída ao carrapato *R. microplus*, embora em algumas ocasiões, mutucas (Tabanídeos) tenham sido responsáveis pela disseminação da doença (Costa *et al.*, 2011).

Um estudo conduzido por Vespasiano (2016) revelou que mais de 75% dos animais examinados aos nove meses de idade foram soropositivos para *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*. No entanto, houve ocorrência de casos clínicos em animais jovens, questionando a aplicabilidade das classificações de instabilidade e estabilidade enzoótica estabelecidas por Mahoney e Ross (1972) e amplamente utilizadas pela comunidade científica. O estudo sugere que apenas a frequência de animais soropositivos não é suficiente para determinar o status epidemiológico de uma fazenda. Na propriedade analisada, apesar de ser classificada como estável, foi observada uma alta frequência de animais suscetíveis, com uma incidência significativa de quadros clínicos em bezerros jovens, indicando a necessidade de uma nova abordagem para caracterizar essa situação comum em propriedades leiteiras. O estudo envolveu 224 animais da raça Holandesa, distribuídos em sete categorias distintas, onde a presença de anticorpos IgG anti-*A. marginale* foi detectada em todos os grupos, com frequências variando de 26,66% a 86,66%, enquanto a detecção de DNA de *A. marginale* por PCR variou de 20% a 100%.

A ocorrência da Anaplasmosose nessa região é mais comum durante o verão e outono, podendo afetar especialmente bovinos adultos leiteiros durante a movimentação do confinamento para pastagens infestadas por carrapatos. Notavelmente, as raças europeias e seus cruzamentos demonstram maior suscetibilidade a essa doença (Puentes; Riet-Correa, 2023).

Baseando-se em dados de prevalência, Ferreira *et al.* (2019) classificou as regiões Norte e Sudeste como estáveis, a região Sul como área livre e o Nordeste como instável. No entanto, essa abordagem, fundamentada em diversas fontes de informação, visa caracterizar regiões e biomas como instáveis ou estáveis seguindo os princípios de Mahoney e Ross (1972).

A continuidade dos estudos sorológicos e análises de surtos é crucial para aprofundar a compreensão da epidemiologia da Anaplasmosose em todo o Brasil. Nesse sentido, torna-se evidente que a abordagem holística e individual de cada propriedade é mais eficiente na compreensão da doença. Isso é especialmente notável devido às intensas modificações de manejo, como a intensificação dos sistemas produtivos e o acesso cada vez menor dos animais aos vetores (Coelho, 2022).

4.3 RESPOSTA IMUNE NA ANAPLASMOSE BOVINA

O quadro patológico iniciado por *A. marginale* desencadeia respostas do sistema imunológico, tanto na forma de uma resposta humoral, associada à produção de anticorpos, quanto por meio de uma resposta celular, envolvendo as células do sistema imunológico no organismo hospedeiro (Chadi *et al.*, 2023; Pimentel, 2018; Pimentel *et al.*, 2020).

Quando ocorre a infecção por *A. marginale*, uma resposta imunológica é desencadeada pelo organismo bovino. As imunoglobulinas desempenham um papel crucial nesse processo, promovendo a destruição das hemácias infectadas por células especializadas do sistema imunológico. Isso resulta na rápida e intensificada remoção das hemácias do corpo, levando a uma anemia acentuada devido à diminuição da quantidade de glóbulos vermelhos circulantes (Melo, 2018).

A infecção crônica por *A. marginale* está associada à necessidade constante da bactéria de invadir novos glóbulos vermelhos, pois seu ciclo de vida ocorre principalmente dentro dessas células. Durante esse processo de replicação e sobrevivência, o parasito invade os glóbulos vermelhos e se reproduz no interior deles (Battilani *et al.*, 2017).

Para compreender melhor esse processo, é importante considerar a vida útil média de um eritrócito, que é de aproximadamente 160 dias. Ao longo desse período, os glóbulos vermelhos são continuamente substituídos no organismo do hospedeiro. A estratégia do *A. marginale* para persistir no organismo bovino é se replicar de forma contínua, infectando novos glóbulos vermelhos. Sua capacidade de variar as características de suas proteínas de superfície é crucial para evitar o reconhecimento pelo sistema imunológico do hospedeiro, dificultando a ação das defesas naturais (Arnuphapprasert *et al.*, 2023).

Ao modificar suas proteínas de superfície, o *A. marginale* consegue escapar do sistema imunológico, permitindo uma replicação contínua no interior dos glóbulos vermelhos. Esse ciclo constante de invasão, replicação e evasão contribui para a persistência da infecção crônica e para a complexidade da Anaplasmoze bovina (Ferreira, 2019; Silvestre *et al.*, 2014).

As proteínas de superfície de membrana (MSPs), incluindo MSP1 α , MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5, desempenham um papel crucial na interação entre *A. marginale* e o sistema imunológico do hospedeiro. Essas proteínas têm a capacidade

de estimular a resposta imune nos animais e contribuir para o desenvolvimento de uma resposta protetora eficaz contra a infecção (Arnuphapprasert *et al.*, 2023; Melo, 2018; Pimentel, 2018; Pimentel *et al.*, 2020).

O complexo MSP1, composto por MSP1 α e MSP1b, é especialmente importante para a adesão e invasão das células hospedeiras, contribuindo significativamente para a sobrevivência da riquetsia no vetor do carrapato e nas células dos hospedeiros (Michelon, 2005). Estudos mostram que bovinos imunizados com MSP1 nativa desenvolvem títulos de anticorpos, principalmente da classe IgG (Junsiri *et al.*, 2022).

Dentro da classe de imunoglobulinas G (IgG), as subclasses mais comuns em mamíferos são IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, cada uma desempenhando funções específicas no sistema imunológico. No contexto de infecções bacterianas, como a Anaplasmoze bovina causada por *A. marginale*, a IgG2 desempenha um papel crucial. A IgG2 é conhecida por sua capacidade de neutralizar patógenos e ativar mecanismos efetores do sistema imunológico. Em algumas infecções bacterianas, a IgG2 é particularmente eficaz na opsonização, marcando os patógenos para fagocitose por células do sistema imunológico, como macrófagos e neutrófilos (Costa *et al.*, 2016).

A resposta imune desempenha um papel fundamental no controle da infecção por *A. marginale*. A imunoglobulina IgG2 é especialmente importante, pois contribui para reduzir a fase aguda da doença e minimizar a anemia. Isso ocorre através da ativação de macrófagos pelo interferón-gama (IFN- γ), estimulado pela IgG2, para produzir óxido nítrico (NO), uma substância tóxica para a riquetsia, auxiliando assim na sua eliminação no meio intracelular (Battilani *et al.*, 2017).

Outras proteínas do complexo MSP, como MSP2 e MSP3, são identificadas como imunodominantes e desempenham papéis importantes na resposta imune contra *A. marginale*. A MSP2 possui uma região hipervariável e é vital para a sobrevivência da riquetsia, enquanto a imunização com MSP3 retarda o surgimento da riquetsemia. Por outro lado, a MSP4, altamente conservada, demonstrou eficácia protetiva contra o desafio, enquanto a MSP5, embora conservada, ainda não demonstrou eficácia protetiva conhecida (Pimentel, 2018; Siddiki *et al.*, 2023).

Durante a infecção, o *A. marginale* sofre variações antigênicas nas proteínas MSP2 e MSP3, levando à produção de IgG2 específica para cada nova variante emergente. Várias hipóteses foram sugeridas para explicar esse fenômeno de variação antigênica, incluindo danos na membrana celular do hospedeiro devido ao

estresse oxidativo, a presença de proteínas bacterianas na superfície das hemácias e a possível perda de eritrócitos infectados devido ao seu pequeno tamanho (Nazifi *et al.*, 2008). Essa capacidade do *A. marginale* de variar suas proteínas de superfície é um dos desafios na concepção de uma vacina eficaz contra a Anaplasmosse bovina, exigindo uma compreensão mais aprofundada da resposta imune e das estratégias de imunização.

A produção específica de IgG2 é importante na resposta imune contra *A. marginale*, especialmente na opsonização dos corpúsculos iniciais para fagocitose pelos macrófagos. Macrófagos e outras células fagocíticas são ativados pela IgG2 para realizar a fagocitose, limitando assim a propagação da riquetsia no meio intracelular e controlando a infecção. Esse processo, no entanto, pode estar associado à anemia severa característica da doença (Leite *et al.*, 2002).

Quando exposto à presença da riquetsia, o organismo bovino desencadeia uma resposta imunológica coordenada e complexa. Antígenos específicos da riquetsia ativam as células apresentadoras de antígenos (APCs), que por sua vez liberam citocinas como IL-12 e IFN- γ . Estas citocinas modulam a resposta imune, ativando linfócitos T auxiliares (CD4+), que amplificam a produção de IFN- γ . O IFN- γ estimula então os linfócitos B a produzirem IgG2, que é capaz de neutralizar os corpúsculos iniciais de *A. marginale* e induzir a fagocitose pelos macrófagos (Esmailnejad *et al.*, 2018).

Além disso, a IgG2 pode bloquear a entrada da riquetsia nos eritrócitos, e a opsonizando ainda no meio extracelular, a fim de impedir sua replicação nos glóbulos vermelhos. Essa sequência de eventos ressalta a coordenação intrincada entre diferentes componentes do sistema imunológico para combater eficazmente a infecção por *A. marginale* (Gasparini *et al.*, 2013; Pimentel, 2018).

A resposta de IgG2 desempenha um papel crucial no controle das novas variantes de *A. marginale*. No entanto, a capacidade contínua da riquetsia em evadir a resposta imune por meio da variação antigênica pode impedir a eliminação completa do patógeno. Mecanismos que levam à deficiência na resposta das células T durante a infecção ainda não são completamente compreendidos, e requer investigações adicionais para esclarecer completamente os processos envolvidos nesse fenômeno. Regulações negativas, possivelmente mediadas por células T regulatórias, podem desempenhar um papel na limitação da inflamação sistêmica prolongada em resposta aos níveis elevados persistentes de *A. marginale* (Peixoto, 2017).

O estudo de Castro (2009) investigou a eficácia da imunização de bezerros com um isolado de baixa patogenicidade de *A. marginale*, revelando que os animais imunizados desenvolvem predominantemente uma resposta celular do tipo Th1, caracterizada pela produção de citocinas. Os bezerros imunizados não manifestaram sinais clínicos da doença quando desafiados com um isolado altamente patogênico, destacando a importância da resposta imune na proteção contra a Anaplasmosse bovina.

No estudo de Silvestre (2014), a investigação da resposta imune em camundongos Balb/c imunizados com a proteína recombinante MSP1 α do *A. marginale* revelou níveis elevados de anticorpos IgG específicos para MSP1 α , considerada uma resposta humoral robusta. Além disso, a combinação de MWNT (nanotubos de carbono de paredes múltiplas) e rMSP1 α induziu uma resposta celular mais forte, com aumento na capacidade proliferativa dos esplenócitos e maior ativação de linfócitos T CD4+. O aumento nos níveis de citocina TNF- α no grupo MWNT+rMSP1 α indica uma resposta imune pró-inflamatória, que pode ser benéfica na defesa contra a infecção por *A. marginale*. No entanto, é importante ressaltar que a ausência de disparidades mensuráveis em certos parâmetros não implica necessariamente falta de resposta, e uma compreensão completa dos mecanismos de controle requer uma análise abrangente e integrada das respostas imunes (Silvestre, 2014).

No estudo de Meneses (2013), foi identificado que diferentes isolados de *A. marginale* são capazes de serem transmitidos verticalmente em bovinos, destacando a importância da transmissão vertical na disseminação da doença. Além disso, o isolado de baixa virulência UFMG3 demonstrou potencial como candidato para o desenvolvimento de uma vacina viva contra a Anaplasmosse bovina, oferecendo uma abordagem para o controle da doença.

Silva (2017) investigou o efeito da imunização de bezerros com MWNT funcionalizados com rMSP1 α , associados à vacina inativada de *A. marginale*. Essa estratégia foi capaz de induzir uma resposta imune celular e humoral significativa, com redução significativa da ricketsemia e melhoria na capacidade de recuperação do volume globular dos animais. Esses resultados sugerem que a combinação de MWNT com antígenos de *A. marginale* pode ser uma abordagem eficaz para o desenvolvimento de vacinas contra a Anaplasmosse bovina.

Pimentel (2018) investigou a utilização de nanotubos de carbono como ferramenta para o desenvolvimento de uma vacina contra a Anaplasmosse bovina. A imunização com peptídeo Am1 acoplado a MWCNT não proporcionou uma resposta imune superior àquela observada nos animais imunizados apenas com o peptídeo.

Por fim, o nanocomplexo MWCNT-Am1 desenvolvido por Pimentel *et al.* (2020) demonstrou alta estabilidade e boa dispersibilidade, com produção elevada de anticorpos IgG1 e IgG2a, juntamente com um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Esses resultados sugerem que essa abordagem pode ser promissora para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes contra a Anaplasmosse bovina.

Em conjunto, esses estudos contribuem para o avanço do conhecimento sobre estratégias vacinais contra a Anaplasmosse bovina, oferecendo novas perspectivas e possibilidades para o controle dessa importante doença animal. Vespasiano (2020) conduziu um estudo com 12 bezerros machos da raça Holandês, previamente testados como negativos para *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* por meio de PCR e soronegativos por RIFI. Os animais foram divididos em dois grupos: o grupo vacinado, que recebeu a vacina composta por AmUFMG2, rMSP1 α funcionalizada com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWNT) e adjuvante, e o grupo de controle, que recebeu PBS, adjuvante e MWNT não-carboxilado. Os resultados revelaram que a vacina foi capaz de induzir respostas imunes celulares e humorais nos bezerros vacinados. No entanto, após um desafio experimental com 5×10^6 eritrócitos infectados por *A. marginale*, os animais vacinados apresentaram sintomas clínicos de Anaplasmosse, incluindo febre.

Esses estudos ressaltam a complexidade da resposta imune na Anaplasmosse bovina e a necessidade contínua de aprimorar as estratégias de imunização para alcançar uma proteção mais eficaz contra a doença. O desenvolvimento de uma vacina eficaz contra *A. marginale* requer uma abordagem integrada que leve em consideração a diversidade genética do patógeno e as características específicas das populações bovinas em diferentes contextos (Vespasiano, 2020).

4.3.1 Imunidade passiva

A placenta dos bovinos é classificada como sinepiteliocorial, o que significa que os recém-nascidos dessa espécie nascem sem a capacidade de produzir imunoglobulinas e dependem exclusivamente dos anticorpos presentes no colostro materno (Tizard, 2013; Prestes; Alvarenga, 2006). Em sua pesquisa, Coelho (2022) destacou a importância da transferência de imunidade passiva através do colostro na proteção dos recém-nascidos contra a Anaplasmose bovina. Além disso, análises moleculares revelaram uma significativa taxa de transmissão vertical da infecção por *A. marginale*. Esses achados ressaltam a urgência de medidas preventivas para controlar essa via de transmissão da doença e seu impacto sobre os neonatos.

Adicionalmente, é essencial garantir a qualidade do colostro para proteger os bezerros, evitando o fornecimento de colostro de vacas com mastite clínica, vacas que abortaram ou colostros coletados após 12 horas do parto. Estatísticas revelam que a maioria das mortes de bezerros ocorre nas primeiras duas semanas de vida, enfatizando a importância de cuidados adequados nesse período, como uma colostragem adequada, nutrição e um ambiente saudável. Essas medidas são fundamentais para o sistema imunológico dos neonatos e proporciona proteção contra diversas infecções, incluindo a Anaplasmose (Brito *et al.*, 2019).

Um estudo realizado por Silva (2012) coletou 1607 amostras de sangue de 41 bezerras ao longo dos primeiros 180 dias de vida, abrangendo tanto a estação chuvosa quanto a estação seca. As amostras foram processadas utilizando o teste ELISA indireto e a técnica PCR, indicando que bezerros com idades entre 30 e 60 dias tinham 1,90 vezes mais probabilidade de serem soronegativos para *A. marginale* em comparação aos recém-nascidos. Isso sugere que, durante esse período específico de 30 a 60 dias de vida, os bezerros apresentavam menor probabilidade de terem anticorpos específicos para *A. marginale* detectáveis no sangue, uma janela de tempo crítica para a defesa através dos anticorpos maternos.

4.4 EPIDEMIOLOGIA DA TRANSMISSÃO VERTICAL DO *A. MARGINALE*

A transmissão vertical do *A. marginale* para o feto durante a gestação em bovinos envolve uma série de mecanismos complexos e por isso pesquisas são

necessárias para compreender melhor a patogenia da transmissão transplacentária em ruminantes, a fim de determinar sua importância epidemiológica em diferentes rebanhos e estabelecer medidas eficazes de prevenção e controle (Costa *et al.*, 2016).

A transmissão primária do *A. marginale* se dá principalmente através do carrapato vetor, *R. microplus*. Durante seu ciclo alimentar, pode-se estabelecer uma infecção persistente no organismo da vaca gestante, o que é um processo crucial com potenciais impactos na saúde tanto da vaca quanto do feto. Durante o período de gestação, a riquetsia é capaz de atravessar a barreira placentária, alcançando assim o feto (Brito *et al.*, 2019)

A transmissão transplacentária da Anaplasmose, especialmente relevante neste estudo, é mais frequente e pode ter importância epidemiológica em determinadas regiões do mundo (Brito *et al.*, 2019; Herrera, 2019). Esse fenômeno ocorre quando uma mãe infectada transmite o patógeno para o feto no útero.

Essa forma de transmissão é particularmente crucial devido à sua contribuição significativa para a disseminação da *A. marginale* na população de bovinos, aumentando a prevalência da infecção. Compreender esses mecanismos é necessário para implementar estratégias eficazes de controle e prevenção da Anaplasmose com redução do impacto epidemiológico da doença. Tanto a relevância epidemiológica quanto o processo de transmissão vertical de *A. marginale* têm sido objeto de debate (Coelho, 2022).

De acordo com Eriks *et al.* (1993), os animais infectados permanecem persistentemente infectados e exibem baixos níveis de eritrócitos parasitados, com baixa parasitemia de 0,01%. Esses animais, conforme observado por Eriks *et al.* (1989), continuam sendo importantes reservatórios para a transmissão da Anaplasmose.

A transmissão vertical de *A. marginale* é documentada em vários estudos experimentais, incluindo pesquisas longitudinais. Este tipo de transmissão é mais comum durante o terço médio e final da gestação (Brito *et al.*, 2019; Grau *et al.*, 2013; Maldonado *et al.*, 2012; Pypers; Holm; Williams, 2011; Silva *et al.*, 2014).

Os primeiros estudos sobre a transmissão vertical de *A. marginale* observaram que os animais recém-nascidos apresentavam sintomas clínicos da infecção (Norton *et al.*, 1983; Potgieter; van Rensburg, 1987). No Brasil, o primeiro estudo realizado por Ribeiro *et al.* (1995), citado por Ferreira (2019), detectou transmissão transplacentária de *A. marginale* em 2,06% (2/97) dos fetos examinados em um matadouro e em

36,36% (4/11) dos bezerros nascidos de vacas inoculadas. Esses achados destacaram que durante a fase aguda da doença, a transmissão vertical pode ser uma via importante de infecção por *A. marginale*.

Um relato de caso descrito por Girardi *et al.* (2012) descreveu a Anaplasmoze congênita em uma bezerra da raça Nelore, nascida em São Paulo, Brasil. A bezerra apresentou sintomas graves, como apatia, desidratação e icterícia, desde o nascimento, e veio a óbito após quatro dias. Exames revelaram uma alta taxa de parasitemia, com 70% das hemácias da bezerra infectadas pelo *A. marginale*.

Outro estudo realizado por Grau *et al.* (2013) no Sul do Brasil constatou que a taxa de transmissão vertical de *A. marginale* foi de 10,5% (2/19) em bezerros recém-nascidos de vacas cronicamente infectadas. Nazar *et al.*, (2018) investigaram a taxa de transmissão vertical de *A. marginale* e concluíram que 13,7% (4/29) dos bezerros recém-nascidos testados foram positivos para a riquetsia, com maior incidência de 62,5% (20/32) na raça europeia, seguida de 42,4% (14/33) no cruzamento de raças e 35,4% (11/31) em raças zebuínas. A importância desses estudos reside na compreensão da dinâmica da transmissão da Anaplasmoze bovina. Identificar a presença da riquetsia nos neonatos é fundamental para entender como a doença é transmitida verticalmente de uma geração para outra, especialmente em regiões onde a Anaplasmoze bovina é endêmica.

No que diz respeito ao momento em que as vacas gestantes transmitem a riquetsia, a maioria dos estudos com *A. marginale* demonstrou que bezerros que testaram positivo em análises moleculares ou sorológicas antes da ingestão do colostro provêm de fêmeas naturalmente infectadas (Costa *et al.*, 2016; Maldonado *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014). No entanto, não há consenso na literatura sobre isso. Grau *et al.* (2013) afirmaram que vacas cronicamente infectadas, sem histórico de Anaplasmoze aguda, passam a infecção para suas crias via transmissão vertical. Andrade (2021) conduziu uma avaliação de fetos em um abatedouro, identificando a presença de *A. marginale* nos fetos durante o segundo e terceiro trimestres de gestação. No entanto, devido às limitações na obtenção de material para PCR (sangue), não foi possível avaliar os fetos durante o primeiro trimestre de gestação.

A transmissão vertical em bezerros recém-nascidos foi investigada por Meneses (2013), revelando uma taxa de ocorrência de 10%. A análise molecular das amostras positivas indicou a presença de múltiplos isolados genéticos transmitidos verticalmente. Grau *et al.* (2013), em amostras de sangue de 30 vacas em diferentes

períodos da gestação, bem como sangue de bezerros recém-nascidos, constataram que 63,3% das vacas eram portadoras de *A. marginale*, enquanto 6,7% dos bezerros recém-nascidos também eram PCR positivos, o que representa uma taxa de transmissão transplacentária de 10,5%. Além disso, foi observada uma correlação significativa de 93,3% entre as técnicas de sorodiagnóstico utilizadas, a RIFI e o ELISA, no acompanhamento sorológico destes indivíduos.

Diversos fatores podem contribuir para a maior vulnerabilidade dos fetos frente aos patógenos como a constante reinfecção de vacas gestantes (Costa *et al.*, 2016). Fatores que causam imunossupressão em vacas gestantes tornam os fetos mais suscetíveis a infecções, o que pode resultar em um aumento na transmissão vertical de patógenos, sendo essa uma das principais razões por trás das infecções subclínicas e, possivelmente, é a responsável pelo aumento da transmissão vertical (Silva *et al.*, 2014).

Vacas no período de transição estão susceptíveis a um aumento nos níveis de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e corpos cetônicos na corrente sanguínea e que impacta na redução da atividade leucocitária e da função oxidativa dos neutrófilos. Além da imunossupressão na vaca gestante, outros fatores podem estar associados à transmissão vertical, como o aumento da permeabilidade vascular no útero e no feto. Nos estágios finais da gestação, ocorrem alterações anatômicas na placenta e um rápido crescimento do feto, resultando em maior demanda por nutrientes e uma maior atividade de fagocitose eritrocitária fetal (Andrade, 2021; Coelho, 2022).

No estudo de Silva *et al.*, (2014), os resultados da amplificação do DNA revelaram uma frequência de infecção por *A. marginale* de 41% nos bezerros recém-nascidos antes da ingestão do colostro. Entretanto, apenas 14% dos bezerros recém-nascidos foram soropositivos para *A. marginale*. Todos os bezerros foram positivos para *A. marginale* por PCR e exame microscópico de esfregaços sanguíneos antes dos dois e quatro meses de idade, respectivamente. Os principais fatores de risco associados à soroprevalência foram raça, infestação por carrapatos e densidade populacional. Os resultados indicaram que a exposição de bovinos a *A. marginale* foi comum em rebanhos leiteiros, e a situação endêmica de instabilidade provavelmente se deve à produção inadequada de anticorpos em vacas ou à variabilidade genética do patógeno.

O estudo conduzido por Coelho (2022) avaliou um total de 665 animais distribuídos em cinco categorias distintas: animais de chegada, novilhas durante o

diagnóstico de gestação, bezerros recém-nascidos, bezerros desmamados e animais na fase de terminação. A metodologia adotada envolveu a realização de esfregaço sanguíneo, medição do hematócrito e aplicação da técnica de RIFI. Os resultados obtidos revelaram a presença do *A. marginale* em todas as categorias investigadas. Destaca-se que os bezerros recém-nascidos apresentaram uma adequada transmissão de imunidade passiva. A análise molecular complementar através do PCR demonstrou taxas de transmissão vertical de 41,3% para o *A. marginale*. Neste estudo há relevância da transmissão vertical como um mecanismo significativo na propagação da Anaplasmoze bovina. Essa compreensão mais aprofundada dos padrões de transmissão pode orientar estratégias de controle nos diversos sistemas de exploração de bovinos.

Os resultados obtidos na pesquisa de Ferreira (2019), bem como as descobertas de Silva *et al.*, (2014), indicam que a relevância da transmissão transplacentária de *A. marginale* é variável e dependente de fatores locais relacionados às características dos rebanhos, como o clima, o perfil genético dos bovinos e a sazonalidade dos vetores. Outra abordagem fundamental neste trabalho é considerar os fatores ligados à variabilidade genética dos agentes infecciosos.

Um estudo internacional (Atif, 2021) coletou amostras de sangue das matrizes em dois momentos-chave: durante os primeiros quatro meses de gestação e no momento do parto. Após a triagem, um grupo de 32 bezerros que não foram alimentados com colostro foi selecionado para o ensaio de transmissão vertical. Os resultados revelaram que 28 dos 32 bezerros (representando 87,5%) adquiriram a infecção intrauterina, como confirmado por testes sorológicos cELISA. Isso sugere uma taxa significativa (31%) de transmissão vertical do *A. marginale* entre bovinos. É fundamental incluir a transmissão transplacentária de hemopatógenos bovinos no diagnóstico diferencial de causas de morte de bezerros, especialmente quando apresentam quadros de hipogamaglobulinemia (Brito *et al.*, 2019).

Ainda há incerteza sobre os mecanismos da infecção por *A. marginale* durante a gestação, exigindo novas pesquisas para esclarecer melhor a epidemiologia da doença, especialmente devido às altas taxas de transmissão vertical. Bezerros que nascem positivos para a riquetsia podem apresentar sinais clínicos mais graves, maior mortalidade, inclusive, logo após o nascimento, ou podem desempenhar um papel significativo na epidemiologia da Anaplasmoze, especialmente em áreas de estabilidade enzoótica.

4.5 DIAGNÓSTICO E TIPIFICAÇÃO DE *A. MARGINALE*

Os sinais clínicos da Anaplasmosose são bastante inespecíficos, o que destaca a importância de diferenciá-la de outras doenças. Para este fim, a literatura oferece uma ampla gama de testes laboratoriais que são capazes de detectar diretamente *A. marginale* e seus componentes, além de identificar antígenos e anticorpos presentes nos fluidos corporais dos animais afetados (Vidotto e Marana, 2001).

É importante ressaltar que os sintomas da Anaplasmosose podem variar consideravelmente, dependendo da cepa do patógeno e da susceptibilidade do hospedeiro. Portanto, um diagnóstico preciso se faz necessário para identificar a presença da riquetsia e investigar a existência de anticorpos contra *A. marginale* (Andrade, 2021; Brito *et al.*, 2019; Melo, 2018).

No diagnóstico de animais portadores de *A. marginale*, uma variedade de métodos indiretos pode ser empregada. Estes incluem exames sorológicos, como a técnica de imunofluorescência indireta (RIFI), fixação de complemento (CF), teste de aglutinação em cartão (CAT), ensaios imunoenzimáticos (ELISA) ligados a enzimas, citometria de fluxo, ou métodos moleculares, como a PCR (reação em cadeia da polimerase) (Meneses, 2013; Teixeira, 2022).

O diagnóstico anátomo-patológico é realizado por meio de necropsia, permitindo a observação das alterações no corpo do animal. As principais alterações macroscópicas incluem anemia, icterícia, aumento do fígado e baço, rins escuros, vesícula biliar distendida e congestão cerebral (Carlton; McGavin, 1998).

4.5.1 Diagnóstico molecular de *A. marginale*

4.5.1.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Técnicas moleculares são mais específicas e sensíveis na detecção da Anaplasmosose em comparação com a microscopia convencional de esfregaços sanguíneos (Atif, 2021). A PCR é uma técnica com alta sensibilidade e especificidade utilizada para amplificar seletivamente sequências específicas de DNA *in vitro* (Santos *et al.*, 2016). Essa técnica foi desenvolvida para detectar pequenas quantidades de

DNA de diversos agentes em amostras de sangue ou tecidos. No contexto da pesquisa de hemoparasitas em bovinos e artrópodes em diferentes estágios de desenvolvimento, a PCR é frequentemente empregada (de la Fourniere *et al.*, 2023). A PCR funciona amplificando repetidamente uma sequência específica de DNA do genoma do organismo alvo, resultando na produção de um produto amplificado facilmente detectável (Figueroa *et al.*, 1993).

Devido à sua alta sensibilidade e especificidade, a técnica da PCR é amplamente utilizada para validar outros métodos de diagnóstico (Bose *et al.*, 1995). Essa técnica é frequentemente utilizada para distinguir animais naturalmente infectados com *A. marginale* dos que foram vacinados com *A. centrale*, já a técnica de PCR multiplex é empregada para identificar *A. marginale*, *Babesia bovis* e *B. bigemina* (Molad *et al.*, 2006; Figueiroa *et al.*, 1993).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, como PCR, nPCR e qPCR (Bilhassi *et al.*, 2014), foram conduzidos novos estudos epidemiológicos sobre a transmissão vertical da Anaplasmosse. O uso dessas técnicas mais sensíveis tem revelado a transmissão transplacentária com maior frequência, tanto em animais recém-nascidos com sintomas quanto naqueles assintomáticos. Isso tem contribuído significativamente para a realização de pesquisas mais abrangentes sobre essa via (Costa *et al.*, 2016; Ferreira, 2019; Girardi *et al.*, 2012; Grau *et al.*, 2013; Nazar *et al.*, 2018; Teixeira, 2022).

Um estudo realizado por Melo (2018) apontou que a técnica do esfregaço sanguíneo não é suficientemente sensível para identificar a presença precoce de riquetsias no sangue. Nesse contexto, a realização de testes de PCR em intervalos frequentes durante o período de patência pré-patente (PPP) emerge como uma abordagem capaz de fornecer informações detalhadas sobre o ciclo do *A. marginale* no organismo bovino, especialmente durante essa fase inicial, embora seja um teste com pouca aplicabilidade na rotina de diagnóstico a campo, por sua complexidade e custo elevado (Melo, 2018). Embora seja uma excelente alternativa para pesquisas e estudos específicos, o desenvolvimento de métodos mais acessíveis e práticos é importante nas operações pecuárias do dia a dia.

A técnica da PCR, requer moléculas de DNA, iniciadores de síntese (primers), desoxirribonucleótidos fosfatados (dNTPs), a enzima DNA polimerase, íons de magnésio (um cofator da polimerase) e uma solução tampão para a reação. Os primers têm a função de marcar a sequência específica que será amplificada, servindo

como pontos de início e término para a ação da DNA polimerase. Os dNTPs representam as quatro bases nucleotídicas (adenina, timina, citosina e guanina) usadas pela DNA polimerase para construir a sequência desejada durante a amplificação. A PCR envolve três etapas distintas: desnaturação, hibridização (ou annealing) e extensão (Asuar, 2022).

Na etapa de desnaturação, o DNA de dupla hélice é separado a uma temperatura elevada, em torno de 95°C. Na etapa de hibridização, a temperatura é reduzida para permitir que os primers se liguem às fitas simples do DNA, o que possibilita que a enzima DNA polimerase inicie a incorporação dos dNTPs. Após a conclusão da PCR, os produtos amplificados são separados com base no peso molecular por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose. As bandas resultantes são visualizadas com a ajuda de corantes fluorescentes específicos para ácidos nucleicos (Asuar, 2022).

A técnica de *Nested* PCR (nPCR) é uma variante da PCR que se destaca por sua sensibilidade e especificidade aprimoradas, permitindo a detecção de parasitemia em níveis extremamente baixos. Isso é alcançado por meio da realização de um segundo ciclo de amplificação com novos primers, utilizando os produtos da PCR convencional como ponto de partida (Ferreira, 2019).

4.5.1.2 Genotipagem e tipificação

A identidade molecular de cepas de *A. marginale* são realizadas por meio de sequenciamento dos fragmentos de gene *A. marginale*, obtidos via nPCR. Este método tem uma maior importância para o desenvolvimento de vacinas, já que a utilização de amostras vivas de *A. marginale* no protocolo de vacinação requer amostras padronizadas de baixa virulência (Ribeiro *et al.*, 1997; Coelho, 2007; Bastos *et al.*, 2010).

Os principais marcadores genéticos de *A. marginale*, como as proteínas de superfície (MSPs) codificadas pelos genes MSP1 a MSP5, desempenham um papel nas interações hospedeiro-patógeno e carrapato-patógeno, sendo utilizados para caracterização genética e estudos filogenéticos. O trabalho de Arnuphapprasert *et al.*, 2022 na Tailândia, revela que apesar das informações sobre surtos suspeitos de anaplasmose, a análise genética de *A. marginale* permanece limitada, destacando a necessidade de investigações para compreender a taxa de infecção e a diversidade genética dos marcadores-chave MSP1 α , MSP2 e MSP5.

A caracterização da diversidade genética de *A. marginale* no Uruguai, descrita por Parodi *et al.*, 2022 pesquisando genótipos de MSP1 α e sua relação com o carrapato *Rhipicephalus microplus*, trouxe dados importantes para a compreensão da epidemiologia da doença. Este estudo, realizado entre 2016 e 2020, identificou quatro genótipos com o genótipo E predominante e demonstrou associações entre repetições em tandem de MSP1 α e a presença ou ausência de *R. microplus*. Tais aspectos contribuem para estratégias de vigilância e para o desenvolvimento futuro de vacinas eficazes.

4.5.1.3 Amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP)

A técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) é conhecida por sua alta especificidade e facilidade de uso. Ela foi desenvolvida em 2000, com o objetivo de detectar precocemente doenças microbianas (Notomi *et al.*, 2000). Diferentemente de outras metodologias, o LAMP executa todo o processo em uma condição isotérmica constante, o que simplifica significativamente o procedimento (Notomi *et al.*, 2000). A detecção do produto amplificado pelo LAMP pode ser realizada de maneira direta, através de uma simples observação visual da reação no tubo.

Este método é reconhecido por sua simplicidade e eficiência, permitindo a conclusão da amplificação em menos de uma hora. Ele opera em um único tubo, onde todos os reagentes são incubados sob condições isotérmicas. Isso é possível graças a um conjunto de quatro primers cuidadosamente desenhados, que abrangem seis sequências distintas do gene alvo (Notomi *et al.*, 2000).

Devido a suas características, o LAMP se apresenta como uma ferramenta de diagnóstico simples e rápida, sendo especialmente útil em regiões remotas desprovidas de equipamentos caros, onde a detecção precoce de doenças é crucial (Notomi *et al.*, 2015).

4.5.2 Diagnóstico direto

O diagnóstico direto pode ser realizado através da identificação de corpúsculos intraeritrocitários marginais de *A. marginale* em esfregaços sanguíneos que foram corados com Giemsa, resultando em coloração violeta escura, arredondada e pequena, sendo *A. marginale* localizado na margem exterior da hemácia, ou por corante hematológico rápido (Hematoxilina e eosina), para animais que manifestam a

forma clínica da doença. Esse método possui alta especificidade, no entanto, só é capaz de detectar concentrações superiores a 10^6 hemácias infectadas por mL de sangue, limitando sua sensibilidade na detecção em animais com baixa riquetsemia (Melo, 2018; Teixeira, 2022).

Apesar de ser o método primário empregado no campo, esse diagnóstico apresenta uma limitação: geralmente é realizado a partir da observação dos sinais clínicos da doença. O desafio reside no fato de que esses sintomas só se tornam evidentes alguns dias após o pico da riquetsemia, quando a anemia já atingiu estágios avançados (Teixeira, 2022). Após quatro ou cinco dias do ápice da anemia, a quantidade de células parasitadas pode ser tão reduzida que a detecção através de esfregaço sanguíneo se torna praticamente inviável. Portanto, é desaconselhável realizar esses exames muitos dias após o pico de parasitemia e a crise hemolítica, como destacado por Jain (1986).

4.5.3 Diagnóstico indireto

4.5.3.1 Resposta imunológica e proteínas de fase aguda

Um estudo conduzido por Nazifi *et al.* (2012) indicou que o aumento nas concentrações de SAA (proteínas de fase aguda) pode servir como um indicador confiável de inflamação em bovinos naturalmente infectados por *A. marginale*. O estudo examinou as respostas de fase aguda ao investigar as concentrações séricas de ácidos siálicos (total, lipídico e proteico), mediadores inflamatórios (IFN- γ e TNF- α) e proteínas de fase aguda (Hp e SAA). Os resultados revelaram reduções significativas na contagem de eritrócitos (CH), hematócrito (PCV) e hemoglobina (Hb) em bovinos infectados, em comparação com animais saudáveis. Por outro lado, as concentrações de Hp, SAA, ceruloplasmina, fibrinogênio, ácidos siálicos séricos e os mediadores γ e TNF- α estavam elevadas. Surpreendentemente, a progressão da parasitemia não causou alterações significativas nos índices hematológicos ou nas concentrações de Hp, SAA, ceruloplasmina e fibrinogênio. Destaca-se que a SAA demonstrou ser o marcador mais sensível às mudanças nos bovinos doentes, embora seja inespecífico.

Bovinos infectados por *A. marginale* frequentemente exibem uma redução nas contagens de hemácias, hematócrito (PCV) e hemoglobina (Hb), juntamente com uma

diminuição nas atividades de enzimas antioxidantes, como GSH-Px, SOD, CAT, G6PD, TAC, MCF e AChE. Além disso, é observada uma diminuição nas concentrações de minerais traços antioxidantes, como Zn, Mn, Se e BchE. Por outro lado, são registrados níveis elevados de MDA e fragilidade osmótica eritrocitária, associados a um aumento na concentração de ferro sérico (Esmailnejad *et al.*, 2018).

4.5.3.2 ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática)

O teste competitivo de ELISA (cELISA) é amplamente reconhecido como o principal método sorológico para identificação de anticorpos contra *Anaplasma* em bovinos, destacando-se por sua alta sensibilidade e especificidade. Este teste utiliza um anticorpo monoclonal (MAb) direcionado à proteína de superfície 5 (MSP5) do patógeno. Normalmente, o diagnóstico definitivo baseia-se inicialmente em sorologia, seguida por testes moleculares, conforme indicado em estudos recentes (Farooqi *et al.*, 2018; Rehman *et al.*, 2019).

O teste é realizado utilizando um antígeno solúvel purificado, derivado de amostras de sangue com alta parasitemia de *A. marginale*, o ELISA adsorve esse antígeno em placas de poliestireno. Os anticorpos específicos presentes no soro a ser testado reconhecem o antígeno adsorvido na placa, seguido pela adição de um conjugado contendo anticorpos anti-IgG bovina marcados com uma enzima, como peroxidase ou fosfatase alcalina. A reação enzimática resulta em uma mudança colorimétrica, cuja intensidade está diretamente relacionada à concentração de anticorpos no soro. Esse método sensível e específico pode ser automatizado, permitindo o processamento eficiente de muitas amostras (Barry *et al.*, 1986; Nakamura *et al.*, 1988; Nielsen *et al.*, 1996; Tizard, 2013)

O teste de ELISA por competição (cELISA) utiliza a proteína recombinante de 19kDa do *A. marginale* (MSP5) como antígeno. Nesse teste, a MSP5 é reconhecida pelo anticorpo monoclonal ANAF 16C1, cuja especificidade varia conforme o anticorpo monoclonal utilizado. Soros positivos são aqueles com taxa de inibição inferior a 75%, indicando competição entre os anticorpos do soro e o anticorpo monoclonal pelos mesmos epítomos do antígeno recombinante (Böse *et al.*, 1995; Knowles *et al.*, 1996).

4.5.3.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

No método de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), esfregaços sanguíneos que contêm eritrócitos parasitados são empregados como antígenos (Madruga *et al.*, 1986). Os anticorpos IgG presentes no soro em teste reagem com esses antígenos e são posteriormente identificados através de anticorpos anti-IgG bovina, os quais estão marcados com isotiocianato de fluoresceína (conjugado). Apesar da sensibilidade deste teste, sua padronização tem sido desafiada devido a variações na intensidade de fluorescência, presença de fluorescência inespecífica, ocorrência de rastros de pontos irregulares, fadiga e subjetividade na interpretação por parte do operador (Goff *et al.*, 1985; Böse *et al.*, 1995; Gonzalez *et al.*, 1978).

4.5.3.4 Fixação do complemento

A técnica de Fixação de Complemento (CF) é baseada nas reações dos anticorpos IgM, os quais são produzidos nos estágios iniciais da infecção primária. Esta metodologia tende a ser menos sensível em animais com infecções crônicas por *A. marginale*, uma vez que o IgM é predominante no período inicial da infecção (Bose *et al.*, 1995).

Nessa técnica, são utilizados antígenos derivados de eritrócitos infectados, apresentando uma sensibilidade relativamente baixa e especificidade alta (González *et al.*, 1978). Os reagentes empregados, tais como complemento, sistema hemolítico e antígeno, são titulados em relação ao soro, permitindo a avaliação do grau de hemólise (Kuttler, 1975). No entanto, é importante destacar que podem ocorrer variações nos títulos entre os isolados de diferentes cepas de *A. marginale* (Kuttler *et al.*, 1984). Sua aplicação tem sido limitada devido principalmente à complexidade de realização (Nielsen *et al.*, 1996).

4.5.3.5 Técnicas de Aglutinação

As técnicas de aglutinação se baseiam na reação entre anticorpos bivalentes e antígenos polivalentes, resultando na formação de macromoléculas visíveis. Existem variações dessas técnicas, incluindo a aglutinação em tubo capilar, aglutinação rápida e congutinação rápida. Na aglutinação em tubo capilar, uma reação positiva é

indicada pela formação de aglomerados suspensos, distribuídos irregularmente dentro do tubo capilar (Vega y Murguia, 1993).

Inicialmente utilizada como uma técnica de campo, a aglutinação rápida foi aprimorada com a adição do fator sérico bovino (Kuttler, 1975) para evitar reações falso-negativas, aumentando assim a sensibilidade no diagnóstico de anticorpos contra *A. marginale*. Este fator sérico fornece complemento e congulinina, uma proteína presente no soro de ruminantes, responsável pela reação de congutinação (Rose *et al.*, 1978).

Dessa forma, o teste passou a ser conhecido como teste de congutinação rápida (TCR) ou teste do cartão, sendo amplamente utilizado em levantamentos epidemiológicos (Madruça *et al.*, 1986). Estes testes têm a sensibilidade relativamente baixa e especificidade alta (Marana *et al.*, 2006; González *et al.*, 1978).

5 CAPÍTULO II — EXPERIMENTO

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Considerações éticas

O projeto de pesquisa foi encaminhado para avaliação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG) e obteve aprovação mediante o protocolo número 76/2021.

5.1.2 Local e período

O período de realização do experimento foi de dezembro de 2022 a novembro de 2023.

O experimento foi conduzido em uma propriedade leiteira comercial localizada no município de Sete Lagoas, Minas Gerais (Latitude 19°19' 24"S e Longitude 44°10' 46"W) (Figura 1). Nesta propriedade, as bezerras da raça Holandesa nascem em baias maternidade, que são forradas com serragem e situadas ao lado da maternidade (sistema de *compost barn*). Durante a fase de cria, as bezerras são transferidas para um galpão, onde permanecem alojadas em um sistema de *compost barn*, até atingirem a puberdade (Figura 2) com acesso a solário diariamente (piquete de tifton 85). Após esse período, as bezerras são transferidas para outra instalação semelhante. O monitoramento de rotina da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é realizado através da avaliação semanal da temperatura retal das bezerras entre 75 e 300 dias de idade. Animais com temperatura retal superior a 39,4° C recebem tratamento tanto para Anaplasmosose quanto para Babesiose, embora não haja um diagnóstico específico da doença ou do agente responsável.

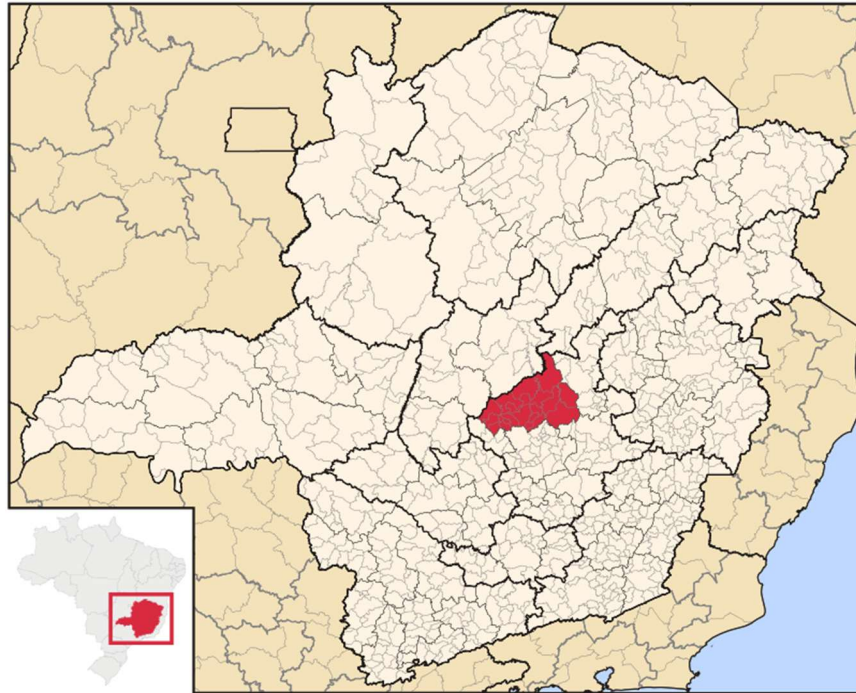


Figura 1 — Localização do município de Sete Lagoas, Mesorregião de Belo Horizonte, Minas Gerais.



Figura 2 — Visão interna de galpão do tipo *compost barn*, com bezerras separadas em grupos de acordo com peso.

5.1.3. Animais e grupos experimentais

Foram acompanhadas 74 bezerras da raça Holandês, a partir do dia do nascimento até os seis meses de idade, divididas em dois grupos: G1- 19 bezerras positivas para *A. marginale* no dia do nascimento e G2- 55 bezerras negativas. O diagnóstico de anaplasmoze foi realizado através da coleta de sangue das bezerras logo após o nascimento, antes da colostragem e análise pelo método de *nested* PCR (nPCR).

Tabela 1 — Distribuição e características dos grupos amostrais para avaliação do comportamento da anaplasmoze de origem de infecção congênita em bezerras Holandês.

Grupo	N	Característica
1	19	Bezerras positivas no PCR para <i>Anaplasma marginale</i> ao nascimento
2	55	Bezerras negativas no PCR para <i>Anaplasma marginale</i> ao nascimento

5.1.3.1 Cálculo do tamanho da amostra

Com base em um estudo piloto anterior, observou-se que a distribuição de probabilidade das medidas de riquetsemia segue uma distribuição similar à distribuição Gama, ajustada para incluir valores iguais a zero. Além disso, sabe-se que a doença segue um padrão temporal que inclui períodos pré-patente, patente, convalescença e cura. Com essas informações em mente, foram simuladas duas populações, acompanhadas temporalmente através de medidas nos tempos dia 0, semana 4 e 8 e da semana 12 até a semana 24.

Após a construção das duas populações, foi aplicado um modelo de regressão para examinar se havia diferença na média de riquetsemia entre elas. Esse procedimento foi repetido utilizando diferentes tamanhos amostrais por grupo (10, 20, 30, 40 e 50 animais) e considerando populações com médias distintas (fatores de redução iguais a 30%, 40%, 50% e 60%). Esses passos foram repetidos 100 vezes para cada combinação de tamanho amostral e fator de redução.

O poder estatístico foi então estimado como a proporção do número de vezes que o teste detectou uma diferença significativa no pico da infecção em relação ao número total de simulações para cada combinação. A probabilidade de cometer o erro

tipo I foi mantida em 5% ($\alpha = 0,05$), garantindo uma confiança de 95%. Para analisar as diferenças entre as populações, utilizou-se o ajuste de um modelo de regressão Generalized Additive Model for Location, Scale and Shape, empregando a distribuição zero ajustada Gamma. Considerando o interesse em verificar diferenças entre os grupos na riquetsemia, foi adotado um teste bicaudal.

Para isso, um total de 74 bezerras da raça Holandesa foram acompanhadas desde o dia do nascimento até os 180 dias de vida.

5.1.4 Manejo e coleta de materiais

Os partos foram acompanhados por colaboradores da fazenda durante o período de 20 de dezembro de 2022 a 20 de julho de 2023. Logo após o nascimento e a primeira cura do umbigo (com iodo a 10%), forneceu-se 10% do peso vivo em colostro fresco com valor de BRIX acima de 25 % por mamadeira, e, em situações que o colostro da mãe não apresentasse este valor recorria-se ao banco de colostro congelado da propriedade para colostragem do animal. A ordem de parto das mães das bezerras foi buscada nos arquivos zootécnicos da fazenda.

Após estes procedimentos, era realizada a coleta de sangue por punção da veia jugular, utilizando tubos de vácuo com anticoagulante (EDTA) para o PCR e tubos sem anticoagulante para obtenção de soro, visando a pesquisa de anticorpos através da técnica de ELISA.

Após 48 horas do nascimento, era realizada nova coleta de sangue para obtenção de soro, para realização da avaliação indireta da transferência de imunidade passiva nas bezerras, utilizando um refratômetro convencional e para pesquisa de anticorpos anti *A. marginale* pelo método de ELISA.

A partir do nascimento, a dinâmica da anaplasmose foi monitorada através de exames clínicos e de coletas de amostras de sangue periódicas para realização de exames de laboratório para avaliação da infecção por *A. marginale* (PCR), riquetsemia (esfregaço de sangue), presença de anticorpos anti *A. marginale* (ELISA) e avaliação do volume globular (microhematócrito).

Para tanto, as coletas de material foram realizadas no dia do nascimento, aos dois dias, quatro e oito semanas de vida. A partir daí até a vigésima quarta semana de vida, as coletas foram semanais (Figura 1).

No momento de coleta era realizada a mensuração da temperatura retal e as coletas sangue por punção da veia jugular, utilizando tubos de vácuo com anticoagulante (EDTA) para realização do microhematócrito, esfregaço sanguíneo e PCR e, em tubos sem anticoagulante, para obtenção de soro para realização de testes de ELISA.

Figura 3 — Frequência de coletas e avaliações em bezerras da raça Holandesa do nascimento até 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para *A. marginale* ao nascimento e G2 – bezerras negativas)

ATIVIDADES	MOMENTOS																
	Dias		Semanas de vida														
	0	2	4	8	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
PCR	X		X	X	X				X				X				X
ELISA INDIRETO	X	X	X	X	X				X				X				X
GENOTIPAGEM	X																
PROTEÍNA TOTAL		X															
VOLUME GLOBULAR			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
TEMPERATURA			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
ESFREGAÇO SANGUÍNEO			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
OCORRÊNCIAS DE SAÚDE	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

5.1.5 Exames laboratoriais

5.1.5.1 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e Ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA)

A extração do DNA a partir das amostras de sangue total foi realizada utilizando o Kit de Purificação de DNA Genômico da Wizard® (Promega), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante, com uma proporção de 300 µL de sangue total.

Para amplificar o DNA extraído, foi utilizado o termociclador automático Bio-Rad T100® Thermal Cycler. Os iniciadores, produtos e programas utilizados em cada reação estão detalhados nos segmentos a seguir. No contexto da amplificação do DNA de *A. marginale*, o foco foi o gene MSP4 da *A. marginale*, seguindo a abordagem

convencional descrita por De la Fuente *et al.* (2008). Além disso, para aumentar a sensibilidade, foi aplicada a técnica da *nested* PCR (nPCR), conforme a abordagem delineada por Silveira (2012). Os iniciadores da reação, os produtos obtidos e o programa utilizado estão descritos na Tabela 3.

Tabela 2 — Sequência de iniciadores utilizados e os respectivos produtos obtidos para a primeira e segunda reação para diagnóstico de *A. marginale*.

Reação	Sequência (5' para 3')	Iniciador	Alvo	Produto (pb)	Referência
1ª reação	GGGAGCTCCTATGAATTACAG AGAATTGTTTC CCGGATCCTTAGCTGAACAGG AATCTTGC	MSP45 MSP43	MSP4	872	De la Fuente <i>et al.</i> , 2008.
2ª reação	CGCCAGCAAACCTTTTCCAAA ATATGGGGACACAGGCAAAT	AnapF AnapR	MSP4	294	De la Fuente <i>et al.</i> , 2008.

A tabela 3 apresenta o programa utilizado na 1ª e 2ª reação (nPCR) para identificação de *A. marginale*.

Tabela 3 — Programa utilizado para realização de nPCR para identificação de *A. marginale*.

PCR	Ciclo	Passo	Temperatura (°C)	Duração (min)	Alvo
<i>Nested</i> (1ª reação)	1 (1x)	Desnaturação inicial	94	5	
	2 (29X)	Desnaturação	92	1	
		Anelamento	54	1	MSP4
		Extensão	72	2	
	3 (1x)	Extensão final	72	8	
4	<i>Hold</i>	4	----		
<i>Nested</i> (2ª reação)	1 (1x)	Desnaturação inicial	94	5	
	2 (29X)	Desnaturação	92	1	
		Anelamento	59	1	MSP4
		Extensão	72	2	
	3 (1x)	Extensão final	72	8	
4	<i>Hold</i>	4	----		

Para a realização da eletroforese, utilizou-se o revelador Brometo de etídio (5 µL). Em seguida, foi aplicado em cada poço no gel de agarose a 1.5% em meio tampão (TAE 0,5X) 5 µL do produto da amplificação. Os produtos do nPCR foram submetidos à eletroforese em gel sob o potencial elétrico de 100 volts por 45 minutos e foram observados em uma lâmpada ultravioleta. Como padrão de peso molecular, foi utilizado o 1 Kb Ladder Plus (Promega®).

5.1.5.2 Ensaio de imun absorção enzimática (ELISA)

As amostras de soro de bezerras acompanhadas durante este procedimento foram aliqüotadas no volume de 0,5 ml e enviadas congeladas para realização do teste no laboratório IMUNODOT diagnósticos veterinários, localizado na cidade de Jaboticabal, São Paulo.

Durante a realização do ELISA, os antígenos de *A. marginale* utilizando proteína recombinante MSP5 (Knowles *et al.*, 1996), foram adsorvidos a placas de poliestireno. Em seguida, os soros controles e soros dos animais dos grupos experimentais foram adicionados aos poços da placa na diluição de 1:100. Após a incubação, foi adicionado o conjugado, anticorpos anti-IgG de bovino ligados a uma enzima fosfatase alcalina (SIGMA). Posteriormente, a reação antígeno-anticorpo foi revelada utilizando um substrato da enzima utilizada. As placas foram então levadas para leitura em um aparelho de ELISA, onde o resultado foi expresso numericamente.

O cálculo do ponto de corte (PC) para classificação das amostras foi realizado utilizando a média dos Controles Negativos multiplicada por 2,5 (valor da constante/fator de correção). As amostras que apresentaram valor de densidade óptica igual ou superior ao PC foram consideradas positivas.

Os controles positivos e negativos, além do ponto de corte para classificação de amostras positivas utilizados no ensaio, estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 — Valores de densidade óptica dos soros controles e ponto de corte utilizados em teste de ELISA.

Densidade Óptica	TEMPOS							
	0 hrs	48 hrs	4 sem	8 sem	12 sem	16 sem	20 sem	24 sem
Controle negativo 1	0,107	0,105	0,108	0,112	0,117	0,112	0,119	0,121
Controle negativo 2	0,117	0,116	0,113	0,107	0,106	0,107	0,107	0,128
Controle negativo 3	-	-	-	-	-	-	-	0,117
Controle Positivo 1	1,018	1,200	1,096	2,013	1,005	2,013	2,754	1,421
Controle Positivo 2	2,000	1,006	1,573	1,001	1,906	1,131	1,566	1,199
Controle Positivo 3	-	-	-	-	-	-	-	1,504
Ponto de corte	0,280	0,276	0,276	0,273	0,278	0,273	0,282	0,305

5.1.5.3 Exames de esfregaço sanguíneo e microhematócrito

O volume globular foi medido utilizando a técnica do microhematócrito, enquanto os esfregaços sanguíneos foram corados com kit Panótico rápido® Laborclin. A determinação da riquetsemia foi realizada examinando 40 campos ao microscópio óptico (Nikon® E200MV) com imersão e aumento de 100x. A riquetsemia refere-se à proporção média de hemácias infectadas por *A. marginale* dividida pelo número médio de hemácias em campos homogêneos (IICA, 1987).

5.1.6 Resposta clínica de bezerras frente a reinfecção natural e tratamento

Todas as bezerras foram submetidas a avaliações semanais da 12^a à 24^a semana de vida, que incluíam a mensuração da temperatura retal, a confecção de esfregaços sanguíneos e a determinação do hematócrito com o objetivo de acompanhar a evolução do quadro clínico da Anaplasmosose durante a fase de desafio natural. Essas avaliações foram realizadas entre 06:00 e 08:30h, para evitar a interferência da temperatura ambiente nos horários mais quentes do dia.

Bezerras com um valor de hematócrito inferior a 24% foram classificadas como anêmicas, seguindo os critérios descritos por Radostits *et al.* (2016). Os critérios utilizados para tratamento das bezerras com Anaplasmosose foram: queda no hematócrito correspondente a 30% do valor basal de cada indivíduo, juntamente com a presença de riquetsemia patente de *A. marginale*, ou quando a riquetsemia

diagnosticada no esfregaço sanguíneo foi igual ou superior a 2%, (Facury Filho *et al.*,2012).

Os tratamentos foram realizados com Tetraciclina (*Oxitrat LA plus -laboratório MSD*) na dosagem de 20mg/kg de peso vivo, administrada por via intramuscular em uma única aplicação.

5.1.7 Avaliação clínica de bezerras com Anaplasmosse

Essa avaliação foi realizada com base no Escore de Classificação proposto por Silva (2017) para acompanhar os parâmetros da avaliação clínica de animais com Anaplasmosse, conforme tabela 5.

Tabela 5 — Valores de temperatura retal, hematócrito, riquetsemia e recuperação utilizados como base para criação de Escore de Grau de severidade da Anaplasmosse.

	0	1	2	3	4	5	6	7
Temperatura retal	≤ 39,3°C	39,4°C	39,5° C	≥ 40,1°C				
Hematócrito	≥ 25%	24%;	20 a 23%	14 a 19%	10 a 13%	≤ 9%		
Riquetsemia	0%	0,01 a 0,05%	0,06 a 1%	1,01 a 2%	2,01 a 3%	3,01 a 4%	4,01 a 5%	≥ 5,01%
Recuperação	sem tratamento	após tratamento		não recuperou				

Fonte: Adaptado de Silva (2017)

O grau de severidade dos casos será determinado pelo somatório (mínimo de 0 e máximo de 18 pontos) dos escores citados (Temperatura retal + Hematócrito + Riquetsemia + Recuperação) e interpretados segundo tabela 6 abaixo:

Tabela 6 — Interpretação da Severidade da Anaplasmosse bovina, segundo grau de Escore de classificação proposto por Silva (2017)

Grau de evolução	Normal	Discreta	Moderada	Intensa
Severidade da Anaplasmosse	0-1	2-5	6-11	12-18

5.1.8 Ocorrências de saúde

Bezerras com temperatura retal superior a 39,3° C passarão por exame clínico completo, a fim de estabelecer diagnósticos diferenciais e posterior registro do evento. O tratamento preconizado seguirá os protocolos previstos na propriedade.

5.1.9 Tipificação dos isolados responsáveis pela infecção congênita

Amostras de sangue total, 300 µL de sangue, de bezerras positivas ao nascimento e no momento da infecção natural foram extraídas utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega®). O DNA extraído foi amplificado utilizando termociclador automático (Eppendorf Mastercycler® ou Bio-Rad T100 Thermal Cycler®). No contexto da amplificação do DNA de *A. marginale*, o foco é o gene MSP1α da *A. marginale*. Os iniciadores da reação, produtos obtidos e o programa utilizado estão descritos na tabela 7.

Tabela 7 — Sequência de iniciadores utilizados e os respectivos produtos obtidos para a reação de diagnóstico de *A. marginale*.

Reação	Sequência (5' para 3')	Iniciador	Alvo	Produto (pb)	Referência
Convencional	TGTGGTTGTCCTCTTTCCCGATGT CACCGCCAAACATGAAGTCGACAA	MSP1αNF2 MSP1αNR2	<i>msp1α</i>	800	Bastos et. al (2009)

A tabela 8 apresenta o programa utilizado na reação de PCR para identificação de *A. marginale*.

Tabela 8 — Programa utilizado para realização de PCR para identificação de *A. marginale*.

PCR	Ciclo	Passo	Temperatura (°C)	Duração (min)	Alvo
Convencional	1 (1x)	Desnaturação inicial	94	5	<i>msp1α</i>
		2 (35X)	Desnaturação	94	
	Anelamento		60	1	
	Extensão		72	1,5	
	3 (1x)	Extensão final	72	5	

Para a realização da eletroforese, foi utilizado o revelador Brometo de etídio (5 μ L). Foi aplicado em cada poço no gel de agarose a 1.5% em meio tampão (TAE 0,5X) 5 μ L do produto da amplificação. Os produtos do PCR correram em gel sob o potencial elétrico de 100 volts por 45 minutos e foram observados em lâmpadas ultravioleta. Utilizou-se 1 Kb Ladder Plus (Promega®) como padrão de peso molecular.

As amostras positivas para *A. marginale* (gene MSP1 α) foram purificadas e enviadas para sequenciamento genético em duplicata. Uma amostra foi submetida ao sequenciamento utilizando um iniciador direto, enquanto a outra foi sequenciada utilizando um iniciador reverso. As identidades das sequências foram confirmadas usando BLASTN ([//www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)). As sequências brutas foram montadas com o software BioEdit 7.2.5, cuidadosamente verificadas e correções manuais foram realizadas quando necessário.

Por fim, as sequências de pares de bases foram traduzidas em aminoácidos e alinhadas usando o software Mega X. Para montar os genótipos de *A. marginale*, as repetições em tandem foram identificadas com o Software Repeat Analyzer versão 3.0. Os genótipos foram então comparados aos depositados no GenBank.

5.1.9.1 Alinhamento e análise filogenética

As sequências repetidas de nucleotídeos e aminoácidos de *A. marginale* MSP1 α foram utilizadas para alinhamento e análise filogenética. O alinhamento de múltiplas sequências foi realizado usando o programa Mega X, através do algoritmo Clustal W. Os nucleotídeos foram codificados como caracteres discretos e não ordenados, representados por cinco possíveis estados de caracteres: A, C, G, T ou N, enquanto as lacunas foram codificadas como dados faltantes. As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o software MEGA X. Foram realizadas análises de Neighbor joining, utilizando pesos iguais para todos os caracteres e substituições. A estabilidade ou precisão das topologias inferidas foi avaliada por meio de análises de bootstrap com 500 replicações.

As sequências de referência para análise filogenética foram obtidas por meio de uma busca BLAST no banco de dados GenBank. Os dez principais resultados do

BLAST por sequência (valores $E < 1,0 \times 10^{-5} >$ 480 pb de comprimento e com informações disponíveis de país e data de coleta) foram recuperados. As sequências repetidas no conjunto de dados foram removidas. Isto resultou num conjunto de dados final de 28 sequências.

A história evolutiva foi inferida por meio do método Neighbor-Joining (Saitou *et al.*, 1987), com a árvore ideal apresentada. A porcentagem de árvores replicadas, nas quais os táxons associados foram agrupados no teste de bootstrap (500 réplicas), é exibida ao lado dos ramos (Felsenstein, 1985). A representação da árvore está em escala, com os comprimentos dos ramos expressos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas utilizadas na inferência da árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método baseado na matriz JTT (Kimura, 1980) e estão expressas nas unidades do número de substituições de aminoácidos por local. A variação da taxa entre os locais foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 0,05). Esta análise foi conduzida com 29 sequências de aminoácidos. Todas as posições ambíguas foram excluídas para cada par de sequências (opção de exclusão aos pares), resultando em um total de 151 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas utilizando o software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

5.1.10 Análises estatísticas

Foi realizada uma análise descritiva dos dados mensurados. Esta análise descritiva avaliará todas as variáveis numéricas e categóricas. Para as variáveis numéricas, serão calculados os principais índices de estatística descritiva (e.g. média, mediana, desvio-padrão, coeficiente de variação, quartis etc.). Esta análise será realizada para todos os valores disponíveis neste banco de dados e separadamente por grupos, a fim de fornecer um perfil geral e específico para cada grupo. As seguintes variáveis foram avaliadas: VG (%); Riquetsemia (%); Temperatura retal (C°); Tratamento; PCR e ELISA.

Para essas variáveis foram ajustados modelos de regressão para dados longitudinais (i.e., com coletas ao longo do tempo), buscando identificar diferenças entre dois grupos ao longo do tempo. Também se avaliou as diferenças nas proporções de recuperação entre os dois grupos.

Para testar as diferenças entre grupos, levando em consideração as semanas, foram ajustados modelos lineares generalizados mistos para cada variável resposta. Estes modelos de regressão são adequados a dados com realização de medidas repetidas no mesmo indivíduo ao longo do tempo, sendo bastante flexíveis quanto à distribuição de probabilidade da variável resposta. O grupo e a semanas, juntamente com a interação entre essas duas variáveis, foram utilizados como preditores (variáveis independentes). As semanas foram consideradas com uma variável categórica nesse modelo. Escolheram-se as distribuições de probabilidade mais adequadas para cada variável resposta de interesse, pela análise gráfica dos resíduos. Para as variáveis com distribuições bem-comportadas, utilizou-se a distribuição gaussiana e para variáveis com valores positivos e distribuições assimétricas, utilizou-se a distribuição gama, que é adequada para modelar dados com esta característica. Para variáveis dicotômicas utilizou-se a distribuição binomial (regressão logística). Após o ajuste do modelo, testaram-se os efeitos dos grupos, das semanas e da interação entre elas, de forma global (overall), e calcularam-se os valores médios e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo e para cada semana. Para verificar a significância da diferença entre grupos para cada semana, ou da diferença entre semanas para cada grupo, foi necessária a aplicação de testes de comparações múltiplas (pairwise) e aplicou-se a correção de Sidak.

Para testar a diferença de proporção entre os dois grupos foi aplicado o teste Qui-Quadrado para a tabelas de contingência e todas as análises estatísticas foram realizadas através do software R versão 4.3.1 (R Core Team, 2023).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Frequência de transmissão congênita

No período de dezembro de 2022 a julho de 2023 ocorreram 205 partos de bezerras da raça Holandesa nesta fazenda. Em uma amostragem aleatória de 86 bezerras (41,95 % dos partos), foram encontradas 21 bezerras *nPCR* positivas ao nascimento para *A. marginale*. Dentre as bezerras positivas, 10 indivíduos eram filhas de fêmeas primíparas e 11 de fêmeas múltíparas (Tabela 9).

Tabela 9 — Frequência transmissão congênita de *A. marginale* em bezerras da raça Holandesa

Número de Nascimentos (Dez/22 a Jul/23)	Número de Amostras analisadas	Número de bezerras positivas	Frequência de Transmissão congênita	Frequência de mães primíparas	Frequência de mães múltíparas
205	86	21	24,4%	47,6%	52,4%

A análise dos dados relativos à transmissão congênita de *A. marginale* em bezerras da raça Holandesa em uma fazenda comercial em Sete Lagoas, Minas Gerais, no período de dezembro de 2022 a julho de 2023 revelou uma frequência considerável de (24,4%). Estudos prévios (Tabela 10) destacaram a transmissão vertical como uma via importante de disseminação da Anaplasmosse bovina.

Tabela 10 — Frequência de transmissão congênita de *A. marginale* em bovinos descrita na literatura científica.

Autor	Ano	Frequência de Transmissão congênita	Teste	Raça	Local	Tamanho da amostra
Ribeiro <i>et. al</i>	1995	2,1 %	RIFI	Fetos de abatedouro	Minas Gerais (BR)	97
Ribeiro <i>et. al</i>	1995	36%	DOT ELISA	Bovinos de Corte	Minas Gerais (BR)	11
Benesi <i>et. al</i>	1999	100% (Anaplasmosse - 7d)	Esfregaço Sanguíneo	Jersey	São Paulo (BR)	1
Gonçalves <i>et al</i>	2005	100% (Anaplasmosse)	Esfregaço	Girolando	São Paulo (BR)	1
Cavalcanti	2007	5,88%	nPCR	Nelore	São Paulo (BR)	17
Pypers <i>et. al</i>	2011	100%	Esfregaço	Brahman x	África do Sul	1

Maldonado <i>et al.</i>	2012	(Anaplasmosse 1d) 20,69%	PCR	Santa Gertrudis Brahman	Venezuela	29
Girard <i>et. al</i>	2012	100% (Anaplasmosse 1 d)	Esfregaço	Nelore	São Paulo (BR)	1
Grau <i>et al.</i>	2013	10,5%	PCR	Bovinos de Corte	Sul (BR)	19
Meneses	2013	10%	nPCR	Holandesa	Minas Gerais (BR)	30
Nazar <i>et al.</i>	2018	13,7%	RT PCR	Bovinos de Leite	Paquistão	29
Brito <i>et al.</i>	2019	68,75%	nPCR	Girolando	Rondônia	16
Atif <i>et. al</i>	2021	31 %	nPCR + cELISA	Bovinos de Leite	Paquistão	32
Andrade	2021	19,31%	nPCR + RIFI	Fetos de abatedouro	Minas Gerais (BR)	145
Coelho	2022	41,6%	nPCR	½ Angus Nelore	Minas Gerais (BR)	125
Facury Filho (Comunicação pessoal)	2022	100% (Anaplasmosse) 1d	<i>Squash</i> cerebral	½ Angus Nelore	Minas Gerais (BR)	1

O aumento na frequência de resultados positivos pode ser atribuído a uma série de fatores, que incluem avanços nos métodos de diagnóstico, como a adoção de técnicas mais sensíveis, aumento do tamanho das amostras e características específicas das explorações pecuárias. Especificamente, o avanço na sensibilidade das técnicas de PCR, incluindo o uso de PCR em tempo real e *Nested* PCR, tem contribuído para esse aumento.

Aumentos no tamanho das amostras, como observado nos trabalhos de Costa *et al.* (2016) e Andrade (2021), também evidenciaram uma maior incidência de transmissão por esta via específica. É importante ressaltar que fatores locais e características específicas dos rebanhos podem influenciar na prevalência dessa forma de transmissão. Além disso, a alta variabilidade genética de *A. marginale*, com várias cepas circulando em Minas Gerais, também é um aspecto a ser considerado (Pohl *et al.*, 2013).

A distribuição da transmissão congênita parece ser relativamente equilibrada entre mães primíparas e múltíparas (Tabela 9). Isso sugere que a transmissão vertical nessa fazenda não é afetada significativamente pela ordem de parto das mães,

possivelmente devido à presença de vetores na recria (carrapatos e moscas) e nas vacas em lactação que ficam alojadas em compost barn (moscas). De acordo com Eriks et al. (1993), os animais uma vez infectados exibem baixos níveis de eritrócitos parasitados, com baixa riquetsemia de 0,01%, e, portanto, continuam sendo importantes reservatórios.

6.2 Dinâmica da infecção através de técnicas moleculares e esfregaço sanguíneo

O acompanhamento molecular da presença do *A. marginale* em amostras de sangue total foi realizado usando a técnica de nPCR, conforme mostrado na Tabela 10. Foram analisados dois grupos: o grupo 1, composto por 19 bezerras que foram positivas ao nascimento, e o grupo 2, composto por 19 bezerras que foram negativas ao nascimento. A seleção das 19 bezerras dentro das 55 inicialmente disponíveis foi baseada na proximidade de idade.

Foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) nos momentos 4 semanas e 8 semanas de vida. Com 4 semanas de idade, 42,1 % das bezerras que nasceram positivas (G1) estavam positivas no PCR, enquanto apenas uma das bezerras que nasceram negativas eram positivas (5,3%), evidenciando a primo-infecção por *A. marginale* neste animal. Na semana 8 a frequência de positivos foi de 78,9% e 42,1% respectivamente no G1 e G2. Após as 12 semanas de vida, todos os animais foram testados positivos para nPCR, persistindo assim até o período de 24 semanas. (Tabela 11; Figura 4)

Tabela 11 — Frequência de bezerras da raça Holandesa nPCR positivas para *A. marginale* do nascimento até 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para *A. marginale* ao nascimento e G2 – bezerras negativas)

Grupo	Frequência	Tempo						
		0 hrs	4 sem	8 sem	12 sem	16 sem	20 sem	24 sem
1 (n=19)	Absoluta	19	8	15	19	19	19	19
	Relativa (%)	100 ^{Ab}	42,1 ^{Aa}	78,9 ^{Aab}	100 ^{Aab}	100 ^{Aab}	100 ^{Aab}	100 ^{Aab}
2 (n=19)	Absoluta	0	1	8	19	19	19	19
	Relativa (%)	0,0 ^{Ba}	5,3 ^{Ba}	42,1 ^{Bab}	100 ^{Ab}	100 ^{Ab}	100 ^{Ab}	100 ^{Ab}

Letras diferentes, maiúsculas entre grupos e minúsculas entre momentos do mesmo grupo, indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

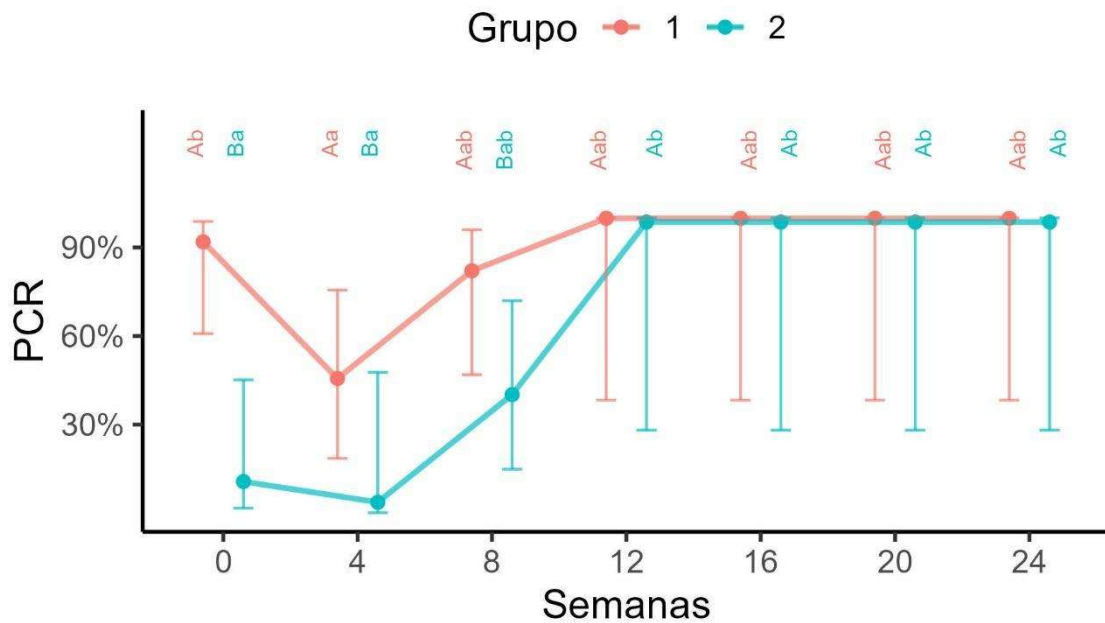


Figura 4 — Frequência de bezerras da raça Holandesa nPCR positivas para *A. marginale* do nascimento até 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para *A. marginale* ao nascimento e G2 – bezerras negativas)

Letras diferentes, maiúsculas entre grupos e minúsculas entre momentos do mesmo grupo, indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

A diferença entre os grupos no dia 0 no teste de PCR foi o critério para formação dos grupos experimentais. A incidência de animais positivos no grupo 2 demonstra o comportamento da primoinfecção nesta fazenda; posteriormente, todos os animais estão PCR positivos após 12 semanas. A incidência da primo-infecção por *A. marginale* observada nessa propriedade foi de 5,3% (1 animal) entre 0 e 4 semanas, 36,8% (7 animais) entre 5 e 8 semanas e de 57,9% (11 animais) entre 9 e 12 semanas.

Na quarta e oitava semanas, foram observadas taxas de negatividade ao teste de PCR de 58% (11/19) e 21% (4/19), respectivamente, nas bezerras do Grupo 1. Esses resultados podem ser explicados pela presença de uma baixa riquetsemia, que não foi detectada pelo teste, possivelmente abaixo do limite de 30 eritrócitos infectados por mililitro de sangue. Esse valor mínimo de detecção foi identificado por Torioni de Echaide *et al.* (1998) ao usar MSP5 como alvo em um ensaio de nPCR

Em relação ao grupo 1 ter maior frequência em 4 e 8 semanas de bezerras positivas ao PCR, isso se deve ao somatório de animais com transmissão vertical e animais com reinfecção pelo agente. As frequências encontradas confirmam a presença da circulação de *A. marginale* nas categorias de animais jovens, e essa

exposição precoce é importante, uma vez que os bezerros demonstram uma melhor resposta à infecção e sintomas clínicos menos evidentes, conforme Palmer (2002) e Ribeiro *et al.* (2003).

Estes achados estão de acordo com a descrição de Eriks *et al.* (1989), que relata que em regiões endêmicas com rebanhos autóctones e presença de vetores, os animais adquirem o *A. marginale* nos primeiros dias de vida, e o parasito torna-se detectável entre 50 e 74 dias de idade. O mecanismo para essa menor susceptibilidade dos bezerros não é totalmente compreendido, no entanto, de acordo com (Ribeiro e Passos, 2002)., isso pode estar relacionado à imunidade passiva, uma resposta imunológica mais eficiente através da imunidade celular resultante da persistência do timo, da alta atividade eritropoiética da medula óssea e proteção conferida pela hemoglobina fetal.

No acompanhamento por esfregaço sanguíneo dos grupos experimentais (Tabela 12), foi observado que, nos momentos 0, 4 e 8 semanas, todos os animais, de ambos os grupos apresentaram resultados negativos. Entretanto, a partir das 12 semanas, os grupos começaram a positivar para *A. marginale*.

Os dados da Tabela 11 apresentam a frequência de animais positivos para *A. marginale* em esfregaços sanguíneos em diferentes momentos. Observou-se que, comparando os resultados da PCR, os animais foram negativos nas semanas 4 e 8 nos grupos devido à baixa sensibilidade do esfregaço sanguíneo. Conforme ressaltado por Melo (2018), a técnica de esfregaço sanguíneo não é suficientemente sensível para detectar precocemente uma riquetsemia. Nesse contexto, o PCR surge como uma alternativa viável devido à sua alta sensibilidade durante o período pré-patente da doença. De acordo com Böse *et al.* (1995), a PCR demonstrou ser 100 vezes mais sensível que o esfregaço sanguíneo, sendo assim recomendada como a primeira opção para a detecção de animais portadores.

Tabela 12 — Frequência de esfregaços sanguíneos positivos de bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para *A. marginale* ao nascimento e G2 – bezerras negativas)

Grupo	Semanas														
	4	8	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1 (n=19)															
Animais positivos (Freq.) - Absoluto	0	0	3	9	8	10	12	10	9	6	9	7	4	9	11
Animais positivos (Freq.) - Relativo	0%	0%	16%	47%	42%	53%	63%	53%	47%	32%	47%	37%	21%	47%	58%
2 (n=55)															
Animais positivos (Freq.) - Absoluto	0	0	18	35	34	30	28	26	22	19	26	24	31	32	33
Animais positivos (Freq.) - Relativo	0%	0%	33%	64%	62%	55%	51%	47%	40%	35%	47%	44%	56%	58%	60%

A frequência de animais positivos em esfregaço sanguíneo nos grupos coincide com os momentos de maior ricketsemia (13 a 20 semanas) e com os casos clínicos da Anaplasnose.

Tabela 13 — Valores médios da ricketsemia de bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para *A. marginale* ao nascimento e G2 – bezerras negativas)

Grupo	Param.	Tempo (Semanas)														
		4	8	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	RT (%)	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	0,1 ^{Ab}	0,4 ^{Abc} _d	0,4 ^{Abc} _d	0,3 ^{Abc} _d	0,8 ^{Ad}	0,5 ^{Abc} _d	0,8 ^{Ac} _d	0,1 ^{Ab}	0,3 ^{Abc} _d	0,1 ^{Abc}	0,1 ^{Ab}	0,2 ^{Abc} _d	0,2 ^{Abc} _d
2	RT (%)	0,0 ^{Aa}	0,0 ^{Aa}	0,2 ^{Abc}	0,5 ^{Abc} _d	0,9 ^{Ad}	0,6 ^{Ac} _d	0,8 ^{Ad}	0,5 ^{Abc} _d	0,3 ^{Bbc} _d	0,3 ^{Bbc} _d	0,3 ^{Abc} _d	0,2 ^{Abc}	0,2 ^{Ab}	0,2 ^{Abc}	0,2 ^{Abc}

Letras diferentes, maiúsculas entre grupos e minúsculas entre momentos do mesmo grupo, indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Em relação à ricketsemia, foram observados efeitos significativos tanto do grupo quanto da semana de estudo (Figura 5). Além disso, a interação entre esses dois fatores demonstrou uma significância marginal. Ao realizar comparações múltiplas, foram identificadas diferenças entre os dois grupos em duas semanas específicas. Na semana 18, foi observada uma média maior para o grupo 1 em comparação com o grupo 2. Por fim, na semana 19, o grupo 2 novamente apresentou uma média significativamente maior do que o grupo 1.

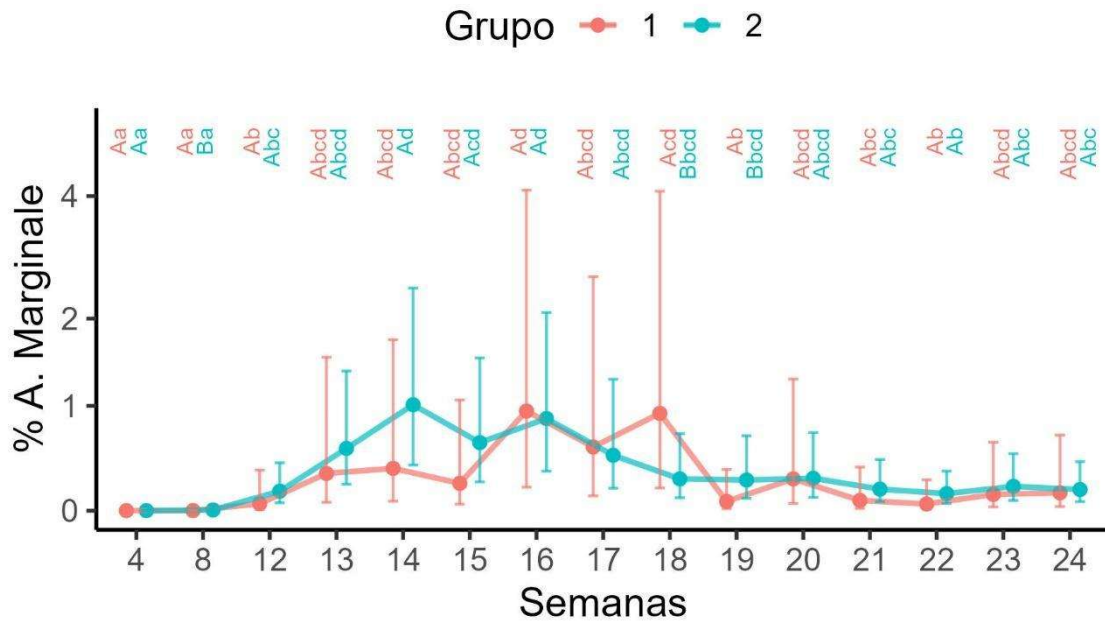


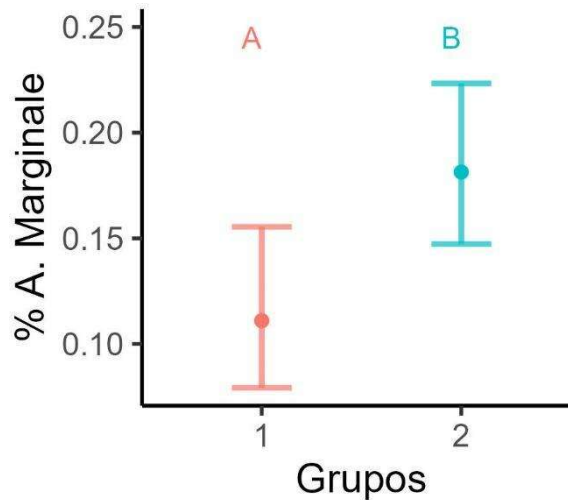
Figura 5 — Valores médios da riquetsemia de bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para *A. marginale* ao nascimento e G2 – bezerras negativas)

Letras diferentes, maiúsculas entre grupos e minúsculas entre momentos do mesmo grupo, indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

A dinâmica da riquetsemia foi semelhante entre os dois grupos. O início do período patente se deu na 12^a semana para os dois grupos e a duração da riquetsemia mais elevada ocorreu entre a 13^a e 20^a semana. O pico da riquetsemia foi observado um pouco mais precoce no G2 (semanas 14 e 16) em relação ao G1 (semanas 16 e 18).

Ao avaliar a diferença entre os grupos (figura 6), é importante considerar que a média da riquetsemia durante o período de 4-24 semanas de vida do grupo 2 foi significativamente maior que a média do grupo 1 ($p = 0,011$).

Figura 6 — Valores médios da riquetsemia de bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para *A. marginale* ao nascimento e G2 – bezerras negativas)



Letras maiúsculas diferentes entre grupos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

A menor média de riquetsemia observada no grupo 1 pode ser atribuída a uma resposta imune celular mais eficaz, resultante do contato prévio com a cepa de transmissão vertical. Após um breve período de riquetsemia, é sabido que a infecção persiste por longos períodos de forma leve o bastante para não induzir a doença, mas ainda suficientemente forte para estimular o sistema imunológico do hospedeiro. Embora a resposta imune possa ser mais eficiente nesse grupo, na reinfeção, uma nova cepa pode ter ocasionado a doença neste grupo. A capacidade de variar as características de suas proteínas de superfície é crucial para evitar o reconhecimento pelo sistema imunológico do hospedeiro, dificultando a ação das defesas naturais (Arnuphapprasert *et al.*, 2023).

Os valores médios da riquetsemia em bezerras com infecção natural por *A. marginale* estão de acordo com os valores encontrados por Vespasiano (2016) em que se observou-se nos grupos pós-casinha, risco e doentes os percentuais de 0,14 a 0,52%; 0,01 a 0,08% e 0,59 a 2,33%, respectivamente.

Outro fato a se considerar é que embora a metodologia deste estudo tenha sido longitudinal, o intervalo de avaliação semanal fez com que alguns animais não fossem observados no pico da infecção.

6.3 Comportamento da resposta imune

Após a avaliação da Proteína Sérica Total (PT) 48 horas após o nascimento, foi observado um valor médio de 6,47 g/dL de sangue em bezerras dos dois grupos experimentais. Mais de 80% dessas bezerras foram classificadas como tendo uma condição boa (entre 5,8 e 6,1 g/dL) e excelente (igual ou superior a 6,2 g/dL) em relação à transferência de imunidade passiva (Tabela 14).

Tabela 14 — Valores alvos para a avaliação da transferência de imunidade passiva (TIP) e percentual de bezerras da raça Holandesa, enquadradas de acordo com os valores de Proteína Total às 48 horas de vida

Classificação da TIP através da proteína total –(g/dl) Percentual de animais (Lombard <i>et al.</i>, 2020)	GRUPO 1 n=19	%	GRUPO 2 n=55	%
Excelente $\geq 6,2$	14	73,7	36	65,5
Boa 5,8 a 6,1	2	10,5	9	16,4
Aceitável 5,1 a 5,7	3	15,8	7	12,7
Ruim $< 5,1$	0	0	3	5,5

A análise dos resultados sorológicos do ELISA (Tabela 15) para o tempo de 48 horas após o nascimento das bezerras mostra que 78,4% (58/74) das bezerras foram reagentes ao teste, indicando a presença de anticorpos de origem colostrar. Isso significa que a maioria das bezerras teve uma adequada colostragem. Do total de bezerras, 80% apresentaram proteína total sérica superior a 5,8 g/dl e uma média geral de 6,47 g/dl de sangue.

Os bezerros nascem sem imunoglobulinas próprias, pois a placenta sinepiteliocorial cotiledonar do bovino não permite a transferência dessas moléculas da mãe para o feto. Portanto, a única maneira pela qual os bezerros podem adquirir imunoglobulinas é através da ingestão do colostro, que contém esses anticorpos maternos vitais para sua proteção contra doenças infecciosas nos primeiros dias de vida (Peter, 2013)

É interessante observar que os resultados do ELISA mostraram uma taxa de soropositividade de 78,4%, o que está alinhado com estudos epidemiológicos em áreas de estabilidade enzoótica para o agente. Andrade *et al.* (2001) encontraram uma taxa de 90% de soropositivos em bezerros holandeses na mesma faixa etária, enquanto Herman *et al.* (2013) identificaram uma taxa de 100% de soropositividade

em bezerros de corte congenitamente positivos para *A. marginale*, cujas mães eram vacas cronicamente positivas.

Tabela 15 — Frequência de bezerras da raça Holandesa positivas para *A. marginale* no teste de ELISA do nascimento até 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para *A. marginale* ao nascimento e G2 – bezerras negativas)

Grupo	Frequência	Tempo							
		0 hrs	48 hrs	4 sem	8 sem	12 sem	16 sem	20 sem	24 sem
1 (n=19)	Absoluta	1	16	16	19	18	19	19	14
	Relativa (%)	5,26	84,21	84,21	100,00	94,74	100,00	100,00	73,68
2 (n=55)	Absoluta	0	42	42	55	46	55	52	44
	Relativa (%)	0	76,36	76,36	100,00	83,64	100,00	94,55	80,00

A frequência de bezerras soropositivas logo após o nascimento, sem receber imunidade passiva via colostro, foi de apenas 5,26% (1/74). Isso levanta questionamentos sobre o período de infecção intrauterina com base nos resultados do teste de ELISA. Duas hipóteses podem ser consideradas a esse respeito.

A primeira hipótese é que a infecção tenha ocorrido antes dos 120 dias de gestação, período em que os fetos não são imunocompetentes e, portanto, não são capazes de responder sorologicamente à infecção, como observado em indivíduos persistentemente infectados pelo vírus da diarreia bovina (BVD). Estima-se que entre 2 e 5% dos fetos infectados no útero pelo BVDV permaneçam infectados persistentemente, podendo ser clinicamente normais e excretar o vírus em grandes quantidades em secreções e excreções, contribuindo para a manutenção da doença nos rebanhos (Bae *et al.*, 2000).

A outra hipótese seria a infecção nos últimos dias da gestação, levando as bezerras a não realizar a soroconversão imediatamente após o nascimento. O período de soroconversão encontrado por Lasmar *et al.* (2012) foi de 14 dias para uma vacina inativada de *A. marginale*. Esse período está de acordo com a hipótese de que a imunossupressão transitória poderia contribuir para a maior susceptibilidade dos fetos nesse período (Silva *et al.*, 2014). Inclusive, essa é a hipótese plausível ao se considerar a existência dos relatos de casos clínicos nos 15 primeiros dias de nascimento.

A literatura ainda necessita de informações sobre a patogenia da infecção intrauterina dos fetos por *A. marginale*. Os resultados das bezerras oriundas de infecção congênita e sorologicamente negativas ao nascimento, que nascem saudáveis, como observado neste estudo, levam à discussão do termo persistentemente infectado (PI) na Anaplasmosose e sua contribuição para a epidemiologia da doença.

Em 8 semanas de vida, todas as bezerras foram positivas no teste de ELISA, demonstrando soroconversão à infecção congênita no G1, à infecção natural no G2 e à reinfeção natural no G1. O período de incubação do *A. marginale* pode variar de 7 a 60 dias, com média de 28 dias (Kocan *et al.*, 2010), portanto, esses títulos são compatíveis com infecções/reinfecções precoces nessa fazenda.

6.4 Ocorrência e intensidade dos casos clínicos de Anaplasmosose

A dinâmica do volume globular revelou um efeito significativo exclusivamente para o fator semana, sugerindo uma variação considerável nos valores do VG ao longo do tempo (Figura 7). Contudo, as comparações múltiplas não indicaram diferenças entre os dois grupos em nenhuma das semanas avaliadas.

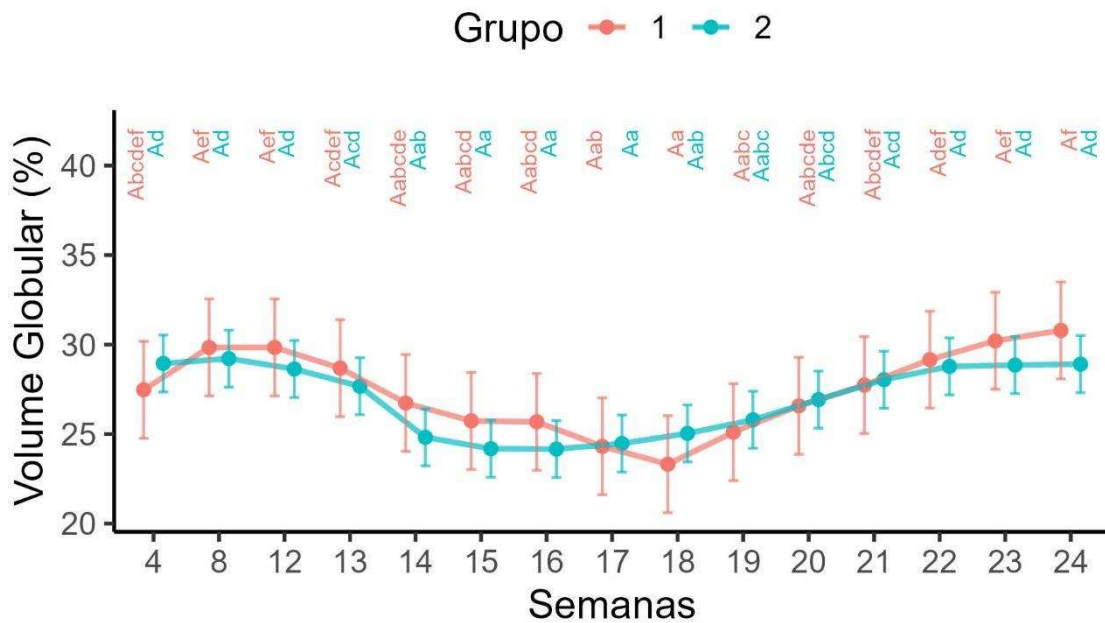


Figura 7 — Valores médios do volume globular de bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para *A. marginale* ao nascimento e G2 – bezerras negativas)

Letras diferentes, maiúsculas entre grupos e minúsculas entre momentos do mesmo grupo, indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

A variação do volume globular (VG) ao longo das semanas está intimamente relacionada ao período de patência nos grupos, e coincide com a riquetsemia, conforme evidenciado na figura 8. Nota-se que, mesmo após os picos de riquetsemia, o VG continua a declinar nos grupos, conforme foi observado por Coelho (2007). Esse processo está associado à remoção dos eritrócitos parasitados pelo sistema monocítico-fagocitário. Além disso, à medida que a infecção progride, as hemácias não parasitadas também começam a ser fagocitadas devido aos autoanticorpos que se aderem na superfície das mesmas (Waner *et al.*, 2011)

O período de patência médio (PP), apresentado na Tabela 17, é calculado desde o início da riquetsemia até o momento de menor VG nos grupos estudados, e foi observado um PP médio de 5 semanas. Coelho (2007) registrou um PP de 25 dias com o isolado UFMG1 e um PP de 13 dias com o isolado UFMG2. Outros estudos, como o de Meneses, identificaram um PP de 9 dias em bezerros inoculados com o isolado UFMG3.

De acordo com Melo (2008), ao comparar diferentes períodos pré-patentes (PP), é essencial levar em consideração os parâmetros utilizados para determinar o

menor VG e o manejo dos animais durante o estudo. Um PP mais longo pode estar diretamente ligado ao momento do tratamento administrado. Neste experimento, o monitoramento através de esfregaço sanguíneo e VG foi semanal, o que pode ter levado ausência de tratamento antes do pico da riquetsemia.

O período de convalescência (PC), conforme mostrado na Tabela 19 que representa a fase de recuperação, foi de 1 semana nos grupos, o que equivale a cerca de 80% do tempo de VG de 4 semanas. Este tempo de recuperação pode estar associado às baixas riquetsemias, que têm uma relação estreita com a intensidade da anemia (Coelho, 2007)

Durante a fase de portador de *A. marginale*, que ocorre após o período de convalescência, é comum observar variações discretas no hematócrito e na riquetsemia, como ocorreu em ambos os grupos, mesmo na ausência de manifestações clínicas evidentes. Isso tem uma grande importância para o desenvolvimento da imunidade e o estabelecimento da condição de portador (Kieser *et al.*, 1990).

Embora tenha havido diferença na média de riquetsemia entre os grupos, não houve diferença na média de VG entre eles.

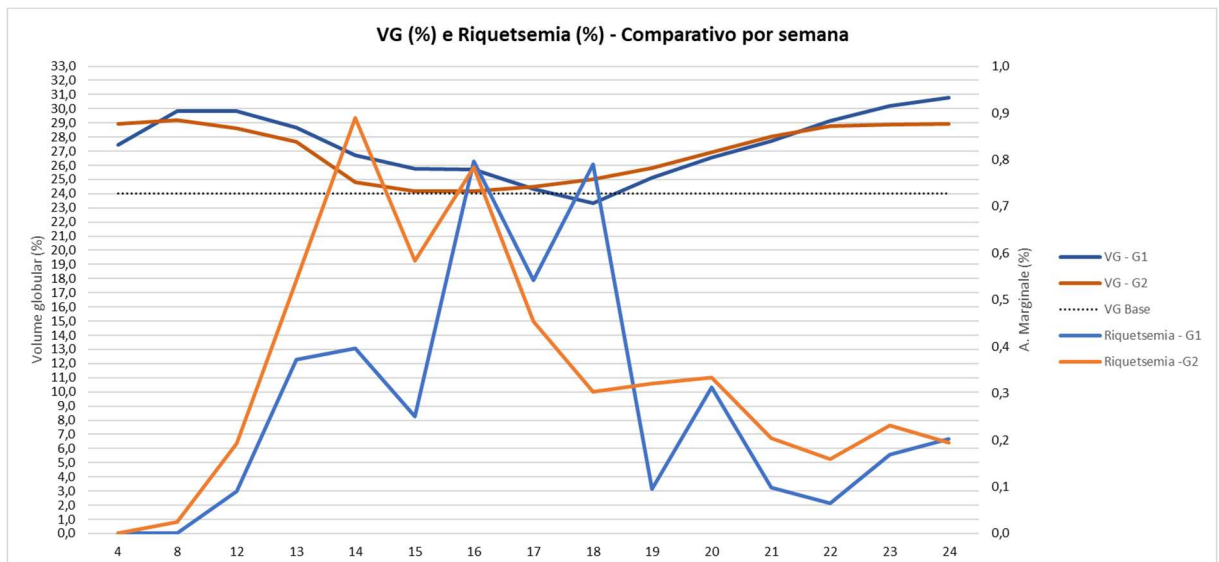


Figura 8 — Valores de riquetsemia e curva do volume globular de bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para *A. marginale* ao nascimento e G2 – bezerras negativas)

Para a temperatura retal observou-se um efeito significativo apenas do fator semana, indicando variação significativa do valor ao longo do tempo. As comparações múltiplas revelaram diferenças entre os dois grupos nas semanas 14 (com média mais alta para o grupo 2) e 16 (com média mais alta para o grupo 1), coincidindo com períodos de maior ricketsemia média e maior queda de VG, conforme demonstrado no figura 8. A febre é descrita como sinal clínico durante o período de patência da Anaplasmosse (Radostits *et al.*, 2016). É interessante destacar que a temperatura corporal (Figura 9) aumentou a partir da décima segunda semana para o grupo 2 e na décima terceira no grupo 1, e se manteve mais elevada até os 6 meses de idade. Considerando que a maior incidência de primo-infecção nas bezerras ocorreu entre 5 e 8 semanas, este aumento da temperatura está relacionado ao processo inflamatório desencadeado pela Anaplasmosse e se mantém durante um período longo, mesmo depois dos animais passarem pela fase aguda da doença.

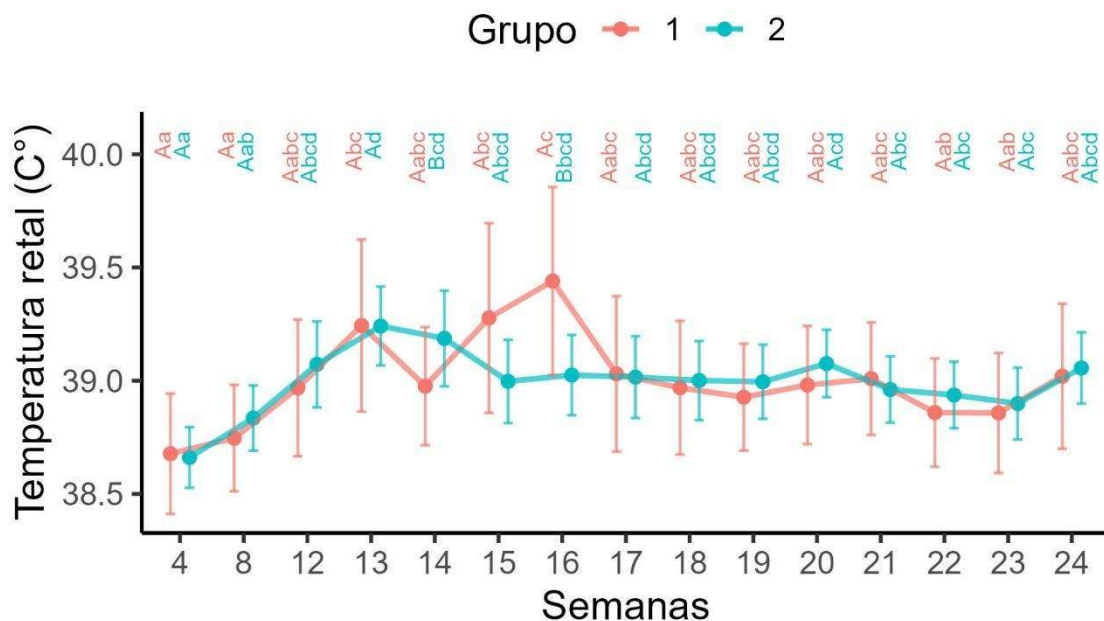


Figura 9 — Valores médios da temperatura retal de bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para *A. marginale* ao nascimento e G2 – bezerras negativas)

Letras diferentes, maiúsculas entre grupos e minúsculas entre momentos do mesmo grupo, indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Após análise do número de tratamentos (Figura 10) para Anaplasmosse nessas bezerras, constatou-se que apenas o fator semana apresentou um efeito significativo, enquanto o fator grupo demonstrou uma significância marginal. As comparações múltiplas não revelaram diferenças entre os dois grupos em nenhuma das semanas avaliadas.

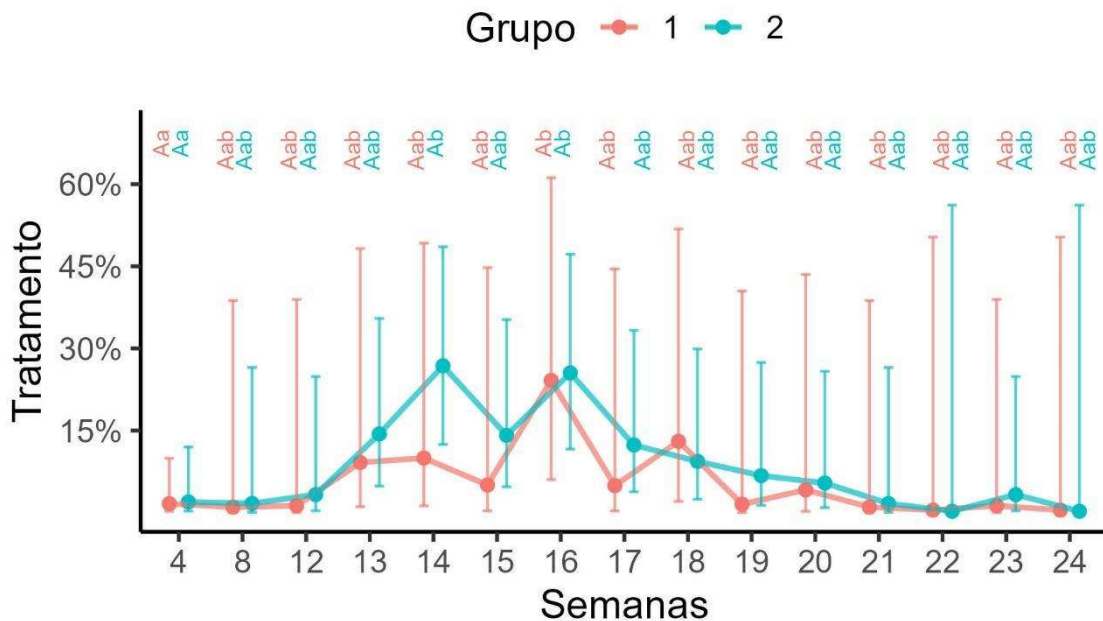


Figura 10 — Valores médios do tratamento para Anaplasmosse em bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para *A. marginale* ao nascimento e G2 – bezerras negativas)

Letras diferentes, maiúsculas entre grupos e minúsculas entre momentos do mesmo grupo, indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Destaca-se que, todos os animais de ambos os grupos apresentaram Anaplasmosse, porém, considerando o ponto de corte para tratamento como a riquetsemia maior ou igual a 2% ou queda de hematócrito maior ou igual a 30% do valor basal, o grupo 1 recebeu um menor número de tratamentos por animal (Tabela 16)

Tabela 16 — Número de tratamentos para Anaplasmosse em bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para *A. marginale* ao nascimento e G2 – bezerras negativas)

Grupo	Número de tratamentos para Anaplasmosse	Número de tratamentos por animal
1 (n=19)	15	0,8

2 (n=55)

70

1,3

A redução do número de tratamentos para Anaplasmosse é uma meta relevante a ser perseguida nas fazendas e traz diversos benefícios. Primeiramente, essa redução implica em uma diminuição no uso de antibióticos, o que desempenha um papel fundamental na mitigação dos efeitos da resistência bacteriana, um problema crescente e preocupante na saúde pública. Além disso, a redução no uso de medicamentos resulta em custos menores, contribuindo para a eficiência econômica da atividade pecuária.

Um estudo conduzido por Souza *et al.* (2021) avaliou o monitoramento da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) em Minas Gerais, utilizando também os métodos de TR e o esfregaço sanguíneo. Os resultados revelaram que uma parcela significativa, correspondente a 56,86% dos bezerros avaliados, não necessitam de tratamento para TPB. Em contrapartida, apenas 23,09% dos animais apresentaram indicação para tratamento. Essa constatação traduziu-se em uma economia considerável, resultando em uma redução de até 78% nos gastos com a compra de medicamentos.

Além do uso racional de medicamentos e da economia financeira proporcionada, tal abordagem apresenta potencial para reduzir as taxas de morbidade e mortalidade do rebanho e possibilita a realização de outros diagnósticos, agregando ainda mais valor à sua implementação nas fazendas (Souza *et al.* 2021).

Os dados de riquetsemia, VG, temperatura retal e tratamento (recuperação ou não) foram utilizados para calcular o Escore de Classificação proposto por Silva (2017). Esse escore tem como objetivo acompanhar a evolução clínica de animais com anaplasmosse e definir a intensidade da doença. Embora em algumas ocasiões os parâmetros não tenham apresentado significância entre grupos, esses dados são essenciais para o monitoramento da doença.

A análise utilizando o teste Qui-Quadrado não revelou diferenças significativas na intensidade dos casos clínicos entre os dois grupos (Valor $p = 0,80$). Observou-se, neste estudo, que a maioria dos casos de Anaplasmosse apresentou-se em um nível moderado de gravidade (Tabela 17).

Tabela 17 — Intensidade clínica da Anaplasmosse em bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para *A. marginale* ao nascimento e G2 – bezerras negativas)

Grupo	Grau de intensidade			
	Intenso	%	Moderado	%
1	8	42	11	58
2	25	45	30	55

A intensidade moderada nos grupos é resultado de vários fatores que contribuem para o controle da Anaplasmosse. Estes incluem as baixas riquetsemias, o tratamento precoce e eficaz (Facury Filho, 2012),

No estudo (Tabela 18), foram identificadas outras doenças nas bezerras, sendo a pneumonia a mais prevalente. Entre as 74 bezerras analisadas, 6 (8,1%) manifestaram diarreia, enquanto 67 (90,5%) apresentaram sintomas de pneumonia. Além disso, 16 (21,6%) desenvolveram um segundo episódio de pneumonia. A intensidade e a resposta terapêutica desses casos não foram abordadas no escopo desta pesquisa.

Tabela 18 — Doenças diagnosticadas em bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida.

Doença na recria	n	%	Média de idade (dias)
Diarreia	6	8,1	106
Pneumonia (1º caso)	67	90,5	118
Pneumonia (2º caso)	16	21,6	143

Os casos de diarreia ocorreram na idade média de 106 dias, enquanto a pneumonia teve uma variação de entre 118 e 143 dias.

Os fatores de risco associados a altas taxas de pneumonia são diversos e incluem tanto o ambiente quanto condições específicas relacionadas à saúde. Por exemplo, a falta de adequada fermentação da cama dessa fazenda pode ser um fator ambiental que contribui para o aumento da incidência de pneumonia. Além disso, a presença da Anaplasmosse pode desencadear mudanças no pH do trato respiratório e distúrbios ácido-básicos devido à desidratação, tornando o organismo mais suscetível à infecção pulmonar. Conforme observado por Coelho (2007), a ocorrência de pneumonia durante um episódio de Anaplasmosse pode agravar o prognóstico da

doença, porque a correção das alterações metabólicas, particularmente a acidose metabólica, está diretamente relacionada à saúde pulmonar.

Tabela 19 — Dinâmica da Anaplasmosse em bezerras holandesas entre 4 e 24 semanas de idade de acordo com sua condição em relação a anaplasmosse ao nascimento. (G1- bezerras nascidas com PCR positivo para *Anaplasma marginale* e G2- bezerras negativas ao nascimento).

Resumo dos índices da Anaplasmosse/grupo		
Características	G1	G2
Início da enfermidade	12 semanas	12 semanas
Pico da riquetsemia	16 e 18 semanas	14 e 16 semanas
Duração da riquetsemia	13 a 20 semanas	13 a 20 semanas
Queda de volume globular	14 a 20 semanas	14 a 19 semanas
Maiores riquetsemias	13 a 20 semanas	13 a 20 semanas
Riquetsemia média	0,1%	0,2%
Tratamentos / bezerra	0,8	1,3
Período de patência médio	5 semanas	5 semanas
Período de convalescença médio	1 semana	1 semana
Maior frequência de anemia	18 semanas	16 semanas

Os dados apresentados na tabela acima, demonstram que as bezerras que nasceram com *A. marginale* de origem congênita (G1) tiveram comportamento da Anaplasmosse semelhante às que nasceram negativas. Entretanto, a análise do número de tratamentos para Anaplasmosse em cada grupo, mostra que foram menos frequentes no G1. Além disso, o G1 apresentou uma riquetsemia média no período avaliado menor ($p < 0,05$) do que o G2. Assim, a condição de ser portador ao nascimento não foi determinante para a ocorrência da doença nos grupos estudados. Observou-se, que essa condição tem influência sobre a riquetsemia, um fator determinante para a redução do número de tratamentos da Anaplasmosse. Além disso, pode indicar uma resposta diferenciada das bezerras do G1 em relação ao desenvolvimento da doença

6.5 Tipificação dos isolados de *A. marginale* de origem congênita e análise filogenética

Neste estudo, das 19 amostras de bezerras que inicialmente testaram positivo para *A. marginale* ao nascer, quatro delas demonstraram a presença de repetições

em tandem identificáveis (tabela 20). Este fenômeno foi atribuído à qualidade do procedimento de sequenciamento empregado. Ao todo, identificou-se seis tandens, sendo três deles previamente não documentados na literatura.

Tabela 20 — Sequência de repetições em Tandem de MSP1 α em amostras congênicas de *Anaplasma marginale* em bezerras da raça Holandesa

Tandem	Sequência em tandem de MSP1 α	N Aas*	Descrição prévia
18	T*****L***DQ*****S***	29	México, Paraná e Minas Gerais (BR), Chaco (AR), África do Sul, Equador,
27	A*****L***DQ*****	29	México, Córdoba (AR), Rio de Janeiro (BR), Filipinas, África do Sul, Venezuela, Minas Gerais (BR).
Φ	T*****	28	Minas Gerais (BR) Kansas (EUA), Porto Rico, Itália, Venezuela, Equador,
SeteLagoas1	T***** *****L***DQ*****	29	Novo
SeteLagoas2	*GGF*PI*****C*****	28	Novo
SeteLagoas3	T***** *****	28	Novo

*N Aas – número de aminoácidos

A estrutura das repetições em tandem de MSP1 α foi descrita para as amostras em questão, abrangendo o número correspondente de repetições, conforme apresentado na Tabela 21. A variação no número de repetições em tandem nessas amostras foi observada entre 2 e 3 repetições, com o número de aminoácidos variando de 28 a 29.

Tabela 21 — Estrutura das repetições em tandem de mps1 α encontradas nas cepas de *A. marginale* de origem congênita em bezerras da raça Holandesa.

Amostra	Estrutura das repetições em tandem de MSP1 α		Número de repetições em tandem
AMOSTRA 4683	SeteLagoas 1	18	2
AMOSTRA 4764	27	27	2
AMOSTRA 4797	SeteLagoas2	Setelagoas3 Φ	3
AMOSTRA 4833	Φ	Setelagoas3	2

As quatro amostras analisadas revelaram uma proximidade genética com cepas encontradas no Brasil, Argentina, Cuba e Estados Unidos, conforme demonstrado pela relação filogenética (Figura 11). A porcentagem de árvores replicadas, nas quais os táxons associados foram agrupados no teste de bootstrap (500 réplicas), foi exibida ao lado dos ramos na representação da árvore. Esta representação está em escala, onde os comprimentos dos ramos correspondem às mesmas unidades das distâncias evolutivas utilizadas na inferência da árvore filogenética. As amostras de maior proximidade ancestral não estão identificadas como sendo de origem congênita no Genbank.

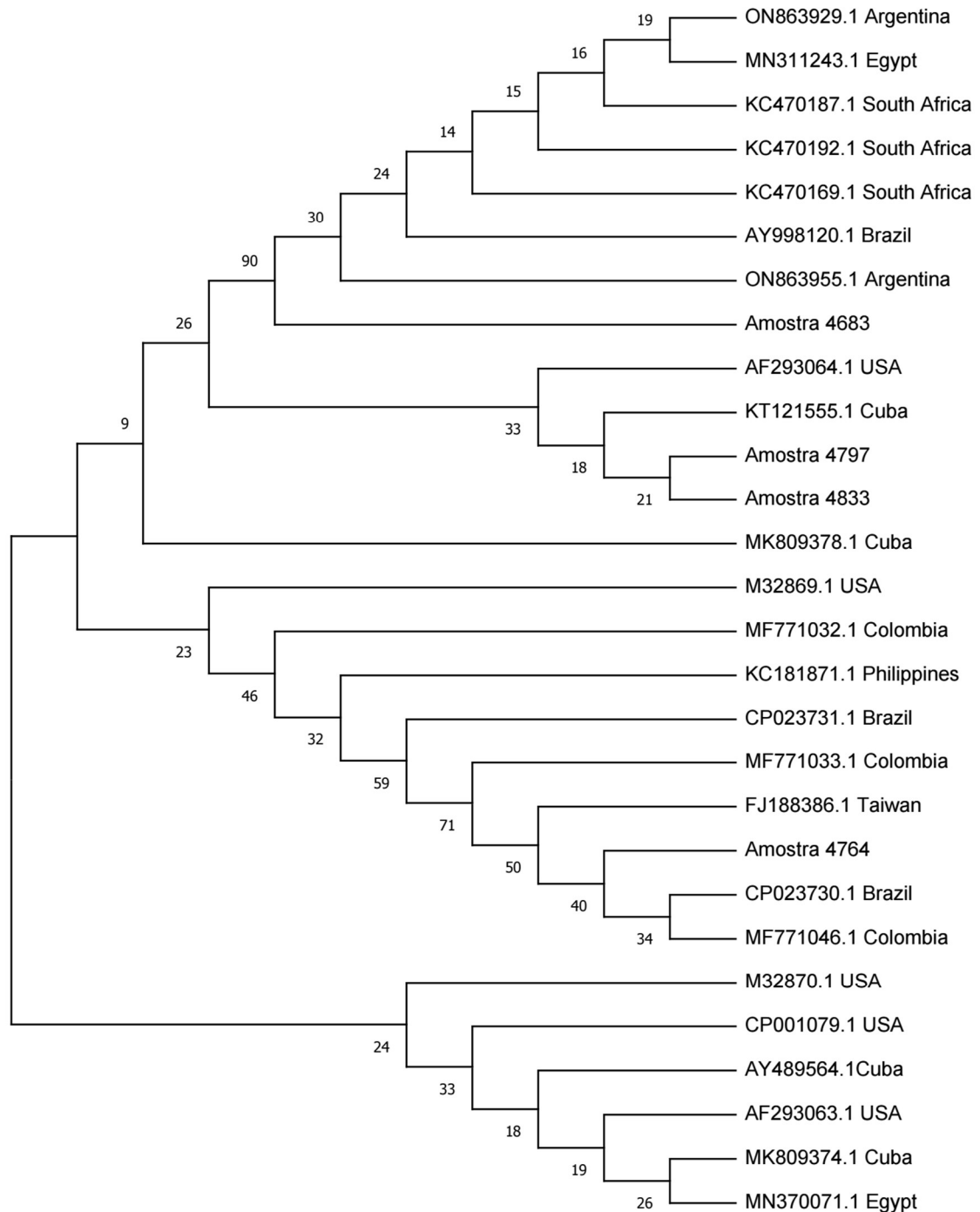


Figura 11 — Árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) de cepas de *A. marginale* com base em sequências parciais de aminoácidos de MSP1 α .

A proteína MSP1 α atua como adesina tanto para hemácias bovinas quanto para células de carrapato (de la Fuente *et al.*, 2001; Kocan *et al.*, 2003). A variação entre isolados geográficos ocorre devido aos diferentes números de repetições de aminoácidos em tandem. Essas variações resultam de mutações, incluindo deleções,

e do mecanismo de *slipped-strand mispairing* (SSM), um processo relacionado ao desaparecimento das fitas de DNA durante a replicação (Henderson *et al.*, 1999; Levinson; Gutman, 1987).

Regiões genômicas suscetíveis a esse processo são aquelas que apresentam curtas sequências de DNA com repetições de seis pares de base ou menos, como microssatélites ou repetições em tandem de número variável (Van Belkum *et al.*, 1998). Conseqüentemente, o gene MSP1 α tem sido utilizado como marcador genético estável na identificação de *A. marginale* (Kocan *et al.*, 2003), mantendo-se conservado durante a multiplicação da riquetsia em bovinos e carrapatos (Bowie *et al.*, 2002; Kocan *et al.*, 2003).

Sequenciamentos de DNA realizados em bezerros revelaram três novas sequências de repetições, além das sequências 18, 27 e Φ já documentadas em outros países, evidenciando a presença de diferentes genótipos de MSP1 α de *A. marginale* em rebanhos geograficamente distintos, o que está de acordo com a observação de alta diversidade genética de *A. marginale* em áreas endêmicas ao redor do mundo (De la Fuente *et al.*, 2007, Bastos *et al.*, 2009).

As estruturas dos genótipos estudados não constam entre os 24 genótipos catalogados no GenBank (acesso em 19 de fevereiro de 2024). No entanto, os tandens documentados 18 e 27 são encontrados nas amostras UFMG1 e MGI15, isoladas de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) no Brasil por Silveira *et al.* (2012) e UFMG 2 (Bastos, 2009). A amostra UFMG1 (número de acesso no GenBank EU676176), obtida de um bezerro naturalmente infectado (Ribeiro *et al.*, 1997), produz altos picos de riquetsemia em bezerros esplenectomizados sem levá-los à morte. Por outro lado, o isolado UFMG2 (número de acesso no GenBank EU676175) induz à alta mortalidade de bezerros esplenectomizados ou não (Ribeiro, 2005 *apud* Bastos, 2009).

A caracterização de amostras como a MGI 15 de *A. marginale*, isoladas de ruminantes selvagens, tem sido associada a uma baixa virulência para bovinos (Kuttler, 1984). Além disso, o tandem 18 também foi identificado em amostras estudadas por Meneses (2013). Neste estudo, a virulência da cepa de transmissão congênita (UFMG3) foi avaliada em bezerros esplenectomizados, e observou-se uma reduzida riquetsemia, recuperação espontânea dos animais e semelhança com a cepa UFMG1, sendo ambas caracterizadas como de baixa virulência (Bastos, 2009). Os genótipos de *A. marginale* de baixa virulência podem ser responsáveis por essa

condição da Anaplasmosose nas bezerras do G1, que são portadoras assintomáticas ao nascimento.

Em relação à filogenia, a amostra 4683 demonstrou uma agrupação mais robusta com uma amostra da Argentina. Por sua vez, as amostras 4797 e 4833 formaram um clado entre si, indicando uma relação genética próxima, enquanto a amostra 4769 apresentou uma associação mais significativa com uma amostra do Brasil. Esses resultados evidenciam que as amostras estão se agrupando com amostras de países sul-americanos, como Argentina e Uruguai, corroborando com o estudo de Parodi *et al.* (2022), no qual suas amostras uruguaias também se agruparam com amostras do Brasil, Argentina e Colômbia. Isso claramente sugere a circulação de cepas com similaridades genéticas em nossa região. O conhecimento das cepas de transmissão congênita, permite estudos de genômica comparativa, filogenia e evolução ou estudos bio prospectivos para a indústria de biotecnologia

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nos resultados obtidos na análise da transmissão congênita de *A. marginale* em bezerras da raça Holandesa em uma fazenda comercial em Sete Lagoas, Minas Gerais, durante o período de dezembro de 2022 a julho de 2023, algumas considerações finais podem ser feitas.

Primeiramente, a frequência considerável de transmissão congênita observada (24,4%) destaca a importância dessa via de infecção na propagação da Anaplasmoze, ressaltando a necessidade de estratégias de controle eficazes, principalmente em regiões endêmicas como Minas Gerais, onde múltiplas cepas de *A. marginale* estão em circulação.

O aumento na detecção de casos pode ser atribuído não apenas ao avanço nos métodos de diagnóstico e ao uso de técnicas mais sensíveis, mas também ao aumento do tamanho das amostras analisadas. A sensibilidade das técnicas de PCR, incluindo o PCR em tempo real e *Nested* PCR, tem contribuído significativamente para a identificação precoce da infecção, especialmente nos indivíduos portadores.

O grupo de bezerras positivas ao nascimento (G1) apresentou menor média de ricketsemia ao longo do período avaliado, o que pode indicar uma resposta imune mais eficiente relacionada à infecção prévia por cepas de transmissão congênita, isso implicou em redução no número de tratamentos para a doença.

A análise filogenética das amostras de *A. marginale* de origem congênita (G1) revelou uma proximidade genética com cepas encontradas em outros países, destacando a importância do estudo da genômica comparativa e da evolução das cepas para compreensão dessa via de infecção.

8 CONCLUSÕES

A frequência de transmissão congênita de *A. marginale* neste estudo foi de 24,4% sendo que, 5,26 % destes animais foram soropositivos no teste de ELISA ao nascimento.

A condição de ser portador ao nascimento de *A. marginale* não foi determinante para a ocorrência da doença nos grupos estudados. Essa condição teve influência sobre a riquetsemia, refletindo na redução do número de tratamentos da Anaplasmose.

As amostras de *A. marginale* de transmissão congênita tem proximidade genética com cepas descritas no Brasil, Argentina, Cuba e Estados Unidos. Três novas sequências em tandem foram identificadas.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L. S. **Infecção por hemoparasitos e neospora caninum em fetos bovinos de diferentes idades gestacionais oriundos de abatedouro**. 2021. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ARNUPHAPPRASERT, A. *et al.* Genetic characterization of genes encoding the major surface proteins of *Anaplasma marginale* from cattle isolates in Thailand reveals multiple novel variants. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 14, n. 2, p. 102-110, 2023.
- ASUAR, Laura. Guía práctica sobre la técnica de PCR. In: REINOSO, Elina; DIESER, Silvana; MOLIVA, Melina. **Manual de herramientas moleculares: Conceptos básicos y técnicas empleadas en el estudio de la genética microbiana**. 1. ed. Río Cuarto – Argentina: UniRío editora, 2022. cap. 17, p. 517-540. ISBN 978-987-688-715-4. Disponível em: <<https://www.unirioeditora.com.ar/wp-content/uploads/2022/08/Manual-de-herramientas-moleculares-UniR%C3%ADo-editora.pdf>>. Acesso em: 2 fev. 2024.
- ATIF, F. A. First Report on Transplacental Transmission of *Anaplasma marginale* in Neonatal Dairy Calves from District Jhang, Punjab, Pakistan. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 25, n. 03, p. 541–546, 2021.
- BARROS, S.L. *et al.* **Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigenima*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 100, p. 513-517, 2005.
- Barry, D. *et al.* A microplate enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibody to *Anaplasma marginale* in cattle serum. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, p. 76-79, 1986.
- BASTOS, C.V. *et al.* **In vitro establishment and propagation of a Brazilian strain of *Anaplasma marginale* with appendage in IDE8 (Ixodes scapularis) cells**. **Braz. J. Microb.**, v. 9, p. 399-403, 2009.
- BASTOS, C.V.; *et al.* Protection in the absence of exclusion between two Brazilian isolates of *Anaplasma marginale* in experimentally infected calves. **Vet. J.**, v. 186, p. 374-378, 2010.
- BATTILANI, M. *et al.* Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. Infection, **Genetics and Evolution**, v. 49, p. 195–211, 2017.
- BENESI, F.J. *et al.* Relato de um caso de transmissão transplacentária de anaplasmosse bovina. Observações clínico-laboratoriais. **R. Bras. Ci. Vet.**, v. 6, p. 175-176, 1999.
- BILHASSI, T. B. *et al.* Quantitative study of *Babesia bovis* infection in beef cattle from São Paulo state, Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 234–238, 2014.

BÖSE, R. *et al.* Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Vet Parasitol**, n.57, p.61-74, 1995.

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

BRAYTON, K.A. *et al.* Distinctly different msp2 pseudogene repertoires in *Anaplasma marginale* strains that are capable of superinfection. **Gene**. v. 361, p. 127–132, 2005.

BRITO, L. G. *et al.* **Transmissão vertical de *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale* na epidemiologia da tristeza parasitária bovina.** In: circular técnica 48. Belém, PA. p. 1–18, 2019.

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

CARLTON, W.; McGAVIN, M.D. **Patologia veterinária especial de Thomson.** 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, p.313-314, 1998.

CASTRO, C. DE V. E B. **Isolado de *Anaplasma marginale* de baixa patogenicidade: cultivo *in vitro* e avaliação de proteção ao desafio com isolado de alta patogenicidade.** 2009. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CAVALCANTI, G.G; **Aspectos clínicos e epidemiológicos das infecções por *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em bezerros da raça Nelore no Estado de São Paulo.** Dissertação de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP. Botucatu-SP, 2007.

CHADI, H. *et al.* Molecular detection and associated risk factors of *Anaplasma marginale*, *A. ovis* and *A. platys* in sheep from Algeria with evidence of the absence of *A. phagocytophilum*. **Acta Tropica**, p. 107040, 2023.

CHOMEL, B. *et al.* Antibody prevalence of 75 eight ruminant infectious diseases in California mule and black-tailed deer (*Odocoileus hemionus*). **J Wildl Dis**, v. 30, n. 1, p. 51–59, 1994.

COELHO, M. F. **Epidemiologia da tristeza parasitária bovina em diferentes categorias de bovinos de corte em confinamento e avaliação da transmissão vertical.** 2022. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

COELHO, L.C.T. **Anaplasmoses bovina: parâmetros clínicos e de patologia clínica em bezerros infectados experimentalmente.** 2007. 65f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

COSTA, S. C. L. *et al.* Transplacental transmission of bovine tick-borne pathogens: Frequency, co-infections and fatal neonatal anaplasmosis in a region of enzootic

stability in the northeast of Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 2, p. 270–275, 2016.

COSTA, V.M.M. *et al.* Tristeza parasitária bovina no Sertão da Paraíba. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 31, n. 3, p. 239-243, 2011.

DE LA FUENTE, J. *et al.* Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. **Res. Vet. Sci.**, v.84, p.382-386, 2008.

DE LA FUENTE, J.; RUYBAL, P.; MTSALI, M.S. *et al.* Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. **Vet. Microbiol.**, v. 119, p. 382-390, 2007.

DE LA FUENTE, J. *et al.* Evolution and function of tandem repeats in the major surface protein 1a of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. **Anim. Health Res. Rev.**, v. 2; p. 163- 173, 2001.

DE LA FOURNIERE S. *et al.* Transovarial Transmission of *Anaplasma marginale* in Rhipicephalus (Boophilus) microplus Ticks Results in a Bottleneck for Strain Diversity. **Pathogens**. n.12, v.1, p.-, 2023.

DEVOS, A. J. e POTGIETER, F. **Bovine babesiosis. In Infectious Diseases of Livestock.** In: Press, O. U. (Ed.). p. 278–294. Capetown.

ERIKS, I. S. *et al.* Detection and quantitation of *Anaplasma marginale* in carrier cattle by using a nucleic acid probe. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, n. 2, p. 279–284, 1989.

ERIKS, I. S. *et al.* H. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 2091-2096, 1993.

ESMAEILNEJAD, B. *et al.* Evaluation of oxidative stress and antioxidant status, serum trace mineral levels and cholinesterases activity in cattle infected with *Anaplasma marginale*. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, p. 402–409, 2018.

FACURY-FILHO, E. J. *et al.* Effectiveness of enrofloxacin for the treatment of experimentally-induced bovine anaplasmosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 32–36, 2012.

FAROOQI, S. H. *et al.* Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis in Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. **Tropical Animal Health and Production**, v. 50, n. 7, p. 1591–1598, 2018.

FEITOSA, F.L.F. 2ª ed. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico.** São Paulo: Roca, 2008. 754p.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution** v. 39, p. 783-791, 1985.

FIGUEROA, J.V.; CHIEVES, L.P.; JOHNSON, G.S. *et al.* Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Vet. Parasitol.**, v. 50, p. 69-81, 1993.

FERREIRA, T. A. A. **Diagnóstico molecular e taxas de infecção de *Anaplasma marginale* e *Babesia bovis* em rebanhos bovídeos e artrópodes parasitas na Amazônia.** 2019. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém.

GASPARINI, M. R. *et al.* Resposta imune de bezerros inoculados com proteínas de *Anaplasma marginale* ligadas a um complexo imunoestimulante. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 253–259, 2013.

GEORGE, N. *et al.* Phylogenetic relationship and genotypic variability in *Anaplasma marginale* strains causing anaplasmosis in India. **Infect. Genet. Evol.** v. 48, p. 71-75, 2017.

GIRARDI, A. M. *et al.* Anaplasmosose congênita em bezerra (*bos indicus*) da raça nelore - relato de caso. **Nucleus Animalium**, v. 4, n. 1, 2012.

GOFF, W.L. *et al.* Development of an indirect fluorescence antibody test, using microfluorometry as a diagnostic test for bovine anaplasmosis. **Am J Vet Res**, v.46, n.5, p.1080-1084, 1985.

GONZALEZ, E. *et al.* Comparisons of the complement-fixation, indirect fluorescent antibody, and card agglutination tests for the diagnosis of bovine anaplasmosis. **American Journal of Veterinary Research**, n. 39, v.1, p.1538-1541, 1978.

GRAU, H. E. G. *et al.* Transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle chronically infected in southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 189–193, 2013.

GUGLIELMONE, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in south and Central America. **Veterinary Parasitology.**, v. 57, n. 1-3, p.109-119, 1995.

HENDERSON, I. R. *et al.* Molecular switches - the ON and OFF of bacterial phase variation. **Mol. Microbiol.** v. 33, p. 919–932, 1999.

HERRERA, A. N. **Anaplasmosis bovina hiperaguda: reporte de caso *Anaplasma marginale*.** Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) em Medicina Veterinária. 2019. Bogotá: Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales.

IICA – Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura: **Técnicas para el diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovino**, San José, Costa Rica, 1987.

JAIN, N.C. Schalm's **Veterinary Hematology**. 4^a ed., 1986. 1221p.

JONSSON M.K., REID S.W.J. Global climate change and vector borne diseases. **Vet J**, n.160 v.2, 2000.

JUNSIRI, W. *et al.* *Anaplasma marginale*: Molecular discrimination, recombinant expression and characterization of major surface protein 2. **Research in Veterinary Science**, v. 152, p. 372–386, 2022.

LEITE *et al.* Immune humoral response against *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) in cattle under different control strategies of the vector tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, n. 11, v.2, p71-76, 2002.

KESSLER, R.H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesq. Vet. Bras.** v. 21, p. 177-179, 2001.

KIESER, S.T. *et al.* Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 4, p.1117-1119, 1990.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution** v.16, p.111-120, 1980.

KNOWLES D. *et al.* Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. **J. Clin. Microbiol**, n.34, v.9, p. 2225-2230, 1996.

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.; COETZEE, J.F.; EWING, S.A. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v.167, p.95-107, 2010.

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

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; *et al.* *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): Recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. **Parasitology**, v. 129, n. SUPPL., 2004.

KUMAR, S. *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**. n.35, p.1547-1549, 2018.

KUTTLER, K.L. *Anaplasma* infections in wild and domestic ruminants: a review. **J. Wildl. Dis.**, v. 20, p. 12-20, 1984.

KUTTLER, K.L. *et al.* Una revisión sobre el diagnóstico de anaplasmosis. In: **REUNION DE DISCUSION SOBRE HEMOPARÁSITOS (ANAPLASMOSIS Y BABESIOSIS)**. Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1975, Cali, Colombia. Anais... Colombia : Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1975. 137p. p.97-107.

LEVINSON, G., GUTMAN, G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Mol. Biol. Evol.** v. 4, p. 203–221, 1987.

LOMBARD, J; URIE,N; GARRY, F; GODDEN, S; QUIGLEY,J; EARLEYWINE, T; MCGUIRK,S; MOORE, D; BRANAN,M; CHAMORRO, M; SMITH, G; SHIVLEY, C; CATHERMAN, D; HAINES, D; HEINRICHS, A.J; JAMES, R; MASS, J; STERNER, K. Consensus recommendations on calf- and herd-level passive immunity in dairy calves in the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 8, p. 7611–7624, 2020.

MADRUGA C.R, *et al.* Evaluation of an ELISA for 66 detection of antibodies to *Babesia bigemina* in cattle an it' a location in an epidemiological survey in Brazil. **Pesq. Vet. Bras.** v. 21, n. 2, p. 72–76, 2001.

MADRUGA, C.R., *et al.* **Produção de antígenos e análise preliminar do teste de imunofluorescência indireta para diagnóstico de anticorpos contra *Anaplasma marginale*.** Campo Grande, MS: Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (EMBRAPA-CNPGC), v.1, n.1, p.1-4, 1986.

MAHONEY, D; ROSS, D. Epizootical factor in the control of bovine babsiosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, n. 1, p. 292–298, 1972.

MALDONADO *et al.* Evidencia molecular de transmisión transplacentaria de *Anaplasma marginale* en becerros neonatos cebú de Venezuela. **Zootecnia Tropical**, v. 30, n. 1, p. 109–114, 2012.

MARANA E. R. M. *et. al.* Comparação dos testes sorológicos de Imunofluorescência Indireta, Conglutinação Rápida, ELISA indireto e ELISA por competição para a detecção de anticorpos contra o *Anaplasma marginale* em soros de bovinos de diferentes áreas enzoóticas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n.4, p.629–638, 2006.

MARANA E. R. M. *et. al.* Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos da região Centro-Sul do estado do Paraná, Brasil, por um teste imunoenzimático competitivo utilizando proteína recombinante MSP5-PR1. **Res. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 18, p. 20-26, 2009.

MARTINS, J.R., CORRÊA, B.L. **Babesiose e anaplasmosse bovina: aspectos destas enfermidades.** **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v.1, n.1, p.51-58, 1995.

MELO, V.SP. **Infecção natural por *Anaplasma marginale* em bezerras de fazendas leiteiras da região metalúrgica, Minas Gerais. 1999.** 30f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MELO, V.S.P. *et al.* Natural infection of calves by *Anaplasma marginale* in dairy cattle herds of the Metalúrgica region, Minas Gerais. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 21, p. 146-150, 2001.

MELO, I. O. **Perfil laboratorial longitudinal de bezerros com anaplasmoze experimental.** 2018. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MENESES, R. M. **Isolamento e caracterização molecular de *Anaplasma marginale* de origem congênita e avaliação da virulência em bezerros experimentalmente infectados.** 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MICHELON, A. ***Mycobacterium bovis* BCG expressando o antígeno Msp1 α de *Anaplasma marginale*: uma vacina candidata contra anaplasmoze bovina.** 2005. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MOLAD, T.; MAZUZ, M.L.; FLEIDEROVITZ, L. *et al.* Molecular and serological detection of *A. centrale* and *A. marginale*-infected cattle grazing within an endemic area. **Vet. Microbiol.**, v. 113, p. 55- 62, 2006.

NAKAMURA, Y. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay using solubilised antigen for detection of antibodies to *Anaplasma marginale*. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 20, n. 4, p. 259-66, 1988.

NAZAR, M. *et al.* Occurrence and transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in dairy cattle: a comprehensive report on the comparative susceptibility of local and exotic cattle breeds. **Slovenian Veterinary Research**, v. 55, p. 183–91, 2018.

NAZIFI, S. *et al.* Acute phase response in cattle infected with *Anaplasma marginale*. **Veterinary Microbiology**, v. 155, n. 2–4, p. 267–271, 2012.

NAZIFI, S. *et al.* Studies on correlations among parasitaemia and some hemolytic indices in two tropical diseases (theileriosis and anaplasmosis) in Fars province of Iran. **Trop Anim Health Prod**, v. 40, n. 1, p. 47–53, 2008.

NIELSEN, K. *et al.* Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Anaplasma marginale* in bovine sera. **Veterinary Parasitology**, n. 67, p.133-142, 1996.

NORTON, J. H. *et al.* Neonatal anaplasmosis in a calf. **Australian Veterinary Journal**, v. 60, n. 11, p. 348, 1983.

NOTOMI, T. *et al.* Amplificação isotérmica de DNA mediada por loop. **Ácidos Nucleicos Res.** n. 28, v.63, 2000.

NOTOMI, T. *et al.* Amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP): princípio, características e perspectivas futuras. **J Microbiol.** n.53, p.1–5, 2015.

PALMER, G.H. The highest priority: what microbial genomes are telling us about immunity. **Vet. Immunol.**, v. 85, p. 1-8, 2002.

PARAMANANDHAM, K. *et al.* **Prevalence of *Anaplasma* species in India and the World in dairy animals: A systematic review and meta-analysis (2023).** ICAR-

National Institute of Veterinary Epidemiology and Disease Informatics (NIVEDI). Karnataka, India.

PARODI T. *et al.* Characterization of strains of *Anaplasma marginale* from clinical cases in bovine using major surface protein 1a in Uruguay. **Frontiers veterinary science**. n.1, v.1, p.-. 2022.

PASSOS, L.M.F.; LIMA, J.D. Diagnóstico de anaplasmosse bovina congênita em Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 36, p. 743-744, 1984.

PEIXOTO, J. C. **Vias de sinalização envolvidas na resposta imunológica do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus***. 2017. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo.

PIMENTEL, L. S. *et al.* Balanced Th1/Th2 immune response induced by MSP1 α functional motif coupled to multiwalled carbon nanotubes as anti-anaplasmosis vaccine in murine model. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 24, p. 102137, 1 fev. 2020.

PIMENTEL, L. S. **Efeito da utilização de nanotubos de carbono de paredes múltiplas como carreadores na produção de anticorpos específicos anti-anaplasmosse em camundongos**. 2018. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

POHL, A. E., CABEZAS-CRUZ .A; RIBEIRO M.F.B; SILVEIRA, J.A.G; SILAGH C.; PFISTER K; PASSO, 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.

POTGIETER, F; RENSBURG, L. VAN. The persistence of colostral *Anaplasma* antibodies and incidence of in utero transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. **Onderstepoort J Vet Res**, v. 54, p. 557- 560., 1987.

PRESTES, N. C; ALVARENGA, F. C., L. **Medicina Veterinária – Obstetrícia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c. 12-14, p.178-218, 2006.

PUNTES J.D; RIET-CORREA F. Epidemiological aspects of cattle tick fever in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 32, n. 1, 2023.

PYPERS, A.R.; HOLM, D.E.; WILLIAMS, J.H. Fatal congenital anaplasmosis associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in a crossbred calf. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v. 82, p. 179-182, 2011.

RADOSTITS, O. M. *et al.* **Clínica Veterinária: um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1737, 2016.

RAMOS, I. A. *et al.* Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in beef cattle in the Brazilian Pantanal. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 4, p. 805–814, jun. 2019.

RIBEIRO, M. F. B.; PASSOS L. M. F. **Tristeza Parasitária Bovina**. Cad Tec Vet Zootec v. 39, p. 36-52, 2002.

RIBEIRO, M. F. *et al.* Transmissão vertical da anaplasmoze bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 47, p. 297–304, 1995.

RIBEIRO, M. F. *et al.* Attempted transmission of *Anaplasma marginale* by infected Boophilus microplus. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 48, p. 397–402, 1996.

RIBEIRO, M. F. B. *et al.* Ultrastructure of *Anaplasma marginale* with an inclusion appendage, isolated in Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.70, p. 271-277, 1997.

RIBEIRO, M. F. B. *et al.* Uso de inóculo padronizado de *Anaplasma marginale* e da quimioprofilaxia no controle da anaplasmoze bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 55, p. 21-26, 2003.

RICHEY, E.J. Bovine Anaplasmosis In: Howard - Current Veterinary Therapy: **Food Animal Practice**. 3. Ed. Philadelphia:W.B. Saunders Company, p. 767-772, 1993.

REHMAN, A. *et al.* Epidemiology of tick-borne pathogens in the semi-arid and the arid agro-ecological zones of Punjab province, Pakistan. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 66, n. 1, p. 526–536, 2019.

ROSE, J.E. *et al.* Serum levels of conglutinin, complement, and immunconglutinin in cattle infected with *Anaplasma marginale*. **Am J Vet Res**, v.39, n.5, p.791-793, 1978.

SAITOU, N. *et al.* The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**. n. 4, v.1, p. 406-425, 1987.

SALMON, D.E., SMITH, T. **Infectious diseases of cattle: Southern Cattle Fever (Texas Fever)**. In: Special Report on Diseases of Cattle and on Cattle Feeding. USDA, Bureau of Animal Industry, Government Printing Office, Washington, p. 428–438, 1986.

SANTOS, G. B. *et al.* Tristeza parasitária em bovinos do semiárido pernambucano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 1, p. 1–7, 2017.

SANTOS, L. R. *et al.* (2016). **Protocolos para diagnóstico de babesiose e anaplasmoze**.

SIDDIKI, A. Z. *et al.* Construction of a multi-epitope in silico vaccine against *Anaplasma marginale* using immunoinformatics approach. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 50, p. 102706, 2023.

SILVA, B. S. T. **Avaliação da vacina de *Anaplasma marginale* utilizando rmsp1a funcionalizada a nanotubos de carbono, associado ao antígeno inativado produzido in vitro: parâmetros imunológicos, clínicos e a proteção induzida em bezerros, após desafio experimental**. 2017. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SILVA, J. B. *et al.* **Longitudinal study of risk factors for anaplasmosis and transplacental transmission in herd cattle.** Semina: Ciências Agrárias, vol. 35, núm. 4, 2014, pp. 2491-2500. Universidade Estadual de Londrina Londrina, Brasil, 2014.

SILVA, Fábio Jorge Moreira da. **Detecção de *Anaplasma marginale* por pesquisa de IgG e PCR em um rebanho bovino da Baixada Fluminense.** 2012. 57 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

SILVEIRA, J. A. G. *et al.* Molecular detection of tickborne pathogens of the family *Anaplasmataceae* in Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*, Illiger, 1815). **Transbound. Emerg. Dis.**, v.59, p.353-360, 2012.

SILVESTRE B.T *et al.* Evaluation of humoral and cellular immune response of BALB/c mice immunized with a recombinant fragment of MSP1a from *Anaplasma marginale* using carbon nanotubes as a carrier molecule. **Vaccine.** n.32, v.1, p. 2160-2166, 2014.

SOUZA, R.S. *et al.* Monitoring bovine tick fever on a dairy farm: An economic proposal for rational use of medications. **Journal of Dairy Science.** v.104, p.5643- 5651, 2021.

SOUZA, F. A. L. *et al.* Babesiosis and anaplasmosis in dairy cattle in northeastern Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 33, n. 9, p. 1057-1061, 2013.

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

SOUZA, J. C. P. *et al.* Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 20, p. 97-101, 2000.

SPILLER, L. A. *et al.* Clinicopathological findings in dairy calves experimentally infected with *Anaplasma marginale*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 6, p. 398–407, 2003.

STOKES, A. M. *et al.* Role of hematological parameters as prognostic indicators in bovine anaplasmosis. **Tropical Animal Health and Production**, v. 54, n. 2, p. 891–897, mar. 2022.

TEIXEIRA. V. A. **Estratégias de predição e detecção de Anaplasmoze bovina com tecnologias de precisão.** 2022. 122p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

THEILER, A. ***Anaplasma marginale*: The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease.** In: THEILER, A. Report of the Government Veterinary Bacteriologist 1908 – 1909. Transvaal, South Africa: Transvaal Department of Agriculture, p. 6-64, 1910.

TIZARD, I. **Veterinary immunology**. 9. ed. 551p. St. Louis: Elsevier /Saunders, 2013.

TORIONI DE ECHAIDE, S.; KNOWLES, D. P.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; SUAREZ, C. E.; MCELWAIN, T. F. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a 175 competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 777–782, 1998.

TRINDADE, H. I. *et al.* Detection of antibodies against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in calves from the region of 71 Araguaína, State of Tocantins, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 169–173, 2010.

VAN BELKUM, A. *et al.* Shortsequence DNA repeats in prokaryotic genomes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 62, p. 275–293, 1998.

VEGA Y MURGUÍA, C.A. **Red de cooperación técnica entre laboratorios de investigación y diagnóstico veterinario, acta de la mesa redonda del programa de hemoparasitos, Montevideo, Uruguay**. n.50, v.1, p.34-50, 1993.

VESPASIANO, L. C. **Nanovacina rMSP1 α associada a antígeno inativado contra *Anaplasma marginale*: Avaliação clínica e imunológica em bezerros submetidos a desafio experimental com amostra heteróloga**. 2020. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

VESPASIANO, L. C. **Dinâmica Da Tristeza Parasitária Bovina Em Um Sistema Intensivo De Produção De Leite Em Minas Gerais**. Dissertação de Mestrado. 55p. Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Minas Gerais. Brasil, 2016.

VIDAL, A. Utilização dos produtos Oxivet LA® e Ganaseg® no tratamento de tourinhos submetidos à premunicação. **Hora Vet.**, Porto Alegre, v.19, n.114, p.15-19, 2000.

VIDOTTO, O., E.R.M. MARANA. Diagnóstico em Anaplasmosse Bovina. **Ciência Rural**. n31, v.1, p. 361-368, 2001.

WANER, T. *et al.* Rickettsiales. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J. G. *et al.* **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4.ed. Wileyblackwell, 2011. c.31, p.589-621.

ANEXOS

Tabela 22 — Valores médios de volume globular, riquetsemia, temperatura retal, frequência de anemia e número de tratamento para Anaplasmosse em bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para *A. marginale* ao nascimento e G2 – bezerras negativas)

Grupo	Parâm.	Tempo (Semanas)														
		4	8	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1 (n=19)	VG (%)	27	30	30	29	27	26	26	24	23	25	27	28	29	30	31
	Riquetsemia (%)	0,0	0,0	0,1	0,4	0,4	0,3	0,8	0,5	0,8	0,1	0,3	0,1	0,1	0,2	0,2
	Temperatura retal	39,2	38,8	39	39,3	39,1	39,5	39,6	39,2	39,2	39	39	39	38,9	38,9	39
	Tratamentos	0	0	0	2	2	1	5	1	3	0	1	0	0	0	0
	Tratamentos(%)	0	0	0	10,5	10,5	5,3	26,3	5,3	15,8	15,8	5,3	0	0	0	0
2 (n=55)	VG (%)	29	29	29	28	25	24	24	24	25	26	27	28	29	29	29
	Riquetsemia (%)	0,0	0,0	0,2	0,5	0,9	0,6	0,8	0,5	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2
	Temperatura retal	38,8	38,9	39,2	39,3	39,3	39,1	39,1	39,2	39	39	39,1	39	39	38,9	39,1
	Tratamentos	0	1	2	10	17	9	19	8	8	4	4	1	0	2	0
	Tratamentos(%)	0	1,8	3,6	18,2	31	16,4	34,5	14,5	14,5	7,3	7,3	1,8	0	3,6	0

Tabela 23 — Frequência de anemia em bezerras da raça Holandesa de 4 a 24 semanas de vida. (G1- bezerras com PCR positivo para *A. marginale* ao nascimento e G2 – bezerras negativas)

Grupo	Parâmetro	Tempo (Semanas)														
		4	8	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1 (n=19)	Anêmicos	2	1	0	0	6	6	5	6	8	7	3	2	0	0	0
	Anêmicos (%)	10,5	5,2	0	0	0,3	31,6	26,3	31,6	42,1	36,8	15,7	10,5	0	0	0
2 (n=55)	Anêmicos	0	3	5	8	23	24	25	21	16	15	9	5	1	2	3
	Anêmicos (%)	0	5,5	9	14,5	41,8	43,6	45,5	38,2	29	27,3	16,4	9	1,8	3,6	5,5

Tabela 24 - Estatísticas descritivas das variáveis do estudo por Grupo e Semana.

Variável	Grupo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Máximo	Coefficiente de Variação	Valores válidos
VG	GERAL	27,1	4,3	15,0	25,0	28,0	30,0	37,0	16%	1110
VG	1	27,4	4,3	15,0	26,0	28,0	30,0	36,0	16%	285
VG	2	27,0	4,3	15,0	25,0	28,0	30,0	37,0	16%	825
VG	4	28,6	2,8	22,0	27,0	28,0	30,0	36,0	10%	74
VG	8	29,4	4,4	15,0	27,0	29,0	32,0	37,0	15%	74
VG	12	28,9	4,0	16,0	26,0	28,5	32,0	36,0	14%	74
VG	13	27,9	4,3	16,0	25,0	28,0	30,0	36,0	16%	74
VG	14	25,3	4,3	17,0	22,0	26,0	28,0	35,0	17%	74
VG	15	24,6	4,3	15,0	21,0	25,0	28,0	34,0	18%	74
VG	16	24,6	4,1	15,0	22,0	25,0	28,0	35,0	17%	74
VG	17	24,4	4,2	16,0	21,0	25,5	28,0	35,0	17%	74
VG	18	24,6	4,2	15,0	21,0	26,0	28,0	31,0	17%	74
VG	19	25,6	4,2	15,0	22,0	27,0	28,0	33,0	17%	74
VG	20	26,8	4,3	15,0	24,0	27,0	30,0	35,0	16%	74
VG	21	28,0	3,3	20,0	26,0	28,0	30,0	34,0	12%	74
VG	22	28,9	2,3	22,0	28,0	28,5	30,0	35,0	8%	74
VG	23	29,2	2,6	22,0	28,0	30,0	30,0	36,0	9%	74
VG	24	29,4	2,8	22,0	28,0	29,5	31,0	36,0	10%	74
Amarg	GERAL	0,33	0,75	0,00	0,00	0,00	0,28	5,10	228%	1110
Amarg	1	0,28	0,67	0,00	0,00	0,00	0,21	4,10	240%	285
Amarg	2	0,35	0,78	0,00	0,00	0,00	0,30	5,10	224%	825
Amarg	4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NA	74
Amarg	8	0,02	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	1,40	860%	74
Amarg	12	0,17	0,50	0,00	0,00	0,00	0,10	2,90	299%	74
Amarg	13	0,50	0,83	0,00	0,00	0,13	0,44	3,50	167%	74
Amarg	14	0,76	1,10	0,00	0,00	0,17	0,92	3,87	144%	74
Amarg	15	0,50	0,90	0,00	0,00	0,09	0,69	4,46	180%	74
Amarg	16	0,79	1,19	0,00	0,00	0,15	1,65	4,20	151%	74

Amarg	17	0,48	0,95	0,00	0,00	0,00	0,50	4,10	199%	74
Amarg	18	0,43	0,96	0,00	0,00	0,00	0,32	4,10	223%	74
Amarg	19	0,26	0,74	0,00	0,00	0,00	0,28	4,90	280%	74
Amarg	20	0,33	0,77	0,00	0,00	0,00	0,27	5,10	236%	74
Amarg	21	0,18	0,36	0,00	0,00	0,00	0,27	2,70	206%	74
Amarg	22	0,14	0,19	0,00	0,00	0,00	0,20	0,80	141%	74
Amarg	23	0,22	0,43	0,00	0,00	0,10	0,21	2,70	199%	74
Amarg	24	0,20	0,32	0,00	0,00	0,12	0,26	2,00	161%	74
Temp	GERAL	39,09	0,49	38,5	38,7	39	39,3	40,9	1%	1110
Temp	1	39,12	0,55	38,5	38,7	39	39,3	40,9	1%	285
Temp	2	39,08	0,47	38,5	38,7	39	39,3	40,9	1%	825
Temp	4	38,89	0,63	38,5	38,5	38,7	38,8	40,8	2%	74
Temp	8	38,89	0,39	38,5	38,7	38,8	39	40,5	1%	74
Temp	12	39,13	0,51	38,5	38,7	39	39,4	40,6	1%	74
Temp	13	39,29	0,43	38,5	39	39,2	39,7	40,3	1%	74
Temp	14	39,26	0,57	38,5	38,9	39,05	39,6	40,9	1%	74
Temp	15	39,24	0,62	38,5	38,7	39,1	39,6	40,9	2%	74
Temp	16	39,24	0,58	38,5	38,8	39,1	39,6	40,9	1%	74
Temp	17	39,18	0,60	38,5	38,7	39	39,4	40,9	2%	74
Temp	18	39,09	0,50	38,5	38,7	39	39,3	40,9	1%	74
Temp	19	39,03	0,39	38,5	38,7	39	39,2	40,3	1%	74
Temp	20	39,07	0,35	38,5	38,9	39,05	39,2	40,1	1%	74
Temp	21	39,01	0,33	38,5	38,8	39	39,2	40,4	1%	74
Temp	22	38,95	0,31	38,5	38,7	38,9	39,1	39,8	1%	74
Temp	23	38,94	0,36	38,5	38,7	38,9	39,1	40,2	1%	74
Temp	24	39,10	0,43	38,5	38,8	39,1	39,3	40,3	1%	74
Trat	GERAL	7,7%	26,6%	0	0	0	0	1	347%	1110
Trat	1	5,3%	22,4%	0	0	0	0	1	425%	285
Trat	2	8,5%	27,9%	0	0	0	0	1	329%	825
Trat	4	0,0%	0,0%	0	0	0	0	0	NA	74
Trat	8	1,4%	11,6%	0	0	0	0	1	860%	74
Trat	12	2,7%	16,3%	0	0	0	0	1	604%	74

Trat	13	13,5%	34,4%	0	0	0	0	1	255%	74
Trat	14	23,0%	42,4%	0	0	0	0	1	184%	74
Trat	15	12,2%	32,9%	0	0	0	0	1	271%	74
Trat	16	25,7%	44,0%	0	0	0	1	1	171%	74
Trat	17	10,8%	31,3%	0	0	0	0	1	289%	74
Trat	18	10,8%	31,3%	0	0	0	0	1	289%	74
Trat	19	5,4%	22,8%	0	0	0	0	1	421%	74
Trat	20	5,4%	22,8%	0	0	0	0	1	421%	74
Trat	21	1,4%	11,6%	0	0	0	0	1	860%	74
Trat	22	0,0%	0,0%	0	0	0	0	0	NA	74
Trat	23	2,7%	16,3%	0	0	0	0	1	604%	74
Trat	24	0,0%	0,0%	0	0	0	0	0	NA	74
PCR	GERAL	76,3%	42,6%	0	1	1	1	1	56%	266
PCR	1	88,7%	31,8%	0	1	1	1	1	36%	133
PCR	2	63,9%	48,2%	0	0	1	1	1	75%	133
PCR	0	50,0%	50,7%	0	0	0,5	1	1	101%	38
PCR	4	23,7%	43,1%	0	0	0	0	1	182%	38
PCR	8	60,5%	49,5%	0	0	1	1	1	82%	38
PCR	12	100,0%	0,0%	1	1	1	1	1	0%	38
PCR	16	100,0%	0,0%	1	1	1	1	1	0%	38
PCR	20	100,0%	0,0%	1	1	1	1	1	0%	38
PCR	24	100,0%	0,0%	1	1	1	1	1	0%	38