



ISSN 1677-8618
Setembro, 2007

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 49

Epidemiologia molecular de *Anaplasma marginale* em bovinos criados nos estados de Rondônia e Acre

Luciana Gatto Brito
Márcia Cristina de Sena Oliveira
Francelino Goulart da Silva Netto
Rodrigo Barros Rocha
Francisco Aloísio Cavalcante
Adriana Denise Marim
Gislaine Cristina Rodrigues de Souza
Juliana Leite da Silva
Fabiano Benitez
Maria Manuela da Fonseca Moura

Porto Velho, RO
2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Rondônia

BR 364 km 5,5, Caixa Postal 406, CEP 78900-970, Porto Velho, RO

Telefones: (69) 3901-2510, 3225-9387, Fax: (69) 3222-0409

www.cpafrro.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Cléber de Freitas Fernandes*

Secretária: *Marly de Souza Medeiros*

Membros:

Abadio Hermes Vieira

André Rostand Ramalho

Luciana Gatto Brito

Michelliny de Matos Bentes Gama

Vânia Beatriz Vasconcelos de Oliveira

Normalização: *Daniela Maciel*

Editoração eletrônica: *Marly de Souza Medeiros*

Revisão gramatical: *Wilma Inês de França Araújo*

1ª edição

1ª impressão: 2007. Tiragem: 100 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Rondônia.

Epidemiologia molecular de *Anaplasma marginale* em bovinos criados nos estados de Rondônia e Acre / Luciana Gatto Brito ... [et al.]. – Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2007. 22 p. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Rondônia, ISSN 1677-8618 ; 49).

1. Epidemiologia molecular. 2. *Anaplasma marginale*. 3. Bovinos. 4. Rondônia. I. Oliveira, Márcia Cristina de Sena. II. Silva Netto, Francelino Goulart. III. Rocha, Rodrigo Barros. IV. Cavalcante, Francisco Aloísio. V. Marim, Adriana Denise. VI. Souza, Gislaíne Cristina Rodrigues de. VII. Silva, Juliana Leite da. VIII. Benitez, Fabiano. IX. Moura, Manoela da Fonseca. IX. Título. X. Série.

CDD(21.ed.) 636.08909811

© Embrapa – 2007

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Material e métodos	7
Resultados e discussão	8
Conclusão	9
Referências bibliográficas	10

Epidemiologia molecular de *Anaplasma marginale* em bovinos criados nos Estados de Rondônia e Acre

Luciana Gatto Brito¹
Márcia Cristina de Sena Oliveira²
Francelino Goulart da Silva Netto³
Rodrigo Barros Rocha⁴
Francisco Aloísio Cavalcante⁵
Adriana Denise Marim⁶
Gislaine Cristina Rodrigues de Souza⁷
Juliana Leite da Silva⁷
Fabiano Benitez⁸
Maria Manuela da Fonseca Moura⁹

Resumo

A anaplasmoze bovina, causada pela rickettsia *Anaplasma marginale* tem como principal vetor no Brasil, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Os bovinos que sobrevivem à infecção inicial convertem-se em portadores, tornando-se uma fonte de infecção para os artrópodes vetores. A doença se caracteriza por anemia hemolítica, perda de peso, decréscimo na produção de carne e leite, aborto e morte, causando grandes prejuízos à produtividade dos rebanhos. Nesse trabalho determinou-se a prevalência de *A. marginale* em rebanhos bovinos criados em oito microrregiões de Rondônia e quatro microrregiões do Acre através da utilização da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizada para amplificação de um fragmento de 458 pb do gene msp5. Verificou-se uma taxa de prevalência de 98,6% nas amostras provenientes de Rondônia e de 92,87% nas amostras provenientes do Acre. As taxas de prevalência não diferiram significativamente entre as microrregiões analisadas caracterizando os estados de Rondônia e Acre como áreas de estabilidade enzoótica para *A. marginale*. Através da análise do alinhamento da região de menor variabilidade do gene msp1a, identificou-se a presença de cinco tipos de isolados dessa rickettsia pertencentes às populações de *A. marginale* provenientes dos estados de São Paulo, Rondônia e Acre.

¹ Méd. Vet., D.Sc. em Ciências Veterinárias – Parasitologia, pesquisadora da Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO. luciana@cpafro.embrapa.br.

² Méd. Vet., D.Sc., Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. márcia@cnpse.embrapa.br.

³ Méd. Vet., M.Sc. em Doenças parasitárias de ruminantes, pesquisador da Embrapa Rondônia. goulart@cpafro.embrapa.br.

⁴ Biólogo, D.Sc., Pesquisador da Embrapa Acre, Rio Branco, AC. rodrigo@cpafro.embrapa.br.

⁵ Méd. Vet., M.Sc., Embrapa Acre. aloisio@cpafac.embrapa.br.

⁶ Bióloga, Mestranda PGBIOEXP, Universidade Federal de Rondônia, UNIR, Porto Velho, RO. adriana.marim@hotmail.com.

⁷ Acadêmica de Ciências Biológicas da UNIR.

⁸ Méd. Vet., BSc., Agência de Defesa Sanitária Agrosilvopastoril do Estado de Rondônia – IDARON, Porto Velho, RO.

⁹ Bióloga, D.Sc., Professora Adjunta, CIBEBI, UNIR, Porto Velho, RO. E-mail: mmmoura@click21.com.br.

Molecular epidemiology of *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) in cattle breeds in Rondônia and Acre states

Abstract

The bovine anaplasmosis, caused by rickettsia *Anaplasma marginale*, has in Brazil *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* as the principal vector. The bovines that survived the infection, become in carriers, fetching source of infection will be arthropods vectors. The anaplasmosis disease is characterized by determine in parasited cattle hemolytic anemia, weight loss, decreased milk and beef production, abortion and death; it thus causes heavy losses to animal health and production in herds worldwide. In this work was determined the prevalence of *A. marginale* in bovines herds bred in eight micro regions of Rondônia state and four micro regions of Acre state by polymerase chain reaction technique (PCR) for amplification of the fragment of 458 pb of the msp5 gen. A prevalence of *A. marginale* in 98,6% of the samples from Rondônia state and of 92,87% of the samples from Acre state. The prevalence tax did not significantly differ between the micro regions from Rondônia and Acre states, characterized these states as enzootic stability areas for *A. marginale*. Through alignment analysis of the slighter variable region of msp1a gene five isolated types of this rickettsia was identified in populations of *A. marginale* from São Paulo, Rondônia and Acre states.

Index terms: Molecular epidemiology, Anaplasma marginale, bovine, Rondônia, Acre.

Introdução

A anaplasmoze bovina, causada pela rickettsia intra-eritrocitária *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910), é transmitida aos bovinos principalmente, pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) que se encontra disperso nas diferentes regiões do globo terrestre localizadas entre os paralelos 32° Norte e 32° Sul (GONZALES, 1995).

A anaplasmoze possui ampla distribuição geográfica e ocorre tanto em regiões de clima tropical e subtropical como em zonas de clima temperado (MOREL, 1989; DALGLIESH et al., 1990). A prevalência em nível mundial varia entre 2,1% e 100% (JORGEJAN et al., 1988; BAUMGARTNER et al., 1992; JORGENSEN et al., 1992) e no Brasil a soroprevalência varia entre 12,4% e 100% (ARTILES et al., 1995; VIDOTTO; MARANA, 2001).

Os prejuízos causados pela anaplasmoze bovina à bovinocultura norte-americana foram avaliados em 400 milhões de dólares anuais, considerando-se as perdas diretas e indiretas, como mortalidade, aborto, perda de peso, redução na produção leiteira e de carne (KOCAN et al., 2003). Nos Estados Unidos, *A. marginale* determina uma taxa de mortalidade anual de 50.000 a 100.000 animais (PALMER; MCELWAIN, 1995). No Brasil, os prejuízos específicos causados pela anaplasmoze são difíceis de se calcular, não apenas pela morbidade e mortalidade da patologia, mas também pelas seqüelas que impedem o desenvolvimento normal dos animais acometidos e, conseqüentemente interferem nos índices produtivos do rebanho (ARTECHE, 1992). Entretanto, as perdas por *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*, os quais determinam o complexo Tristeza Parasitária Bovina (TPB), foram avaliadas em mais de 500 milhões de dólares anuais (GRISI et al., 2002).

A. marginale determina a anaplasmoze nas formas clínicas aguda, superaguda, subaguda e/ou crônica (RISTIC, 1981; MARTINS; CORRÊA, 1995) com um período pré-patente de 20 a 40, dias seguido por intensa parasitemia. A doença é caracterizada por acentuada anemia hemolítica, altos níveis de rickettsemia, perda de peso e em muitos casos a morte em animais com mais de três anos de idade (PALMER et al., 2000; VISESHAKUL et al., 2000). Foi demonstrado por Eriks et al. (1989; 1993) que bovinos infectados com *A. marginale* permanecem com a rickettsia por mais de sete anos.

Epidemiologicamente, animais recuperados de um quadro agudo de infecção por *A. marginale* tornam-se portadores, por um período de tempo variável, quando sofrem ciclos de parasitemias. Essas parasitemias não podem ser detectadas por exame direto (a taxa de parasitemia permanece abaixo do limiar de detecção pela microscopia óptica) e também não pode ser identificada pelos métodos diagnósticos tradicionais, uma vez que os testes sorológicos amplamente utilizados na detecção de *A. marginale* são pouco específicos e/ou sensíveis, particularmente na detecção de bovinos portadores (BARRY et al., 1986; DUZGUN et al., 1988; GOFF et al., 1990; ALLEMAN; BARBET, 1996) ou cronicamente infectados (KOCAN et al., 2004).

Embora *A. marginale* apresente ampla distribuição, em muitas regiões fisiográficas do Brasil não se conhece a condição epidemiológica da anaplasmoze no norte do país, inclusive nos estados de Rondônia e Acre. Assim, buscou-se caracterizar a situação epidemiológica de *A. marginale* em diferentes regiões fisiográficas dos estados de Rondônia e Acre.

Material e métodos

Obtenção de amostras

O estudo foi desenvolvido com amostras de coágulo sanguíneo doadas pela Agência de Defesa Sanitária Agrosilvopastoril do Estado de Rondônia (IDARON) provenientes de bovinos com idade entre 4 e 12 meses criados em oito regiões fisiográficas do Estado de Rondônia e quatro regiões do Acre.

O Estado de Rondônia é dividido, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em duas mesorregiões: Madeira-Guaporé e Leste Rondoniense (IBGE, 2006). Na mesorregião de Madeira-Guaporé estão incluídas as microrregiões de Guajará-Mirim e Porto Velho e na mesorregião do Leste Rondoniense estão compreendidas as demais microrregiões do estado.

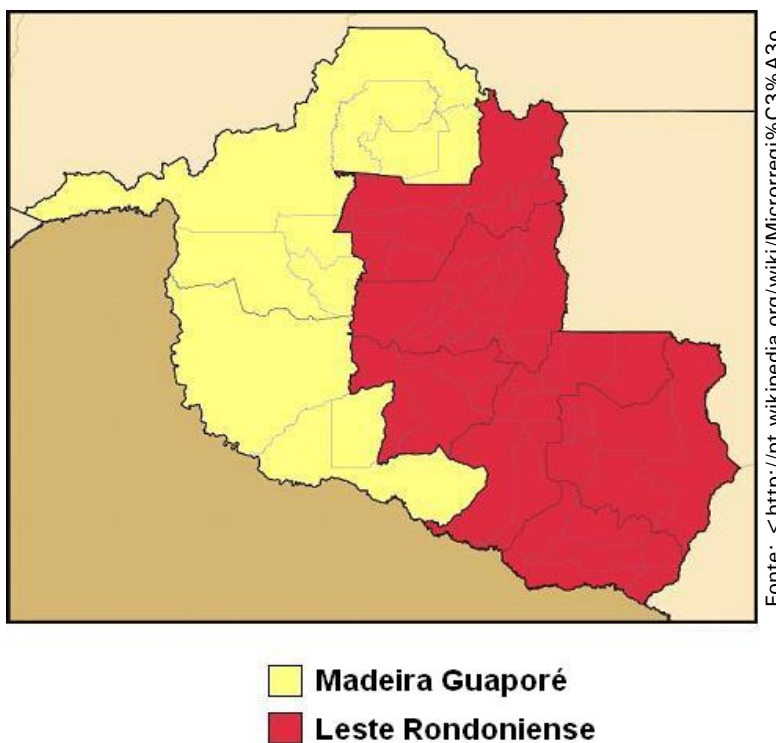


Fig. 1: Mesorregiões que compõem o Estado de Rondônia.

As microrregiões que compõem o Estado de Rondônia (Fig. 2) possuem uma população bovina na faixa etária de 4 a 12 meses estimada em 861.953 cabeças em uma área total de 238.512,8 km² (Rondônia, 2005), sendo estas:

- Alvorada do Oeste: composta pelos municípios de Alvorada do Oeste, Nova Brasilândia, São Miguel do Guaporé e Seringueiras, onde foram coletadas 118 amostras.
- Ariquemes: composta pelos municípios de Alto Paraíso, Ariquemes, Cacaulândia, Machadinho do Oeste, Monte Negro, Rio Crespo e Vale do Anari, onde foram coletadas 166 amostras.

- Cacoal: composta pelos municípios de Alta Floresta do Oeste, Alto Alegre dos Parecis, Castanheiras, Cacoal, Espigão do Oeste, Ministro Andreazza, Novo Horizonte do Oeste, Rolim de Moura, Rio Crespo e Santa Luzia do Oeste, onde foram coletadas 319 amostras.
- Colorado do Oeste: composta pelos municípios de Cabixi, Cerejeiras, Colorado do Oeste, Corumbiara e Pimenteiras do Oeste, onde foram coletadas 9 amostras.
- Guajará-Mirim: composta pelos Municípios de Costa Marques, Guajará-Mirim e São Francisco do Guaporé, onde foram coletadas 331 amostras.
- 6) Ji-Paraná: composta pelos municípios de Governador Jorge Teixeira, Jaru, Ji-Paraná, Mirante da Serra, Nova União, Ouro Preto do Oeste, Presidente Médici, Teixeirópolis, Urupá e Vale do Paraíso, onde foram coletadas 328 amostras.
- 7) Porto Velho: composta pelos municípios de Buritis, Campo Novo de Rondônia, Candeias do Jamari, Cujubim, Itapuã do Oeste, Nova Mamoré e Porto Velho, onde foram coletadas 309 amostras.
- 8) Vilhena: composta pelos municípios de Chupinguaia, Parecis, Pimenta Bueno, Primavera de Rondônia, São Felipe do Oeste e Vilhena, onde foram coletadas 70 amostras.

Em Rondônia, a amostragem foi realizada coletando-se um número maior ou igual a 0,1% da população de bovinos pertencentes a esta faixa etária nas oito microrregiões amostradas, conforme metodologia proposta por (SOUZA et al., 2000).

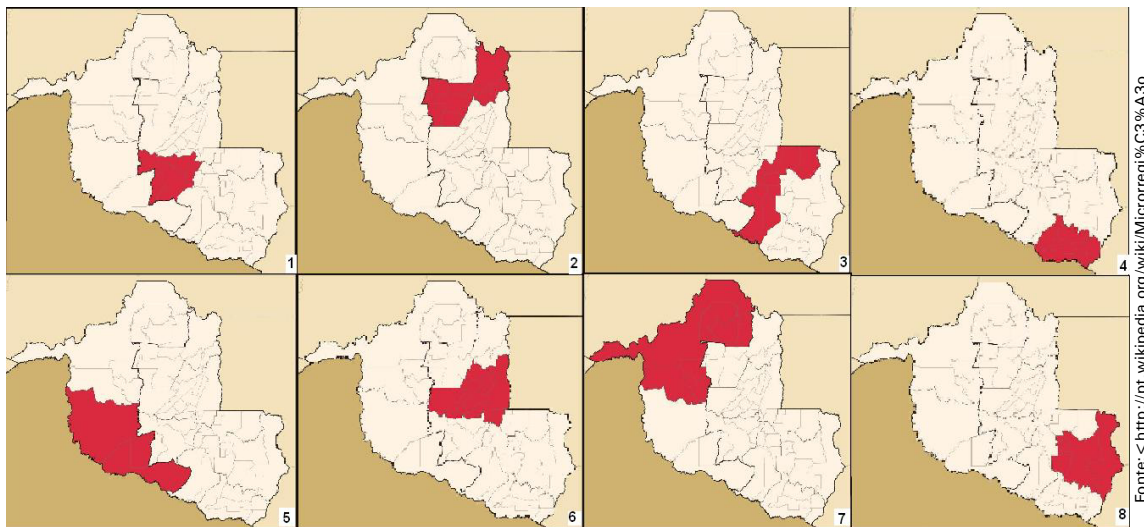


Fig. 2. Microrregiões do Estado de Rondônia onde foram coletadas amostras de sangue para a pesquisa de *Anaplasma marginale*: (1) Alvorada do Oeste; (2) Ariquemes; (3) Cacoal; (4) Colorado do Oeste; (5) Guajará Miriim; (6) Ji-Paraná; (7) Porto Velho; (8) Vilhena.

O Estado do Acre é dividido em duas mesorregiões: Vale do Juruá e Vale do Acre (Fig. 3), segundo o IBGE (2006).

Na mesorregião do Vale do Juruá estão incluídas as microrregiões de Cruzeiro do Sul e Tarauacá, enquanto que a mesorregião do Vale do Acre compreende as microrregiões de Brasiléia e Rio Branco.

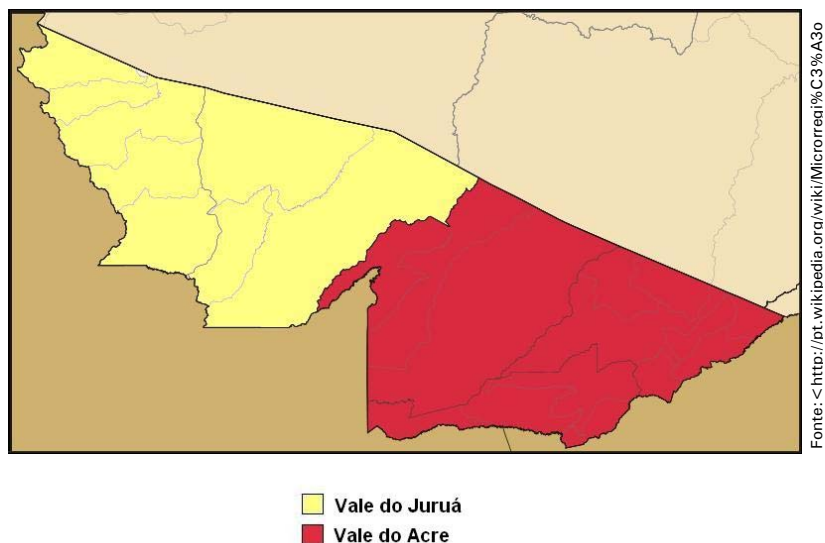


Fig. 3. Mesorregiões que compõe o Estado do Acre.

As microrregiões componentes do Estado do Acre analisadas (Fig. 4) foram:

- Cruzeiro do Sul: composta pelos municípios de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima, Marechal Thaumaturgo, Porto Walter e Rodrigues Alves, onde foram coletadas 45 amostras.
- Rio Branco: composta pelos municípios de Acrelândia, Bujari, Capixaba, Plácido de Castro, Porto Acre, Rio Branco e Senador Guimard, onde foram coletadas 88 amostras.
- Tarauacá: composta pelos municípios de Feijó, Jordão e Tarauacá, onde foram coletadas 34 amostras.
- Brasiléia: composta pelos municípios de Assis Brasil, Brasiléia, Epitaciolândia e Xapuri, onde foram coletadas 58 amostras.

As amostras procedentes do rebanho bovino do Acre foram fornecidas pela Embrapa Acre, sendo as mesmas coletadas exclusivamente para o experimento durante os meses de fevereiro e março do ano de 2006. As amostras de sangue total utilizadas para a extração de DNA genômico foram coletadas com anti-coagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 5% em 225 bovinos considerados sadios e de diferentes faixas etárias.

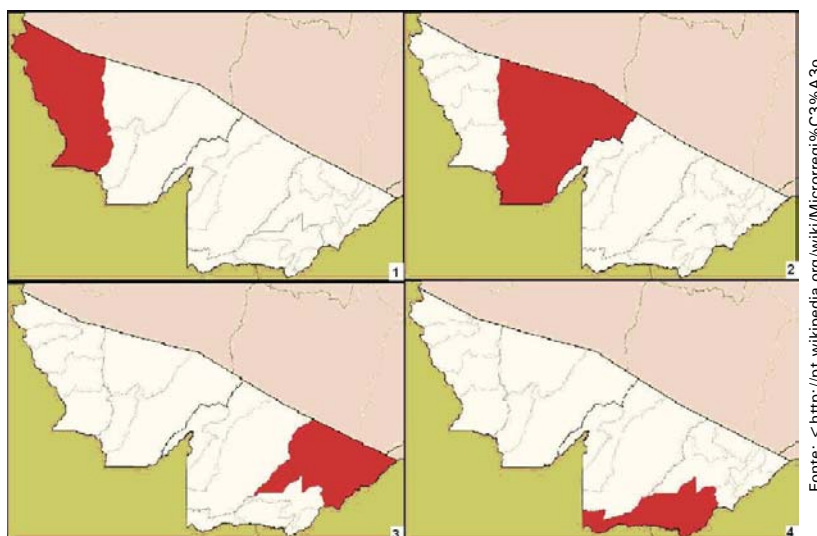


Fig 4. Microrregiões do Estado do Acre onde foram coletadas amostras de sangue para a pesquisa de *Anaplasma marginale*: (1) Cruzeiro do Sul; (2) Tarauacá; (3) Rio Branco; (4) Brasiléia.

Extração de DNA

Procedeu-se a extração de DNA das amostras de coágulo conforme metodologia descrita por Brito et al. (2006). Para extração de DNA das amostras de sangue total utilizou-se o *kit GFX™ Genomic Blood DNA Purification* (Amershan Pharmacia Biotech Inc. Limited, UK), seguindo as recomendações do fabricante.

As amostras de DNA obtidas foram diluídas em 100 µL de tampão TE (TRIS-EDTA) e mantidas em freezer à -20°C para serem utilizadas como DNA molde (*template*) nas reações em cadeia da polimerase (PCR).

Reação em cadeia da polimerase

As amostras de DNA foram submetidas à PCR para amplificação do gene de diagnóstico *msp5* de *A. marginale*, utilizando-se o *kit* comercial PCR Master Mix™ (Promega®, USA) de acordo com as especificações do fabricante. Os *primers* utilizados amplificam um fragmento de 458 pb e possuem a seguinte seqüência genotípica: *msp5* F: 5' CGC AGA TCT AGC AAA ATC GGC GAG AGG TTT ACC ACT TC 3'e *msp5* R: 5' GCG CTG CAG TGG CGC AAA ATG CCC GAC ATA CC 3'.

As condições para a amplificação do gene *msp5* de *A. marginale* foram: 35 ciclos com desnaturação a 95°C por cinco minutos; extensão a 65°C por dois minutos; anelamento a 72°C por um minuto. A extensão final foi a 72°C por cinco minutos, realizadas em termocicladores PTC-100 (MJ Research®) e Master Cycler Gradient™ (Eppendorf®). As baterias de amplificação das amostras eram compostas pelas amostras a serem pesquisadas e também por uma amostra controle positivo de *A. marginale* proveniente de bovino infectado experimentalmente e uma amostra controle negativo onde o DNA molde foi substituído por igual quantidade de água ultra-pura.

Eletroforese

Os produtos finais da PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) utilizando-se tampão tris-borato-edta (TBE) 1X, aplicando-se uma corrente de 80V/50mA por aproximadamente 80 minutos.

Os produtos amplificados de *A. marginale* foram identificados por comparação com marcadores de peso molecular de 100 pares de bases (Ladder-Gibco BRL), em transluminador sob luz ultravioleta e fotografados com câmera digital Kodak acoplada a filtro UV e analisados com auxílio do programa Adobe Photoshop versão 5.0.

Epidemiologia

A avaliação epidemiológica foi realizada de acordo com estudos conduzidos por Coleman et al. (2001).

Seqüenciamento

Para a confirmação de que os fragmentos, visualizados por eletroforese em gel de agarose, obtidos a partir dos protocolos testados eram decorrentes da amplificação do gene *msp1α* de *A. marginale*, foram seqüenciadas duas amostras positivas de *A. marginale* dos municípios de Cacoal e Nova União, Rondônia e uma amostra do Acre proveniente do município de Plácido de Castro.

Para o sequenciamento das amostras realizou-se a purificação de cada *amplicon* específico obtido na reação de PCR com o *primer* MSP1 α . A separação foi realizada por eletroforese em gel de agarose (*low melting*) a 1,5%; o fragmento obtido do gel foi purificado com o kit SV gel PCR *clean-up* System™ (Promega®) e o produto quantificado no bioanalisador Agilent 2100 Bionalyzer. Utilizou-se o kit DNA 7500 LabChips, sendo seguidas as especificações recomendadas pelo fabricante. Todas as amostras foram analisadas através do uso do software Agilent Biosizing (versão A. 01.10).

A reação de seqüenciamento consistiu em 2 μ L de BigDye 3 (Applied Biosystems™), 2 μ L de tampão Save Money 5X, 2 pmol do *primer* MSP1 α antisense e 8 ng do *amplicon* purificado para uma reação de 10 μ L. A reação de seqüenciamento foi amplificada no termociclador PTC-100 (MJ Research®) com desnaturação previa a 94°C por dois minutos e 25 ciclos de 96°C por 20 segundos, 55°C por 15 segundos e 60°C por quatro minutos.

A seguir, o produto da reação foi precipitado à temperatura ambiente com 40 μ L de isopropanol a 75%, incubado por 15 minutos, centrifugado a 13.000 rpm (14.000 g) por 25 minutos. Após a remoção do sobrenadante foi adicionado 200 μ L de etanol a 60% e submetido à centrifugação a 14.000 g por 5 minutos. O precipitado foi seco à temperatura ambiente.

Antes da realização das corridas eletroforéticas de seqüenciamento, o pellet foi diluído com formamida, desnaturado a 95°C por cinco minutos e depois incubado a 4°C por três minutos. As reações foram realizadas em seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems®).

Alinhamento

O alinhamento foi realizado utilizando o algoritmo de (HIGGINS; SHARP, 1989) implementado no software Clustal X, utilizando parâmetros padrões de abertura e extensão de GAP ("GAP opening: 15; e Gap extension: 6,66). Após a realização de primeiro alinhamento exploratório e retirada das regiões que não continham informação de divergência (tamanhos diferentes) e as que dificultavam o alinhamento de posições mais conservadas, foi realizado o segundo e definitivo alinhamento mostrado na Tabela 1.

Agrupamento

O agrupamento entre as seqüências foi realizado utilizando o algoritmo de UPGMA (SWOFFORD, 2000). O UPGMA é um método hierárquico bastante utilizado para expressar a divergência contida em matrizes de distâncias baseado na divergência média entre os acessos (CRUZ, 2004). Visando avaliar a confiança dos agrupamentos dentro da árvore foram obtidos os valores de "bootstrap" (NEI; KUMAR, 2000). Esta estatística é baseada na contagem do número de vezes que um mesmo nó se repete em n agrupamentos, obtidos a partir da amostragem com reposição dos valores de divergência de cada uma das posições avaliadas no alinhamento das seqüências (LI; GRAUR, 2000; ROCHA, et al., 2002).

Resultados

Rondônia

Pela análise das 1.650 amostras de coágulo sanguíneo bovino proveniente do Estado de Rondônia, correspondentes a 0,19% do rebanho bovino do estado na faixa etária entre 4 e 12

meses, observou-se que 1.627 (98,6%) foram positivas pela amplificação do gene *msp5* de *A. marginale* e 23 negativas, correspondendo a 1,4% do total de amostras analisadas (Fig. 5).

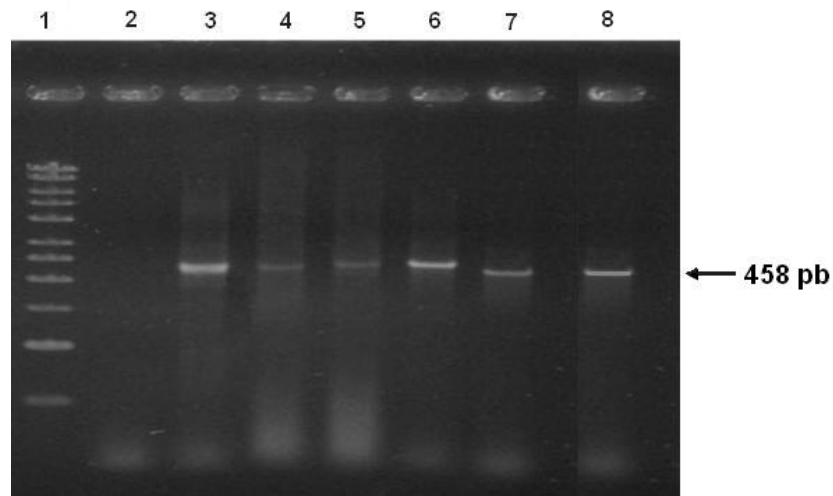


Fig 5. Produto de amplificação de 458 pares de base (pb) do gene *msp5* utilizado para o diagnóstico de *Anaplasma marginale*.

Por regiões, a prevalência foi de 99,15% em Alvorada do Oeste, 98,19% em Ariquemes, 100% em Colorado do Oeste, 98,74% em Cacoal, 98,18% em Guajará-Mirim, 98,47% em Ji-Paraná, 98,7% em Porto Velho e 100% em Vilhena.

A mesorregião Madeira Guaporé apresentou uma prevalência de 98,43% do rebanho amostrado infectado por *A. marginale*. As amostras analisadas nesta mesorregião correspondem a 38,78% do total. Na mesorregião Leste Rondoniense a prevalência foi de 98,6% de infecção, e correspondem a 61,22% das amostras avaliadas para todo o Estado de Rondônia, representadas pelas regiões de Alvorada do Oeste, Ariquemes, Cacoal, Ji-Paraná e Vilhena.

Observou-se uma taxa de infecção de 98,6% de *A. marginale* nas microrregiões de Rondônia, indicando as regiões estudadas como sendo de estabilidade enzoótica, segundo Mahoney (1975).

Tabela 1. Prevalência de *Anaplasma marginale* nas microrregiões de Rondônia.

Microrregiões de Rondônia	Amostras positivas	Amostras negativas	Prevalência de <i>Anaplasma marginale</i>
Alvorada do Oeste	117	1	99,15%
Ariquemes	163	3	98,19%
Colorado do Oeste	9	0	100%
Cacoal	315	4	98,74%
Guajará-Mirim	325	6	98,18%
Ji-Paraná	323	5	98,47%
Porto Velho	305	4	98,7%
Vilhena	70	0	100%
Total	1.627	23	98,6%

Nas mesorregiões Madeira Mamoré e Leste Rondoniense não houve diferença entre a taxa de prevalência do *A. marginale*, sendo esta alta, enzoótica e em equilíbrio entre as localidades analisadas. Estas observações sugerem que estes parâmetros não interferem epidemiologicamente na ocorrência de surtos da doença. O risco de surto nestas condições é mínimo, exceto quando há introdução de animais provenientes de áreas livres ou de áreas

instáveis enzooticamente. Nesta situação, é necessário que estes animais sejam imunizados previamente.

Acre

Os estudos preliminares em 225 amostras sanguíneas proporcionaram o diagnóstico de 208 amostras positivas pela amplificação do gene *msp5* de *A. marginale* e 17 negativas, correspondendo a uma prevalência de 92,87% (Tabela 2).

Tabela 2. Prevalência de *Anaplasma marginale* nas microrregiões do Acre.

Microrregiões do Acre	Amostras positivas	Amostras negativas	Prevalência de <i>Anaplasma marginale</i> no rebanho
Brasiléia	51	7	87,93%
Rio Branco	82	6	93,18%
Cruzeiro do Sul	42	3	93,33%
Tarauacá	33	1	97,06%
Total	208	17	92,87%

Esta alta prevalência também encontrada no Estado do Acre é esperada, uma vez que o Acre encontra-se em área de ocorrência do principal vetor de *A. marginale*, carrapatos do gênero *R. (B.) microplus* (MAHONEY; ROSS, 1972; KUTTLER, 1988; LEITE et al., 1989).

As microrregiões do Estado do Acre enquadram-se como áreas de estabilidade enzoótica para o *A. marginale* devido à alta prevalência observada, corroborando às observações feitas por Rodgers et al. (1978) e Payne e Scott (1982), que afirmam que em regiões de clima tropical, subtropical e temperado do globo são áreas endêmicas para a anaplasmose.

As taxas de prevalências muito próximas observadas entre as diferentes microrregiões amostradas em Rondônia e no Acre demonstram que a infecção por *A. marginale* é homogênea nas regiões estudadas.

A alta sensibilidade e especificidade das técnicas de diagnóstico baseadas em amplificação de DNA se destacam como sendo de grande utilidade em estudos epidemiológicos, sendo capazes de diagnosticar animais portadores de anaplasmose, cuja parasitemia extremamente baixa não poderia ter sido detectada por esfregaços de sangue. Dessa maneira, a vantagem do uso das técnicas de amplificação de DNA em relação às técnicas sorológicas convencionais foi a detecção do parasita nos grupos de animais portadores e em animais jovens assintomáticos.

Identificação dos isolados de *A. marginale*

Visando caracterizar os isolados de *A. marginale* de ocorrência nos estados de Rondônia e Acre, identificou-se através do alinhamento da região de menor variabilidade do gene *msp1a* a presença de cinco tipos de isolados da rickettsia pertencentes às populações provenientes dos estados de São Paulo (São Carlos), Rondônia (Nova União e Cacoal) e Acre (Mâncio Lima/Acre 12 e Plácido de Castro/Acre13).

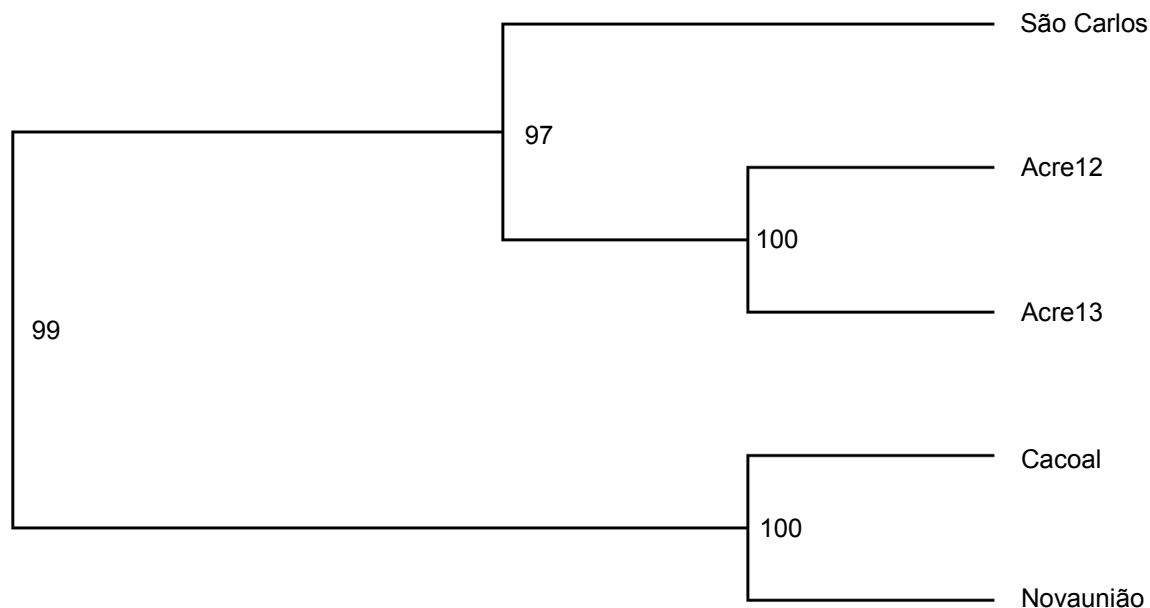


Fig. 6. Cladograma dos acessos de *Anaplasma marginale* obtido pelo agrupamento das estimativas de divergência dos alinhamentos utilizando a técnica do UPGMA. Os valores de bootstrap estão mostrados nos nós de cada grupo.

Discussão

Os resultados obtidos nos estados de Rondônia e Acre não diferem de outros estados do país, onde a infecção por *A. marginale* também é alta e independe de fatores etários e raciais; embora estes fatores não tenham sido analisados no presente estudo. Este resultado é esperado, pois na maioria das áreas compreendidas entre os paralelos 32° Sul e 32° Norte os principais vetores de *A. marginale*, carrapatos do gênero *R. (B.) microplus* estão amplamente difundidos (MAHONEY; ROSS, 1972; KUTTLER, 1988; LEITE et al., 1989).

Como o carrapato *R. (B.) microplus* é considerado o principal transmissor das anaplasmoses no Brasil e suas características epidemiológicas serem similares às babesioses, o conceito de estabilidade/instabilidade enzoótica proposto e aplicado por Mahoney et al., (1973) também tem sido aplicado no estudo das anaplasmoses bovinas. Tendo em vista esse conceito, as microrregiões do Estado de Rondônia enquadram-se como áreas de estabilidade enzoótica para o *A. marginale* por causa da alta prevalência observada nos animais estudados. Em Rondônia e no Acre, a taxa de infecção por *A. marginale* se mostrou similar entre os municípios amostrados, o que pode ser verificado por meio da análise das prevalências obtidas. A presença do *R. (B.) microplus* pode ser observada nestes municípios, o que favorece a infecção dos bovinos criados nestes estados. Tal situação se mostra favorável ao rebanho uma vez que os animais encontravam-se assintomáticos para anaplasmoses no momento da coleta das amostras de sangue, o que é sugestivo da ação do sistema imunológico já sensibilizado pela presença e circulação do parasita no ambiente, demonstrando a importância da presença de *R. (B.) microplus* na manutenção da imunidade contra *A. marginale* nos animais (RIBEIRO, 1991; KESSLER et al., 1992).

Poucas regiões do Brasil possuem situação de instabilidade para *A. marginale*, como exemplo o Estado de Sergipe, onde devido às diferenças climáticas locais a prevalência média é de 16,3% (DALAGNOL et al., 1995). No Município de Bagé, localizado no extremo sul do Estado do Rio Grande do Sul, observou-se uma prevalência de anaplasmoses de 64% pelo teste de cartão (TC) (ARTILES et al., 1995). Nestas regiões de instabilidade, os fatores ecológicos e climáticos determinam a sazonalidade de *R. (B.) microplus* e de dípteros hematófagos, transmissores de *A. marginale*, sendo sugestiva a presença de outras formas de transmissão da doença.

Em Santa Cruz de la Sierra, Bolívia, a soroprevalência observada em zonas ecológicas subtropical úmida, tropical seca e inundada através de ELISA foi de 20,5%, também caracterizando a área como de instabilidade enzoótica (CARRIQUE et al., 2000), sendo a zona subtropical seca desta localidade mais instável, com alto risco de doença e na África do Sul a taxa de prevalência da infecção variou entre 50% e 75% segundo Masika et al. (1997). Em duas áreas diferentes avaliadas na Suíça, Kinhm (2002) detectou 8,2% de amostras positivas para *A. marginale* utilizando a técnica de ELISA.

No Norte de Veracruz, México, estudos indicaram que bovinos infectados com *A. marginale* apresentaram uma prevalência de 69% (COSSIO et al., 1997), associado-se a mortalidade de 26% do rebanho no ano de 1995 e o deslocamento de bovinos susceptíveis a áreas com alta prevalência da enfermidade com subsequente infecção pela mesma.

Alonso et al. (1992) consideraram ainda que para a determinação do perfil de estabilidade/instabilidade enzoótica de uma região deve-se avaliar os fatores inerentes ao animal, tais como, a queda de imunidade em virtude da redução do número de carrapatos, introdução de animais provenientes de área livre e outros fatores de interação com o ambiente, como: raça, variações climáticas, estresse, manejo e tipo de pastagens (KESSLER et al., 1987; DALGLIESH et al., 1990).

A identificação dos isolados de *A. marginale* circulantes nos estados de Rondônia e Acre mostram uma alta divergência genética entre os isolados das regiões Norte e Sudeste, o que pode se justificar pelo baixo fluxo gênico entre as populações estudadas. A presença de baixa variabilidade entre os isolados provenientes de Rondônia, assim como àqueles do Acre demonstram a ocorrência de fluxo gênico entre as populações de *A. marginale* estabelecidas em cada um dos estados da Amazônia Sul Ocidental estudados.

No Brasil, apesar da dificuldade na erradicação do carrapato, deve-se salientar que a sua presença no rebanho permite a manutenção da imunidade contra a anaplasmose, sendo importante conviver com o parasita em níveis suficientes para manter a imunidade, amenizando ao máximo as perdas econômicas causadas. Esta situação ocorre em algumas regiões do Sudeste e Centro-Oeste em que os animais adquirem a infecção nas primeiras semanas de vida ao entrarem em contato com o vetor, mantendo-se infestados no decorrer dos anos (FURLONG; EVANS, 1991; FURLONG, 1993).

Vidotto et al. (1995, 1997, 1998) e Andrade et al. (2001) verificaram que a anaplasmose é endêmica na região norte e noroeste do Estado do Paraná, com situações de instabilidade ou estabilidade enzoótica, dependendo da situação. Casos isolados da doença ou surtos geralmente estão associados a aumentos sazonais da população de *R. (B.) microplus*. Falhas em seu controle ou à introdução de animais susceptíveis, oriundos de áreas livres de carrapato, independente da raça bovina envolvida. Em uma pesquisa realizada em região endêmica do Estado do Paraná utilizando a técnica de imunofluorescência indireta (IFI), verificou-se uma prevalência de 68% para a anaplasmose. Posteriormente nesta mesma área, evidenciou-se 87,6% de positivos pela técnica de ELISA competitivo. Nesta condição epidemiológica, o risco de surtos de anaplasmose é baixo.

Em uma pesquisa sorológica conduzida por Payne e Osorio (1990) no Paraguai, a prevalência encontrada foi de 92%. O parasita também é endêmico na Argentina. Em áreas onde *R. (B.) microplus* tem sido erradicado, ocorrem surtos esporádicos da doença (GUGLIELMONE, 1994), uma vez que o contato com o vetor é essencial para o desenvolvimento da imunidade adquirida.

Estudos realizados em outras regiões brasileiras também demonstraram estado de estabilidade enzoótica para anaplasmose bovina. Em Minas Gerais, a prevalência obtida pelo TC para as regiões do Alto Paranaíba, Metalúrgica, Sul de Minas e Triângulo Mineiro foi de 86,5%, 93,1%, 91,6% e 86,1%, respectivamente, enquanto que para a região da Zona da Mata, avaliada pela IFI, a proporção foi de 81,1% (RIBEIRO et al., 1981, 1984; DALAGNOL et al., 1995).

Pesquisa de anticorpos da classe IgG anti-*A. marginale* através de ELISA indireto em amostras de soros de bovinos da mesorregião do Médio Paraíba (Rio de Janeiro) revelou prevalência de 98,2% (SOUZA et al., 2001). Posteriormente nesta mesma área, Vidotto et al. (1997) observaram por meio da técnica de ELISA competitivo, 87,5% de positivos. A soroprevalência do *A. marginale* avaliada em bovinos de nove municípios da mesorregião Norte Fluminense do Estado do Rio de Janeiro através do ensaio de ELISA indireto revelou que 91,1% foram positivas, demonstrando que a infecção foi alta e homogênea entre os municípios, caracterizando a região estudada como uma área de estabilidade enzoótica (SOUZA et al., 2000). As taxas de prevalências observadas entre as diferentes microrregiões amostradas nos estados de Rondônia e Acre demonstram que a infecção por *A. marginale* é homogênea na região estudada, o que é corroborado pelos diferentes meios de transmissão mecânica, além da transmissão biológica (RIBEIRO, 1991; KESSLER et al., 1992).

Em três microrregiões do Estado da Bahia, a prevalência observada através de ELISA indireto foi de 96,9%; não diferindo significantemente do resultado fornecido pela IFI (97,2%) e de 86% em Santa Catarina, segundo Dalagnol et al. (1995) e nas amostras sorológicas de bovinos de assentamentos rurais do Município de Corumbá, MS, evidenciou-se a presença de anticorpos anti-*A. marginale* em 96% dos casos. Madruga et al. (1986) encontraram prevalência de 91,2%, 100%, 100% e 96,9%, respectivamente para os municípios de Tamarineiro II, Paiozinho, Mato Grande e Taquaral, caracterizando-os como regiões de estabilidade endêmica, resultados muito próximos aos obtidos para as meso e microrregiões estudadas.

Conclusões

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

- As regiões estudadas apresentam características que permitem classificá-las como áreas de endemia estável para o *A. marginale*.
- A técnica de PCR utilizada para diagnóstico mostrou-se adequada para a detecção do *A. marginale* em bovinos, podendo ser indicada para a utilização em investigações epidemiológicas da anaplasmose em outras regiões brasileiras devido à sua alta sensibilidade e especificidade.
- As taxas de infecção de 98,6% em Rondônia e de 92,8% no Acre demonstram risco mínimo de surto de anaplasmose bovina nestes estados, exceto pela introdução de animais provenientes de áreas livres ou de áreas instáveis enzooticamente, os quais necessitarão de imunização prévia.
- Observou-se a presença de variação genotípica entre as populações de *A. marginale* analisadas, as quais podem ser consideradas como tipos distintos dentro das populações amostradas.

Referências

- ALLEMAN, A.R.; BARBET, A.F. Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 270-6, 1996.
- ALONSO, M.; ARELLANO-SOTA, C.; CERESER, V.H.; CORDOVES, C.O.; GUGLIELMONE, A.A.; KESSLER, R.; MANGOLD, A.J.; NARI, A.; PATARROYO, J.H.; SOLARI, M.A.; VEGA, C.A.; VIZCAÍNO, O.; CAMUS, E. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean. **Rev. Sci. Technol. Off. Int. Epiz.**, v. 11, n. 3, p. 713-33, 1992.

ANDRADE, G.M.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M.C.; YOSHIHARA, E.; KANO, F.S.; AMARAL, C.H.S. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in dairy cattle and studies on the dynamics of natural infection of Holstein calves in Southern Brazil. **Semina. Cl. Agr.**, Londrina, v. 22, n. 2, p. 155-9, 2001.

ARTECHE, C.C.P. Imunoprofilaxia da tristeza parasitária bovina (TPB) no Brasil. Uso de cepas atenuadas da *Babesia spp* e de cepa de *Anaplasma*. **A Hora Veterinária**, v. 11, n. 66, p. 39-42, 1992.

ARTILES, J.; ALVES-BRANCO, F.P.J.; MARTINS, J.R.; CORREA, L.B.; SAPPER, M.F.M. Prevalência de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos no estado da Bahia. **Bras. J. Vet. Parasitol.**, v. 4, n. 2, p. 187, 1995.

BARRY, D.N.; PARKER, R.J.; de VOS, A.J. A microplate enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibody to *Anaplasma marginale* in cattle serum. **Aust. Vet. J.**, v. 63, n. 3, p. 76-9, 1986.

BAUMGARTNER, W.; SCHLERKA, G.; FUMICZ, M. Seroprevalence survey for *Anaplasma marginale*-infection of Austrian cattle. **J. Vet. Med.**, v. 39, n. 2, p. 97-104, 1992.

BRITO, L.G.; OLIVEIRA, M.C.S; MOURA, M.M.F.; SILVA NETTO, F.G.. MARIM, A.D.; SOUZA, G.C.R.; SILVA, J.L. **Extração de DNA a partir de coágulos sanguíneos bovinos**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2006. 13 p. (Embrapa Rondônia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 43).

CARRIQUE, J.J.; WIDDOWSON, M.A.; CUÉLLAR, A.M.; RIBERA, H.; WALKER, A.R. Risk of babesiosis and anaplasmosis in different ecological zones of Santa Cruz Department, Bolivia. **Vet. Parasitol.**, v. 93, p. 29-38, 2000.

COLEMAN, P.G., PERRY, B.D.; WOOLHOUSE, M.E.J. Endemic stability a veterinary idea applied to human public health. **Lancet**, v.357, n.9264, p. 1284-6, 2001.

COSSIO, B.R.; RODRIGUEZ, S.D.; GARCIA-ORTIZ, M.A.; GARCIA-TAPIA, D.; ABOYTES-TORRES, R. Bovine anaplasmosis prevalence in northern Veracruz state, Mexico. **Prev. Vet. Med.**, v. 32, p. 165-70, 1997.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2004. v. 1, 480 p.

DALAGNOL, C.A.; MARTINS, E.; MADRUGA, C.R. Prevalência de anticorpos contra *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* em bovinos de corte na região de clima Cfb. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 4, n. 2, p. 220, 1995. Supl. I.

DALGLIESH, R.J.; JORGENSEN, W.K.; DE VOS, A.J. Australian frozen vaccines for the control of babesiosis and anaplasmosis in cattle – A review. **Trop. Anim. Hlth. Prod.**, v. 22, p. 44-52, 1990.

DUZGUN, A.; SCHUNTNER, C.A.; WRIGHT, I.G. A sensitive ELISA technique for the diagnosis of *Anaplasma marginale* infections. **Vet. Parasitol.**, v. 29, p. 1-7, 1988.

ERIKS, I.S.; PALMER, G.H.; MCGUIRRE, T.C.; ALLRED, D.R.; BARBET, A.F. Detection and quantitation of *Anaplasma marginale* in carrier cattle by using a nucleic acid probe. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, n. 2, p. 279-84, 1989.

- ERIKS, I.S.; STILLER, D.; PALMER, G.H. Impact of persistent *Anaplasma marginale* Rickettsemia on tick infection and transmission. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 8, p. 2091-96, 1993.
- FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região sudeste do Brasil. **Cad. Téc. Vet.**, UFMG. v. 8, p. 49-61, 1993.
- FURLONG, J.; EVANS, D. Epidemiologia do carrapato *Boophilus microplus* no Brasil: necessidade de uma abordagem compreensível para seu estudo realístico. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 7., SIMPÓSIO SOBRE A MOSCA-DOS-CHIFRES *Haematobia irritans*, 2, 1991, São Paulo. **Anais...** São Paulo: CBPV, 1991. p. 48-50.
- GOFF, W.L.; STILLER, D.; ROEDER, R.A.; JOHNSON, L.W.; FALK, D.; GORHAM, J. R.; MCGUIRE, T.C. Comparison of a DNA probe, complement fixation and indirect immunofluorescence tests for diagnosing *Anaplasma marginale* in suspected carrier cattle. **Vet. Microbiol.**, v. 24, p. 381, 1990.
- GONZALES, J.C. **O controle do carrapato do boi**. São Paulo: Mestre Jou, 1995. 104 p.
- GRISI, L.; MASSARD, C.L.; BORJA, G.E.M.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, n. 21, p. 8-10, 2002.
- GUGLIELMONE, A. Epidemiologia y prevencion de los hemoparasitos (*Babesia* y *Anaplasma*) em la Argentina. In: NARI, A.; FIEL, C. **Enfermedades parasitarias de importancia econômica em bovinos**. Montevideo, Uruguay: Hemisferio Sur, 1994. p. 460-79.
- HIGGINS D.G., SHARP P.M. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer **Bioinformatics**, v. 5, p. 151-153, 1989.
- IBGE. **Microrregiões geográficas dos estados de Rondônia e Acre**. Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=3&i=P>>. Acesso em: 24 nov. 2006.
- JORGEJAN, F.; PERRY, B.D.; MOORHOUSE, P.D.S. Epidemiology of bovine babesiosis and anaplasmosis in Zambia. **Trop. Anim. Hlth Prod.**, v. 24, n. 1, p. 9-14, 1988.
- JORGENSEN, W.K.; WEILGAMA, D.J.; NAVARATNE, M. Prevalence of *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* at selected localities in Sri Lanka. **Trop. Anim. Hlth. Prod.**, v. 24, p. 9-18, 1992.
- KESSLER, R.H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 21, n. 4: 177-179, 2001.
- KESSLER, R.H.; MADRUGA, C.R.; JESUS, E.F.; SEMPREBOM, D.V. Isolamento de cepas puras de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em área enzoótica. **Pesq. Agrop. Bras.**, n. 22, v. 7, p. 747-52, 1987.
- KESSLER, R.H.; SCHENK, M.A.M.; MADRUGA, C.R.; SACCO, A.M.S.; MIGUITA, M. Tristeza parasitária dos bovinos (TPB). In: CHARLES T.P.; FURLONG, J. (Ed.). **Doenças parasitárias dos bovinos de leite**. Coronel Pacheco: Embrapa-CNPGL, 1992. p.1-30.
- KINHM, U. Anaplasmosis bovina en Suiza. **Informaciones Sanitarias**, v. 15, n. 37, p. 177, 2002.

KOCAN, K.M.; FUENTE, de la J.; BLOUIN, E.F.; GARCIA-GARCIA, J.C. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. **Parasitol.**, v. 129, p. 285-300, 2004.

KOCAN, K.M.; FUENTE, de la J.; GUGLIELMONE, A.A.; MELÉNDEZ, R.D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 16, p. 698-712, 2003.

KUTTLER, K.L. World-wide impact of babesiosis. In: RISTIC, M. (Ed). **Babesiosis of domestic animals and man**. Florida: CRC-Press, 1988. v. 1, p. 1-15.

LEITE, A.M.O.; ARNONI, J.; SILVA, S.S.; FARIAS, N.; CRUZ, H.; NISHIKAWA, H. Serological study of bovine babesiosis in a marginal area of Brasil. NATIONAL VETERINARY HEMOPARASITE DISEASE CONFERENCE, 8., 1989, St. Louis. **Proceedings...** St. Louis: Veterinary Hemoparasitic Disease Research Workers, 1989. p. 624-35.

GRAUR, D.; LI, W.-H. **Fundamentals of molecular evolution**. 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1999. 481 p.

MADRUGA, C.R.; KESSLER, R.H.; SACCO, A.M.S. **Produção de antígenos e análise preliminar do teste de imunofluorescência indireta para diagnóstico de anticorpos anti-*Anaplasma marginale***. Campo Grande, MS: Embrapa-CNPGC, 1986. p. 1-4.

MAHONEY, D.F. The diagnosis of babesiosis in Australia. In: WELLS, E.A. WORKSHOP ON HEMOPARASITES (ANAPLASMOSIS AND BABESIOSIS), 1975, Cali. [**Proceedings...**]. Colombia: CIAT, 1975. p. 49-62.

MAHONEY, D.F.; ROSS, D.R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Aust. Vet. J.**, v. 48, p. 292-8, 1972.

MARTINS, J.R.; CORRÊA, B.L. Babesiose e anaplasmosse bovina: aspectos destas enfermidades. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 1, n. 1, p. 51-8, 1995.

MASIKA, P.J.; SONANDI, A.; Van AVERBEKE, W. Perceived causes, diagnosis and treatment of babesiosis and anaplasmosis in cattle by livestock farmers in communal areas of the Central Eastern Cape Province, South Africa. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v. 68, p. 40-4, 1997.

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

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**. New York: Oxford, 2000. 333 p.

PALMER, G.H.; BROWN, W.C.; RURANGIRWA, F.R. Antigenic variation in the persistence and transmission of the Ehrlichia *Anaplasma marginale*. **Microbes and Infectious**, Paris, v. 2, p. 167-76, 2000.

PALMER, G.H.; McELWAIN, T.F. Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. **Parasitol. Today**, Amsterdam, v. 57, p. 233-53, 1995.

PAYNE, R.C.; OSORIO, O. Tick-borne diseases of cattle in Paraguay I. Seroepidemiological studies on anaplasmosis and babesiosis. **Trop. Anim. Hlth. Prod.**, n. 2, p. 53-60, 1990.

PAYNE, R.C.; SCOTT, J.M. Anaplasmosis and babesiosis in El Salvador. **Trop. Anim. Health Prod.**, p. 75-80, 1982.

- RIBEIRO, M.F.B. **Morfologia, evolução e reprodução do *Anaplasma marginale* Theiler, 1910 em células epiteliais intestinais de teleóginas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Estudo ao microscópio óptico e eletrônico.** 1991. 134f. Tese (Doutorado) – UFMG, Belo Horizonte.
- RIBEIRO, M.F.B.; PATARROYO, J.H.; SANTOS, J.L.; FARIAS, J.E. Epidemiologia da anaplasmose bovina no estado de Minas Gerais. I. Prevalência de anticorpos aglutinantes e fluorescentes na Zona da Mata. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, n. 36, v. 4, p. 425-32, 1984.
- RIBEIRO, M.F.B.; REIS, R. Prevalência da anaplasmose em quatro regiões do estado de Minas Gerais. **Arq. Esc. Vet.**, UFMG, v. 33, n. 1. p. 57-62, 1981.
- RISTIC, M.; McINTYRE, I. **Diseases of cattle in the tropics: economic and zoonotic relevance.** The Hague: Martinus Nijhoff, 1981. 662p. (Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science, 6).
- ROCHA, R. B. ; MURO ABAD, J. I. ; PIRES, I. E. ; ARAÚJO, E. F. . Fingerprint and Genetic Diversity Analysis of Eucalyptus spp. Genotypes Using RAPD and SSR Markers. **Scientia Forestalis**, v. 62, p. 24-31, 2002.
- RODGERS, R.J.; BLIGHT, G.W.; KNOTT, S.S. A study of the epidemiology of *Anaplasma marginale* infections of cattle of complement-fixing antibodies. **Aust. Vet. J.**, v. 54, n. 3, p. 115-20, 1978.
- RONDÔNIA, Agência de Defesa Agrosilvopastoril do Estado de Rondônia. **Relatório parcial da 19ª etapa de vacinação contra febre aftosa.** Porto Velho: IDARON, 2005. 6p.
- SOUZA, J.C.P.; SOARES, C.O.; MADRUGA, C.R.; MASSARD, C.L. Prevalência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em bovinos na mesorregião do Médio Paraíba. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 309-14, 2001.
- SOUZA, J.C.P.; SOARES, C.O.; MASSARD, C.L.; SCOFIELD A.; FONSECA, A.H. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, p. 97-101, 2000.
- SWOFFORD, D. L. **PAUP Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods) 4.0 Beta.** Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2002.
- VIDOTTO, M.C., VIDOTTO, O., ANDRADE, G.M. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* on cattle in Parana State, Brasil, by major surface protein 5 competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. **Ann. N. Y. Acad. Sc.**, n. 849, p. 424-6, 1998.
- VIDOTTO, O., ANDRADE, G.M., AMARAL, C.H.S. Freqüência de anticorpos contra *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale* em rebanhos de bovinos leiteiros da região de Londrina, PR. **Arq. Bras. Med.Vet.**, v. 49, n. 5, p. 659-65, 1997.
- VIDOTTO, O.; MARANA, E.R.M. Diagnóstico em anaplasmose bovina. **Ciência Rural**, n. 31, v. 2, p. 361-8, 2001.
- VIDOTTO, O.; YAMAMURA, M.M.; ANDRADE, G.M.; BARBOSA, C.S.; FREIRE, R.L.; VIDOTTO; M.C. Ocorrência de *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale* em rebanhos de bovinos leiteiros da região de Londrina, PR. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, n. 4, p. 184, 1995. Supl. 1.
- VIRESHAKUL, N.; KAMPER, S.; BOWIE, M.V.; BARBET, A.F. Sequence and expression analysis of a surface antigen gene family of the Rickettsia *Anaplasma marginale*. **Gene**, v. 253, n. 1, p. 45-53, jul.2000.