

Cesária Fiossiane Nomboro

Monografia

Caracterização de *Anaplasma* spp. pelo método molecular: Estudo de caso na Unidade

Nguluzane Agro-pecuária Lda. Província de Gaza

Licenciatura em Agro-pecuária com Habilitação em Extensão Agrária

Universidade Pedagógica de Maputo

Maputo

2023

Cesária Fiossiane Nomboro

Caracterização de *Anaplasma* spp pelo método molecular: Estudo de caso na Unidade
Nguluzane Agro-pecuária Lda. Província de Gaza

Monografia Científica a ser apresentada à Direcção de Curso de Ciências Agro-pecuárias, da Faculdade de Engenharias e Tecnologias (FET) da Universidade Pedagógica de Maputo como requisito para a obtenção do grau de Licenciatura em Agro-pecuária com Habilitação em Extensão Agrária.

Supervisor: Mestre Manuel Bata

Co-supervisor: Doutor Carlos António Matos

Universidade Pedagógica de Maputo

Maputo

2023

Índice

| | |
|--|-----|
| LISTA DE TABELAS..... | i |
| LISTA DE ANEXOS..... | i |
| LISTA DE FIGURAS..... | i |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | ii |
| DECLARAÇÃO DE HONRA..... | iv |
| DEDICATÓRIA..... | v |
| AGRADECIMENTOS..... | vi |
| RESUMO..... | vii |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. Problema de estudo e justificativa..... | 3 |
| 1.2. Objectivos..... | 4 |
| 1.2.1 Geral..... | 4 |
| 1.2.2 Específicos..... | 4 |
| 1.3. Hipóteses..... | 4 |
| 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 5 |
| 2.1. Breve histórico do género <i>Anaplasma</i> spp..... | 5 |
| 2.2. Agentes etiológicos..... | 6 |
| 2.2.1. <i>Anaplasma marginale</i> | 6 |
| 2.2.2. <i>Anaplasma centrale</i> | 7 |
| 2.2.3. <i>Anaplasma bovis</i> | 8 |
| 2.2.4. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> | 8 |
| 2.2.5. <i>Anaplasma platys</i> | 9 |
| 2.3. Diagnóstico de anaplasrose..... | 10 |
| 2.3.1. Diagnóstico directo de anaplasrose..... | 10 |
| 2.3.2. Diagnóstico sorológico de anaplasrose..... | 10 |
| 2.3.3. Diagnóstico molecular..... | 11 |
| 2.4. Funcionamento básico da técnica da reacção em cadeia da polimerase (PCR)..... | 11 |
| 2.5. Funcionamento básico da electroforese em gel de agarose..... | 12 |
| 2.6. Depósito de sequências no GenBank / banco de dados..... | 13 |
| 2.7. Funcionamento básico do BLAST ou análise das sequências..... | 13 |

| | |
|---|----|
| 2.8. Filogenética e sua importância..... | 13 |
| 2.9. Tratamento da anaplasmoses..... | 14 |
| 2.10. Controle da anaplasmoses..... | 14 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 15 |
| 3.1. Caracterização da área do Estudo..... | 15 |
| 3.1.1. Produção pecuária em Gaza..... | 15 |
| 3.2. Desenho do estudo..... | 15 |
| 3.3. Procedimentos metodológicos..... | 16 |
| 3.3.1. Extração do DNA..... | 16 |
| 3.3.2. Ensaio da PCR convencional (cPCR) para <i>Ehrlichia</i> spp. baseada no fragmento do genes <i>16S rRNA</i> | 16 |
| 3.3.3. Ensaio da PCR convencional (cPCR) para <i>Anaplasma marginale</i> baseado no fragmento do genes <i>Msp5</i> | 17 |
| 3.3.4. Electroforese do DNA em gel de agarose..... | 18 |
| 3.3.5. Purificação dos Produtos Reamplificados..... | 18 |
| 3.3.6. Sequenciamento do DNA..... | 18 |
| 3.3.7. Análise das sequências..... | 18 |
| 3.3.8. Análise Filogenética..... | 19 |
| 4. RESULTADOS..... | 20 |
| 4.1. Detecção molecular da anaplasmoses..... | 20 |
| 4.2. Resultado da electroforese em gel de agarose..... | 20 |
| 4.3. Análise de sequências/similaridade..... | 22 |
| 4.3.1. Análise de sequências de <i>Anaplasma</i> spp. do gene <i>16S rRNA</i> e <i>msp5</i> e <i>Anaplasma marginale</i> detectados em bovinos amostrados em Nguluzane..... | 22 |
| 4.3.2. Análise de sequências de <i>Anaplasma marginale</i> do gene <i>msp5</i> detectados em bovinos amostrados em Nguluzane..... | 24 |
| 4.3.3. Análise filogenética de sequências dos genes <i>16S rRNA</i> e <i>msp5</i> de <i>Anaplasma</i> spp. e <i>Anaplasma marginale</i> amplificadas em amostras de bovinos de Nguluzane..... | 24 |
| 4.3.3.1. Árvore filogenética de <i>Anaplasma</i> spp..... | 24 |
| 4.3.3.2. Árvore filogenética de <i>Anaplasma marginale</i> | 25 |

| | |
|------------------------------------|----|
| 5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS..... | 27 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 29 |
| 7. RECOMENDAÇÕES..... | 30 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 31 |
| 9. Anexos..... | 45 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Amostras positivas à <i>Anaplasma</i> spp e <i>Anaplasma marginale</i> | 20 |
| Tabela 2: Número de acesso no Genbank | 22 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|---|----|
| Anexo I: Mapa de localização da área do estudo..... | 46 |
| Anexo II: Resultados do diagnóstico da PCR..... | 47 |
| Anexo III: Colheita até ao processamento das amostras no laboratório..... | 52 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura1: Resultados da electroforese em gel de agarose a 1.5%..... | 20 |
| Figura2: Resultados da electroforese em gel de agarose a 1.5%..... | 21 |
| Figura3: Resultados da electroforese em gel de agarose a 1.5%..... | 21 |
| Figura4: Resultados da electroforese em gel de agarose a 1.5%..... | 21 |
| Figura 5: Análise filogenética de <i>Anaplasma</i> spp..... | 25 |
| Figura 6: Análise filogenética de <i>Anaplasma marginale</i> | 26 |

LISTA DE ABREVIATURAS

A – Adenina

BLAST – Ferramenta Básica de Busca de Alinhamentos Locais

cPCR – Reacção em cadeia da polimerase convencional

°C – Graus Celsius

Ca – Cálcio

C – Citosina

DCA – Direcção de Ciências Animais

DNA – Acido desoxirribonucléico

DTC – Doenças transmitidas por carraças

dNTP's – trifosfatos desoxirribonucleotídeos

16S – Sequência de DNA não codificante correspondente à subunidade 16S do RNA ribossomal

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

EUA – Estados Unidos da América

EESP – Exame de esfregaço de sangue periférico

FAO – Fundo das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

G – Guanina

Genbank – Banco de dados de sequências genéticas

H₂O – Água

IIAM – Instituto de Investigação Agrária de Moçambique

INE – Instituto Nacional de Estatística

LCV – Laboratório Central da Veterinária

LGC – Laboratory of the government Chemist

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

µl – Microlitro

ml – Mililitro

MSP – Proteínas principais de superfície

MAE – Ministério da Administração Estatal

MICOA – Ministério para a Coordenação da acção Ambiental

MV – Máxima Verossimilhança

PCR – Reacção em cadeia da polimerase

pb – Pares de bases

primer – Oligonucleotídeo iniciador

rRNA – Ácido ribonucléico ribossômico

RNA – Ácido ribonucléico

® – Marca registada

spp – Espécie não determinada

16S rRNA – Porção 16S do RNA ribossômico

T – Timina

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

Taq – Enzima DNA polimerase isolada de uma bactéria *Thermus aquaticus*

DECLARAÇÃO DE HONRA

Eu Cesária Fiossiane Nomboro, declaro por minha honra que o presente trabalho intitulado “Caracterização de *Anaplasma* spp. pelo método molecular: Estudo de caso na Unidade Nguluzane Agro-pecuária Lda. Província de Gaza” é da minha autoria sob orientação do meu supervisor e co-supervisor. Declaro ainda que este trabalho não foi apresentado em nenhuma instituição para a obtenção de qualquer grau académico, que não seja para a minha candidatura ao grau de Licenciatura em Agro-pecuária com a Habilitação em Extensão Agrária na Faculdade de Engenheiras e Tecnologias (FET) da Universidade Pedagógica de Maputo.

Maputo, Fevereiro de 2023

(Cesária Fiossiane Nomboro)

DEDICATÓRIA

Dedico esta monografia aos meus pais Fiossiane Nomboro e Angélica Chume, que Deus os tenha no seu paraíso, aos meus irmãos nomeadamente, Victória, Artemisa, Benildo, Olência, Danilson e Vânia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pela sua presença constante, ajudando-me a superar as dificuldades e a vencer mais uma etapa na vida. Não cheguei ao fim, mas ao início de uma longa caminhada.

Aos meus pais, Fiossiane Nomboro e Angélica Chume, que ainda em vida abriram mão de seus sonhos para que os meus se realizassem. Obrigada pelo sonho que realizo hoje, e sobretudo, pela lição de amor que me ensinaram durante toda a vida.

Aos meus irmãos, Victória, Artemisa, Benildo, Olência, Danilson e Vânia, e toda a minha família em geral, obrigada por entenderem e compreenderem a atenção que muitas vezes não pude dar, as datas que não pudemos comemorar juntos, as alegrias e tristezas que não compartilhamos, e pelo amparo nos momentos mais difíceis.

Ao meu supervisor Mestre Manuel Bata, por acreditar no meu potencial, pela orientação e disponibilidade, ao co-supervisor Doutor Carlos António Matos, pelo seu auxílio no processamento das amostras, atenção e paciência na partilha de conhecimentos, e ao dr Carlos Siteo pela ajuda na colheita das amostras.

À Universidade Pedagógica de Maputo, por me ter concedido a vaga para cursar Agro-pecuária em seu programa de Licenciatura, à Direcção dos Serviços Sociais Pela concessão da bolsa de estudo para que meu sonho pudesse ser realizado, e a todos os docentes do Curso de Ciências Agro-pecuárias que participaram directamente no meu processo de aprendizagem. À Unidade de Nguluzane Agro-pecuária Lda. pelas amostras concedidas para a realização deste trabalho.

À agência de Energia Atómica, pelos reagentes, e ao Laboratório Central da Veterinária (DCA, IIAM), por ter me proporcionado a realização deste trabalho de pesquisa, em especial aos pesquisadores do sector da Parasitologia, Virologia e Biologia molecular que receberam-me com toda disponibilidade e atenção.

RESUMO

Anaplasmosose, doença causada por várias espécies de *Anaplasma* causa redução do peso corporal do animal, diminuição da produção de leite, aborto e por último a morte. Embora as espécies de *Anaplasma* spp. sejam altamente difundidas em ruminantes domésticos e selvagens do mundo todo, poucos estudos foram realizados até ao momento com o intuito de detectar e/ou investigar a sua diversidade em bovinos em Moçambique. No presente estudo, ensaios moleculares foram realizados para investigar a ocorrência de *Anaplasma* spp. e *Anaplasma marginale* em 105 amostras de sangue de bovinos (35 vitelos/as, 35 novilhos e 35 vacas) da Unidade de Produção Nguluzane Agro-pecuária Lda. no Distrito de Xai-Xai, Província de Gaza. Todas as amostras foram submetidas ao protocolo da Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR) baseado em um fragmento gene *16S rRNA* e *Anaplasma marginale* baseado em um fragmento gene *Msp5*. Os resultados, mostraram uma ocorrência global de 95.23% (100/105) de amostras positivas para *Anaplasma* spp. gene *16S rRNA* filogeneticamente relacionadas a *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, *Anaplasma ovis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma sp. Omatjenne*, *Candidatus Anaplasma camelii*, *Candidatus Anaplasma cinensis* e *Candidatus Anaplasma Shandongen*. Foi igualmente detectadas 92.38% (97/105) para *Anaplasma marginale* gene *Msp5*. Para cada categoria foram detectadas 94.28% (33/35) em vitelos/as, 100% (35/35) em novilhos e 91.42% (32/35) em vacas de *Anaplasma* spp gene *16S rRNA* e para *Anaplasma marginale* gene *Msp5*, foram detectadas 91.42% (32/35) em vitelos/as, 97.14% (34/35) em novilhos e 85.71% (30/35) em vacas. No entanto, cinco (5) amostras de DNA foram negativas à *Anaplasma* spp gene *16S rRNA* e oito (8) amostras negativas à *Anaplasma marginale* gene *Msp5*. Do sequenciamento foram seleccionadas 15 sequências de *Anaplasma* spp. e 15 de *Anaplasma marginale* representativas para a construção das árvores filogenéticas. O resultado da análise filogenética demonstrou similaridade de 99-100% com sequências previamente encontradas no BLASTn, detectada nos países da África (África do Sul, Benin, Egito, Moçambique e Quênia), América (Brasil, Estados Unidos da América) e Ásia (Índia, Tailândia, Sri Lanka, Paquistão, Bangladesh, China e Turquia). Conclui-se que todas as categorias de bovinos estão infectados com *Anaplasma marginale* na Unidade de Nguluzane.

Palavras Chaves: Caracterização molecular, *Anaplasma* spp., bovinos, PCR, Nguluzane-Gaza.

1. INTRODUÇÃO

As Doenças transmitidas por carrças estão amplamente distribuídas por todo mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Dos 1.226 milhões de bovinos no mundo, 80% estão infestados por carrças (FAO, 1984). Os agentes transmitidos por estes ectoparasitas, são responsáveis por doenças que provocam importantes perdas na indústria pecuária principalmente na produção de bovinos e pequenos ruminantes (JONGEJAN *et al.*, 1994). Diversas espécies de carrças actuam como vectores de diversos agentes patogénicos nomeadamente os agentes da família Anaplasmataceae que ameaçam a saúde dos animais e dos seres humanos. Considerando os resultados de estudos recentes, é possível que a constante interferência do homem na natureza, aliada às actuais mudanças climáticas, estejam contribuindo para o aumento da dispersão e resistência parasitária dos vectores, e consequentemente, favorecendo a disseminação de *Anaplasma* spp. em localidades outrora com baixa incidência desses agentes (FERNANDES *et al.*, 2019).

Em Moçambique, a infecção do gado bovino e outros ruminantes por doenças transmitidos por carrças causa perdas económicas significativas às produções pecuárias (FERNANDES *et al.*, 2019; MARTINS *et al.*, 2008; 2010; MATOS *et al.*, 2019; TEMBUE *et al.*, 2011). As principais doenças transmitidas por carrças com impacto em bovinos incluem, a anaplasmose, erliquiose, babesiose e teileriose (SIMUUNZA *et al.*, 2011; TEMBUE *et al.*, 2011). A anaplasmose é causada por rickettsias do género *Anaplasma*, pertencentes a família Anaplasmataceae e ordem Rickettsiales (KOCAN *et al.*, 2003). A doença encontra-se distribuída mundialmente (KOCAN *et al.*, 2010; AUBRY *et al.*, 2011). É uma doença que acomete rebanhos bovinos, mas pode ocorrer em outros ruminantes, como bubalinos (*Bubalus bubalis*). A sintomatologia clínica em casos agudos da doença, caracteriza-se por febres, perda de peso, diminuição na produção de leite, aborto e em muitos casos determinam a morte dos animais infectados (KOCAN *et al.*, 2003; LIS *et al.*, 2015). Os principais animais acometidos por esta doença são ruminantes e caninos selvagens. A sua transmissão ocorre pela picada de carrças durante o repasto sanguíneo (SILAGHI *et al.*, 2017).

A infecção por estes protozoários resulta em febres, perda de peso, diminuição na produção de leite, aborto e morte. Quando há recuperação do animal, este permanece infectado e torna-se

reservatório deste agente (KOCAN *et al.*, 2003; LIS *et al.*, 2015). Dentre as espécies que afectam os animais domésticos destacam-se *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, *Anaplasma bovis* e *Anaplasma phagocytophilum* que afectam bovinos, *Anaplasma ovis* que afectam ovinos e *Anaplasma platys* que afecta cães (DUMLER *et al.*, 2001).

A *Anaplasma marginale* é descrita como um dos protozoários de maior importância, face à sua alta morbidade e mortalidade que acarreta aos bovinos e outros ruminantes (FERNANDES, *et al.*, 2019). KOCAN *et al.* (2010); SILAGHI *et al.* (2017), apontaram a existência de mais 20 espécies de carrças relacionadas com a transmissão da anaplasmose, sendo os principais géneros o *Dermacentor* sp. com maior distribuição nas regiões temperadas, e *Rhipicephalus* sp. nas regiões tropicais.

ALFREDO *et al.* (2005), detectaram *Anaplasma marginale* em bovinos no distrito de Tete, utilizando o teste de cartão de aglutinação, TEMBUE *et al.* (2011), detectaram *Anaplasma marginale* em bovinos na província de Maputo, Gaza e Inhambane, pelo iELISA e ainda *Anaplasma* sp. foi detectado em bovinos na província de Maputo por BEKKER *et al.* (2002) e MARTINS *et al.* (2010), pela técnica de RLB (Hibridização de Blot Linha Reverse). Recentemente, MACHADO *et al.* (2016), detectaram *Anaplasma* sp. relacionados a *Anaplasma centrale*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma platys* e *Anaplasma phagocytophilum* em búfalos selvagens na reserva de Marromeu em Sofala e na província de Maputo, FERNANDES *et al.* (2019), detectaram *Anaplasma* spp. filogeneticamente associados a *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma ovis*, e ‘*Candidatus Anaplasma booleense*’ em bovinos pelos testes moleculares.

1.1. Problema de estudo e justificativa

As carraças estão amplamente distribuídos em todo Moçambique, sendo a sua diversidade e intensidade variável em função de vários factores, entre eles, os agroecológicos, o manejo higiénico-sanitário e o tipo de raças de animais em criação (DIAS, 1960; 1993; DE MATOS, 2008). As diferentes raças de bovinos comportam-se de forma diferente perante as infestações por carraças. Enquanto raças taurinas são mais susceptíveis, as zebuínas apresentam certa resistência em climas tropicais. (JONSSON *et al.*, 2000; FABURAY *et al.*, 2005). As doenças transmitidas por carraças (DTC's) representam uma grande ameaça à pecuária em regiões tropicais e subtropicais (JONGEJAN *et al.*, 1994; JENSENIUS *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2013). Estas DTC's são endémicas nos rebanhos Moçambicanos e são a causa de perdas económicas significativas na produção de bovinos (FERNANDES *et al.*, 2019; MARTINS *et al.*, 2008; 2010; MATOS *et al.*, 2019; TEMBUE *et al.*, 2011). Em geral, os impactos negativos causados pela anaplasrose em bovinos no sector pecuário são a queda na produção de leite, perda de peso dos animais, altos custos com tratamentos, que aliados ao aumento nas taxas de mortalidade e de abortos, acabam por determinar a perda da eficiência produtiva destes rebanhos, diminuindo a renda do produtor e a rentabilidade da exploração (SACCO, 2001; KOCAN *et al.*, 2003; BOCK *et al.*, 2004).

Poucos estudo até ao momento foram realizados para investigar molecularmente a ocorrência de *Anaplasma* spp. e sua diversidade em ruminantes de Moçambique. No sul do país, foi detectado *Anaplasma* sp. em bovinos na província de Maputo por BEKKER *et al.* (2002) e MARTINS *et al.* (2010) por hibridização de linha reverse. TEMBUE *et al.* (2011), por iElisa detectaram *Anaplasma marginale* em bovinos na província de Maputo, Gaza e Inhambane, e recentemente FERNANDES *et al.* (2019), utilizando testes sorológicos e moleculares detectaram *Anaplasma* spp. filogeneticamente associados a *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma ovis*, e '*Candidatus Anaplasma booleense*' em bovinos na província de Maputo. Tais achados enfatizam a necessidade da utilização de diferentes protocolos da PCR baseados em distintas regiões génicas a fim de explorar a diversidade de genótipos e espécies em uma dada amostra biológica. Por conseguinte, a ocorrência de *Anaplasma* spp. na Unidade de Nguluzane Agro-pecuária Lda, uma empresa com

grande efectivo bovino, permitirá a implementação de medidas sanitárias adequadas, o que pode no futuro estabelecer uma relação causal em relação à susceptibilidade a doença. Assim, no presente estudo, propõe-se a caracterizar a ocorrência de *Anaplasma* spp, em bovinos com recurso ao diagnóstico molecular na Unidade de Nguluzane Agro-pecuária Lda. O estudo servirá para a percepção da ocorrência do *Anaplasma marginale* que é o principal agente causador de anaplasmosse bovina, o que auxiliará na tomada de decisões sanitárias e aprimoramento de outras medidas de manejo sanitário. Dado que o estudo fez a caracterização filogenética da *Anaplasma* spp. os resultados deste estudo podem ajudar na tomada de decisões na quarentena em processos de importação e exportação e na manutenção de estabilidade enzoótica na região.

1.2. Objectivos

1.2.1. Geral

- ✓ Caracterização molecular de espécies de *Anaplasma* spp. que infectam bovinos na empresa Nguluzane Agro-pecuária Lda, na Província de Gaza.

1.2.2. Específicos

- ✓ Detectar molecularmente *Anaplasma* spp. em amostras de sangue de bovinos por meio de ensaios da PCR convencional (cPCR);
- ✓ Realizar inferências filogenéticas de *Anaplasma* spp. que ocorre na manada de Nguluzane Agro-pecuária Lda, na Província de Gaza.

1.3. Hipóteses

H1: Existem casos positivos de anaplasmosse na manada de Nguluzane;

H2: Filogeneticamente, a anaplasmosse na manada de Nguluzane, possui ancestralidade evolutiva comum às espécies circulantes à dos outros países.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Breve histórico do género *Anaplasma* spp.

O género *Anaplasma* foi descrito em 1910 na África do Sul por Sir Arnold Theiler, que ao visualizar eritrócitos de bovinos doentes, muitos deles acometidos por *babesiose*, encontrou estruturas nas margens destas células (*Anaplasma marginale*) e concluiu tratar-se de um outro agente causador de doenças, ainda desconhecido (KOCAN *et al.*, 2010). O género *Anaplasma* pertence à Ordem Rickettsiales, a qual sofreu um processo de reclassificação proposta por DUMLER *et al.* (2001), baseada em análises moleculares dos genes 16S RNA ribossomal (16S rRNA) e genes de proteínas de superfície (MSPs). Actualmente, a ordem Rickettsiales está dividida em duas famílias, Rickettsiaceae (organismos intracitoplasmáticos pertencentes aos géneros *Rickettsia* e *Orientia*) e Anaplasmataceae (organismos localizados em vacúolos intracitoplasmáticos, pertencentes aos géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* e *Wolbachia*) (DUMLER *et al.*, 2001). Três espécies de *Anaplasma* foram descritas anteriormente tais como, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale* e *Anaplasma ovis*, sendo estes, patógenos específicos de ruminantes. Com a nova reclassificação, foram incluídas ao género *Anaplasma* as seguintes espécies, *Anaplasma platys* (anteriormente *E. platys*), *Anaplasma bovis* (anteriormente *E. bovis*), e *Anaplasma phagocytophilum*. Esta última espécie englobou os agentes anteriormente denominados *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* e o agente da HGE (*Erlíquiose Granulocítica Humana*) (DUMLER *et al.*, 2001). Recentemente novas espécies foram propostas ao género *Anaplasma*, *Anaplasma odocoilei* TATE *et al.* (2013) e *Anaplasma capra* LI *et al.* (2015).

O crescente uso de técnicas moleculares para detecção de patógenos, tem propiciado a descrição de novos agentes. A exemplo disto, YBAÑEZ *et al.* (2012), identificaram uma possível nova espécie de *Anaplasma* sp. relacionada à *Anaplasma phagocytophilum*, detectada em *Cervus nippon* oriundos de Hokkaido, no Japão. GUO *et al.* (2016), por sua vez, propuseram a inclusão de uma nova espécie no género sob estudo, ‘*Candidatus Anaplasma boleense*’, a qual foi detectada em mosquitos na China e recentemente em bovinos em Moçambique por FERNANDES *et al.* (2019). Actualmente o género *Anaplasma* compreende seis espécies

nomeadamente, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, *Anaplasma ovis*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Anaplasma platys* (AKTAS, 2014; DUMLER, 2005). As espécies de *Anaplasma* que infectam ruminantes domésticos, incluindo bovinos, são *Anaplasma marginale*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma central*, *Anaplasma ovis*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Anaplasma platys* (DAHMANI *et al.*, 2015; PARK ET *et al.*, 2018). Diversas espécies de carraças vectores e hospedeiros vertebrados estão envolvidos no ciclo de vida de *Anaplasma* spp. (KIESER *et al.*, 1990; KOCAN *et al.*, 1992; CASTRO *et al.*, 2001; VILLAR *et al.*, 2016; BATTILANI *et al.*, 2017). Após a alimentação das carraças em hospedeiros infectados por *Anaplasma* spp., ocorre a primeira replicação das bactérias no epitélio do intestino médio dos vectores. Posteriormente, as bactérias migram para o epitélio das glândulas salivares, onde ocorre um segundo ciclo de replicação, de maneira que possam ser transmitidas pela saliva quando a carraça se alimenta no próximo hospedeiro vertebrado (UETI *et al.*, 2009). Algumas das espécies desse género são de potencial zoonótico, representando um risco à saúde humana quando o gado é infectado (FERNANDES, *et al.*, 2019; SIMUUNZA *et al.*, 2011; TEMBUE *et al.*, 2011). De acordo com alguns estudos feitos em Moçambique, conclui-se que uma alta diversidade de espécies de *Anaplasma* spp. ocorrem em bovinos, o que torna imperioso a realização de mais estudos, já que existe um potencial risco de infecção para os seres humanos e bovinos, devido a ocorrência do *Anaplasma phagocytophilum* (*anaplasrose granulocítica humana*). Além disso, os animais domésticos têm sido relatados como potenciais reservatórios para infecções zoonóticas (FERNANDES, *et al.*, 2019).

2.2. Agentes etiológicos

2.2.1. *Anaplasma marginale*

Anaplasma marginale é um patógeno que infecta hemácias de ruminantes causando a anaplasrose bovina. O principal transmissor de *Anaplasma marginale* é a carraça *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (MARTINS, 1995). As rickettsias ao chegarem no intestino da carraça, infectam as células intestinais onde se desenvolvem e migram para outros tecidos da carraça, incluindo as glândulas salivares, via esta utilizada para a transmissão da *Anaplasma marginale* para outros animais (KOCAN *et al.*, 2010). *Anaplasma marginale* ocasiona uma enfermidade

grave nos ruminantes. Em relação aos sinais clínicos, a fase aguda da anaplasmose bovina está associada à febre, perda de peso, aborto, diminuição da produção de leite, e ocasionalmente morte (KOCAN *et al.*, 2003). Os animais que sobrevivem à infecção tornam-se permanentemente infectados, actuando como reservatórios. Tais animais contribuem para a manutenção da endemicidade da doença nos rebanhos (KOCAN *et al.*, 2010). Em Moçambique, os vectores conhecidos para *Anaplasma marginale* são espécies de carraças pertencentes aos géneros *Rhipicephalus* e *Hyalomma* (MARTINS *et al.*, 2008; MATOS, 2008; TEMBUE *et al.*, 2011). A sua distribuição é mundial, embora esteja presente principalmente em regiões tropicais. Nos últimos anos vem se observando um aumento em sua propagação por influência do aquecimento global, o que propicia um maior deslocamento de vectores. Outro factor que contribui para a disseminação deste agente envolve a circulação de animais infectados de áreas endémicas para regiões não endémicas (KOCAN *et al.*, 2010; BATTILANI *et al.*, 2017). ALFREDO *et al.* (2005) relataram uma soroprevalência para *Anaplasma marginale* de 63%, no distrito de Tete, MACHADO *et al.* (2016) relataram uma taxa de soroprevalência de 72,2% de positividade para *Anaplasma marginale* em búfalos selvagens na Reserva de Marromeu em Sofala, TEMBUE *et al.* (2011) encontraram uma soroprevalência de 76,5% e FERNANDES *et al.* (2019) relataram uma taxa de soroprevalência de 86,3% para *A. marginale* em bovinos amostrados no Sul de Moçambique.

2.2.2. *Anaplasma centrale*

Anaplasma centrale ocasiona uma enfermidade leve, comparada àquela produzida por *Anaplasma marginale*. Esta característica propicia a utilização deste patógeno como uma vacina viva contra a anaplasmose bovina. Entretanto, esta prática não tem a capacidade de induzir imunidade total contra *Anaplasma marginale* nos animais vacinados. Adicionalmente, o referido ensaio de vacinação necessita de animais doadores, o que aumenta o risco de transmissão de outros hemoparasitas (KOCAN *et al.*, 2015; BATTILANI *et al.*, 2017). Esta bactéria também infecta ruminantes e encontra-se distribuída principalmente em regiões tropicais e subtropicais, cuja ocorrência mostra-se menor que aquela verificada para *Anaplasma marginale*. A espécie *Rhipicephalus simus* é seu vector comprovado, a transmissão de *Anaplasma centrale* ocorre

através da picada de determinadas espécies de carrças (PALOMAR *et al.*, 2015; TESHALE *et al.*, 2015; BATTILANI *et al.*, 2017).

2.2.3. *Anaplasma bovis*

Anaplasma bovis, parasita de monócitos e macrófagos, é comumente detectado em bovinos (*Bos taurus*) e búfalos africanos (*Syncerus caffer*) (OOSHIRO *et al.*, 2008). Encontra-se distribuído essencialmente na África, Ásia e América do Sul, embora já tenha sido relatado no sul da Europa e nos EUA (YBAÑEZ *et al.*, 2016; BATTILANI *et al.*, 2017). A transmissão é feita principalmente pelas carrças *Hyalomma* sp., *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Haemaphysalis* spp. (UILENBERG *et al.*, 1993; DUMLER *et al.*, 2001; GOETHERT; TELFORD, 2003; HARRUS *et al.*, 2010; PALOMAR *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2014). Em relação à manifestação da doença, bovinos e búfalos geralmente apresentam sinais clínicos moderados, porém casos mais graves já foram relatados na literatura BATTILANI *et al.* (2017), existindo ainda, risco de morte para os animais. Os principais sinais clínicos incluem febre, perda de peso, e diarreia. Alguns animais exibem inchaço na cabeça e lacrimejamento, enquanto que danos ao sistema nervoso central, embora já relatados, sejam menos comuns (SREEKUMAR *et al.*, 1996, LIU *et al.*, 2012; YBAÑEZ *et al.*, 2016).

2.2.4. *Anaplasma phagocytophilum*

Anaplasma phagocytophilum é considerado um patógeno responsável por uma zoonose emergente nos Estados Unidos e Europa (KOCAN *et al.*, 2015). Entre seus hospedeiros vertebrados conhecidos incluem-se os seres humanos, além de ruminantes, carnívoros, roedores, aves e répteis (STUEN *et al.*, 2013; KOCAN *et al.*, 2015; BATTILANI *et al.*, 2017). Encontra-se distribuído geograficamente por toda a Europa, Ásia e EUA. Também já foi detectado na África e América do Sul. A transmissão de *Anaplasma phagocytophilum* envolve algumas espécies de carrças pertencentes ao gênero *Ixodes*. Encontram-se descritas duas espécies de *Ixodes* associadas a este agente – *Ixodes ricinus* e *Ixodes ventralloi* (SANTOS *et al.*, 2004). *Ixodes ricinus* é, sem dúvida, o vector mais importante uma vez que parasita uma ampla variedade de

hospedeiros, incluindo os animais de companhia, o Homem e diversos animais silvestres, (SANTOS *et al.*, 2018). A inoculação de sangue contaminado parece ser um modo de transmissão menos comum (FINE *et al.*, 2016). Todavia, existem relatos de transmissão deste agente para animais e humanos através da exposição à amostras de tecidos e sangue infectado (BAKKEN *et al.*, 1996; BATTILANI *et al.*, 2017). Como consequência, o referido agente causa imunossupressão, a qual pode propiciar a ocorrência de infecções oportunistas (WOLDEHIWET, 2010; KOCAN *et al.*, 2015). Em ruminantes, *Anaplasma phagocytophilum* causa enfermidade conhecida como Febre da Pastagem ou Febre da carraça WOLDEHIWET (2010), caracterizada principalmente por febre alta, e redução da produção de leite. Infecções secundárias por *Staphylococcus aureus* também já foram observadas, devido ao efeito imunossupressor de *Anaplasma phagocytophilum* (WOLDEHIWET, 2006; BATTILANI *et al.*, 2017). A *Anaplasma phagocytophilum* causa anaplasmoze granulocítica em equinos e seres humanos. Anaplasmoze granulocítica equina, por sua vez, é caracterizada por febre, falta de apetite, dificuldade de locomoção (FRANZÉN *et al.*, 2005). Pacientes humanos infectados podem apresentar desde uma doença assintomática até um quadro grave (BAKKEN *et al.*, 2015). A Anaplasmoze granulocítica humana caracteriza-se por febre, dores de cabeça, náuseas, tosse, mal-estar, mialgia, e rigidez cervical. Diarreia e vômitos são menos comumente relatados. Em casos raros, alguns pacientes podem desenvolver síndrome de choque séptico ou tóxico, síndrome de desconforto respiratório agudo, ou infecções oportunistas por outros agentes, como vírus ou fungos (BAKKEN *et al.*, 2015; BATTILANI *et al.*, 2017).

2.2.5. *Anaplasma platys*

Anaplasma platys é um agente que infecta plaquetas de cães, ocasionando a doença denominada trombocitopenia cíclica canina. Também foi relatada a infecção por este patógeno em gatos LIMA *et al.* (2010), raposas (*Vulpes vulpes*), camelos bactrianos (*Camelus bactrianus*), veados-vermelhos (*Cervus elaphus*), cervos-sika (*Cervus nippon*), bovinos e em seres humanos (HARVEY *et al.*, 1978; MAGGI *et al.*, 2013; QUROLLO *et al.*, 2014; CARDOSO *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2015a; LI *et al.*, 2015b; DAHMANI *et al.*, 2015; BATTILANI *et al.*, 2017). O referido agente possui distribuição mundial, tendo a carraça *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (s.l.) como possível vector (SIMPSON *et al.*, 1991; INOKUMA *et al.*, 2000; YBAÑEZ *et al.*, 2012).

Em cães, a infecção pode manter-se assintomática ou apresentar sinais clínicos como, febre, perda de peso, mucosas pálidas, e linfonodomegalia (BRADFIELD *et al.*, 1996; BOUZOURAA *et al.*, 2016; BATTILANI *et al.*, 2017). Até o momento não foram descritos sinais clínicos associados à infecção por *Anaplasma platys* em ruminantes. O referido agente já foi molecularmente detectado em seres humanos na Venezuela e nos EUA (ARRAGA-ALVARADO *et al.*, 2014; MAGGI *et al.*, 2014).

2.3. Diagnóstico da anaplasrose

Diversas técnicas para o diagnóstico de *Anaplasma* spp. estão disponíveis, tais como exame de esfregaço de sangue periférico (EESP), SINGH *et al.* (2012), testes sorológicos TORIONI *et al.* (1998), métodos moleculares e subinoculação de sangue em bezerro esplenectomizado AUBRY *et al.* (2011). EESP tem baixa sensibilidade enquanto os testes sorológicos estão predispostos a reacções cruzadas (STRIK *et al.*, 2007). Por outro lado, o método que utiliza subinoculação de sangue é relativamente demorado e caro, portanto, métodos moleculares como PCR têm sido os métodos preferidos em vários estudos epidemiológicos transversais (AUBRY *et al.*, 2011).

2.3.1. Diagnóstico directo de anaplasrose

Tradicionalmente, o diagnóstico directo é realizado pelo exame directo de esfregaço de sangue periférico corado por Giemsa, no qual é possível identificar a presença dos parasitas através de microscopia de luz. Entretanto, esta técnica possui uma baixa sensibilidade, uma vez que somente permite o diagnóstico em animais com infecção aguda, enquanto que os animais assintomáticos não são diagnosticados, sendo estes últimos os que mais contribuem para a manutenção da endemicidade da doença, pois actuam como reservatórios para a transmissão dos hemoparasitas (BULING *et al.*, 2007; BRITO *et al.*, 2010, 2013).

2.3.2. Diagnóstico sorológico de anaplasrose

Kits comerciais de Ensaio Imunoenzimático competitivo (cELISA) baseados em proteínas *msp5* de *Anaplasma marginale*, embora apresentem alta sensibilidade, geram reacções cruzadas contra

outros organismos do gênero *Anaplasma*, provavelmente devido à alta conservação do gene *msp5*, o que traz inespecificidade a estes testes. Esta proteína possui a característica de ser conservada e altamente estável em *Anaplasma* spp., cuja função é ainda desconhecida (KOCAN *et al.*, 2015). Testes de Fixação do Complemento e de Aglutinação em Cartão, outrora utilizados no diagnóstico sorológico da anaplasmoze em bovinos, apresentam baixa sensibilidade durante o período de incubação da enfermidade e em cursos de infecções persistentes (BRADWAY *et al.*, 2001; COETZEE *et al.*, 2005; KOCAN *et al.*, 2015).

2.3.3. Diagnóstico molecular

A reacção em cadeia da polimerase (PCR) é sensível e específica, necessitando de mínimas quantidades de DNA para obtenção de cópias suficientes para que possam ser detectadas em uma matriz inerte GARIBYAN *et al.* (2013), sendo mais sensível e específica, pois possibilita a amplificação do DNA alvo mesmo em baixa concentração. Técnicas moleculares como a PCR, tornaram-se ferramentas úteis ao diagnóstico de uma série de patologias que acometem tanto aos animais quanto ao homem, e vem sendo utilizadas de forma cada mais rotineira para o diagnóstico das hemoparasitoses que acometem os animais de produção (FIGUEROA *et al.*, 1993; ISHMAEL *et al.*, 2008). Os testes moleculares, além de permitirem maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico das infecções por *Anaplasma* spp. essas técnicas permitem o sequenciamento e a filogenia para prever padrões futuros de invasão e diversidade (EREMEEVA *et al.*, 2011; OGDEN *et al.*, 2006).

2.4. Funcionamento básico da técnica da reacção em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR é uma técnica usada no laboratório, que permite detectar e medir genes específicos de DNA ou RNA com precisão. A PCR requer uma molécula de DNA, sequências iniciadoras de síntese (*primers*), desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), enzima DNA polimerase Taq, íons de magnésio (cofactor da polimerase), solução tampão de reacção e água ultrapura. Os *primers* são responsáveis por flanquearem a sequência específica a ser amplificada, funcionando como um ponto de iniciação e terminação para a DNA polimerase. Os dNTPs são as quatro bases nucleotídicas – adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G) – que são usadas pela DNA

polimerase para realizar a síntese da sequência alvo que originará o produto de amplificação da reacção. A PCR apresenta ampla gama de aplicações em vários ramos da pesquisa científica. Essa reacção possibilita que determinada região do genóma de qualquer organismo seja multiplicada em milhões de cópias, o que facilita a análise genética e permite o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico muito mais sensíveis e mais específicas. O procedimento da PCR envolve três fases, a desnaturação inicial, anelamento e a extensão final. Essas fases ocorrem em temperaturas diferentes e são programadas no aparelho chamado termociclador, onde as amostras são incubadas. A desnaturação inicial consiste na separação da dupla fita do DNA a ser amplificado. O DNA genómico contendo a sequência a ser amplificada é desnaturado por aquecimento em torno de 90°C em diante dependendo do protocolo. O Anelamento consiste na ligação do iniciador ou “*primer*” ao DNA a ser amplificado. Uma vez desnaturado o DNA, a temperatura da reacção é reduzida para permitir que os *primers* se anelem em cada uma das fitas unifilamentares, o que possibilita que o DNA polimerase inicie a incorporação dos dNTPs. Nesta etapa o ciclo dura cerca de 3 ou mais minutos e compreende as três etapas da reacção, separação das cadeias, ligação dos *primers* e síntese das novas cadeias. O ciclo pode ser repetido 30 ou mais vezes. A Extensão final consiste na polimerização propriamente dita. A polimerização é uma reacção em que as pequenas moléculas, denominadas monómeros, se combinam quimicamente para formar estruturas mais longas (macromoléculas). Após o fim da PCR, os produtos amplificados são separados a partir de seu peso molecular através da técnica de electroforese em gel de agarose (KUBISTA *et al.*, 2006; ISHMAEL; *et al.*, 2008; GARIBYAN; *et al.*, 2013).

2.5. Funcionamento básico da electroforese em gel de agarose

A electroforese em gel de agarose é um método simples e eficiente usado no laboratório que permite separar e identificar moléculas de DNA ou RNA de acordo com o seu tamanho e carga eléctrica. Para que se realize a electroforese é necessário a preparação do gel de agarose, aplicação das amostras, corrida electroforética, análise e registo dos resultados. O gel deve ser preparado ajustando-se as concentrações apropriadas para separar os fragmentos de DNA presente na amostra. A agarose utilizada no gel é um polissacarídeo que forma uma rede e permite regular a velocidade da migração das moléculas durante a separação. Após a aplicação

das amostras encaixa-se a tampa da cuba contendo os cabos que permitem a conexão entre a cuba e a corrente. As bandas são visualizadas por meio da coloração com reagentes fluorescentes intercalantes de ácidos nucleicos, como brometo de etídeo e, outros corantes que possuem afinidade por ácidos nucleicos (NASCIMENTO *et al.*, 1999; SOUZA, 2003).

2.6. Depósito de sequências no GenBank / banco de dados

Banco de dados é a ferramenta de informações genómicas de apoio bibliográfico. É uma ferramenta muito usada na bioinformática. Uma coleção anotada de todas as sequências de DNA publicamente disponíveis (MIZRACHI, 2010). Um dos principais banco de dados sobre informações genómicas é o banco de dados do Centro Nacional para Informação Biotecnológica dos EUA (NCBI), disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov (SOUZA, 2011).

2.7. Funcionamento básico do BLAST ou análise das sequências

BLAST é a ferramenta que procura regiões de similaridade local entre as sequências e faz comparação de sequências de DNA ou RNA com os bancos de dados genómicos. Com isto, o programa é capaz de identificar relação entre sequências que compartilham similaridade mesmo que esta ocorra somente em algumas regiões isoladas e calcula a significância estatística da diferença entre elas. Um banco de dados organiza e estrutura as informações de modo a facilitar consultas, actualizações e deleções de dados (ALTSCHUL *et al.*, 1990, EMBRAPA, 2007).

2.8. Filogenética e sua importância

Filogenética é o campo da biologia que busca identificar e compreender as relações evolutivas entre as diferentes formas de vida na Terra. Os primeiros critérios objectivos para a reconstrução filogenética baseavam-se em dados morfológicos. Com o acesso recente à estrutura de macromoléculas (DNA, RNA e proteínas), as análises filogenéticas passaram a ter um avanço vertiginoso. O conceito de filogenia surgiu com Darwin, junto com o próprio conceito de ancestralidade entre espécies, que foi representado por meio de uma árvore, que indica supostas relações de ancestralidade entre as espécies (SOUZA, 2011). Uma árvore filogenética é uma

representação gráfica de relações ancestral-descendente entre organismos ou sequências genéticas e deve ser considerada como uma hipótese de um relacionamento evolutivo entre um grupo de organismos (CALDART *et al.*, 2016).

2.9. Tratamento da anaplasnose

O tratamento de anaplasnose pode ser efectuado com antibióticos de amplo espectro ou Dipropionato de imidocarb. Antibióticos de amplo espectro nomeadamente: Doxiciclina. Cloridrato de oxitetraciclina e enrofloxacina (PEREIRA-MAIA *et al.*, 2010; KAARTINEN *et al.*, 1995).

2.10. Controle da anaplasnose

Banhos carracidas mais frequentes contribuem eficazmente no controle da doença (THOMPSON *et al.*, 1978). Bovinos oriundos de regiões livres podem ser protegidos contra a anaplasnose pela administração de tetraciclina, por via intramuscular ou endovenosa, no intervalo de duas a três semanas (THE MERCK VETERINARY MANUAL, 1973). Existem medidas preventivas já estabelecidas, como por exemplo, a premunição, quimioprofilaxia e vacinas (FARIAS, 2007).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Caracterização da área do Estudo

O estudo foi realizado na empresa Nguluzane Agro-pecuária Lda, em Julho de 2021, localizada no bairro Patrice Lumumba, no Distrito de Xai-Xai na província de Gaza. Geograficamente, o Distrito é delimitado a Sul de Moçambique pelo Oceano Índico, a Norte pelos Distritos de Chibuto e Chókwè, a Este pelo distrito de Bilene e Oeste pelo distrito de Mandlakazi (MAE, 2014). O clima predominante da região é tropical seco, com temperaturas médias anuais acima de 25°C (MAE, 2005; MICOA, 2012). A região possuem solos argilosos e arenosos (INE, 2020).

3.1.1. Produção pecuária em Gaza

O fomento pecuário tem sido fraco. Porém, o investimento privado e a tradição na criação de gado e uso de tracção animal, conduziram ao crescimento do efectivo bovino de 22 mil cabeças em 2000, para cerca de 38 mil cabeças em 2004, cuja exploração é feita por vários criadores privados e familiares, servidos por algumas infra-estruturas de apoio. Os animais domésticos mais importantes para o consumo familiar são as galinhas, os patos e os cabritos, enquanto que, para a comercialização, são os bois, os cabritos, os porcos e as ovelhas. Dada a existência de boas áreas de pastagem e de fontes de água próximas, existem boas condições para o desenvolvimento da pecuária no distrito, sendo as doenças e a falta de fundos e de serviços de extensão, os principais obstáculos ao seu desenvolvimento (MAE, 2005). Em termos de exploração pecuária existem cinco empresas formais de criação de gado com infra-estruturas próprias. As principais empresas privadas pecuárias são a Empresa Agro-Pecuária de Novela, Agropecuária das Lizírias, Agro-Pecuária Anglusane, Agro-Pecuária de Carvalho e produção de Leite (Nguluzane) e a Agro-pecuária Ribeiro (MAE, 2014).

3.2. Desenho do estudo

Foram colhidas aleatoriamente 105 amostras de sangue de bovinos de raça Brahman das seguintes categorias, 35 vitélos/as, 35 novilhos e 35 vacas, pertencentes a Unidade de Produção de

Nguluzane Agro-pecuária Lda, na província de Gaza. As amostras foram colhidas numa manga de tratamento pela veia cocígea, em tubos contendo anticoagulante EDTA (ácido etileno diaminotetra acético) para extração do DNA e posterior a realização da PCR. Um animal corresponde a uma amostra e os mesmos estão identificados em números de acordo com o anexo II. Os animais foram categorizadas por idade (7-12 meses vitelos; 1-2 anos novilhos; 5-10 anos vacas), e sexo (machos e fêmeas). A manga tem uma dimensão completa de 1.200m² dividido em compartimentos. De cada bovino foram colectados 2-5 ml de sangue. Após a colheita, as amostras foram colocadas num colman e mantidas em gelo à uma temperatura de 2°C a 8°C, transportadas de carro durante 3 horas até a chegada ao laboratório Central da Veterinária (LCV-DCA) e armazenadas a -20°C durante 3 dias. As amostras foram aliquotadas em microtubos do tipo *Eppendorf* de 1,5 ml e mantidas a -20°C durante 2 meses para posterior extração do DNA genómico.

3.3. Procedimentos metodológicos

3.3.1. Extração do DNA

A extração do DNA de sangue dos bovinos amostrados foi realizada no Laboratório Central da Veterinária, Direcção de Ciências Animais de Maputo (DCA-IIAM), Moçambique. O DNA foi extraído a partir de 200 µL de sangue de cada amostra, utilizando-se um kit comercial QIAamp[®] DNA Mini Kit, (250) QIAGEN Hilden, Germany, de acordo com as instruções do fabricante. As amostras tiveram sua concentração de DNA e relações 260/280 mensuradas em aparelho espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, EUA). Posteriormente foram armazenadas a -20 °C até a realização dos ensaios da PCR.

3.3.2. Ensaios da PCR convencional (cPCR) para *Ehrlichia* spp. baseada no fragmento do gene *16S rRNA*

Todas às amostras de DNA foram submetidas à cPCR, baseada no gene *16S rRNA*, usando os seguintes primers: farword:5' CGT ATT CAC CGT GGC ATG-3' e reverse: 5' GGT TTA ATT CGA TGC AAC GCG A-3'. A reacção foi realizada num volume total de 25 µ contendo os

seguintes reagentes: Água ultra pura ou RNase-free water: 11.3 μ ; Buffer ou tampão: 2.5 μ ; MgCl₂: 1.5 μ ; DNTP's: 2.0 μ ; Taq: 0.2 μ ; 1.25 μ de cada primer, e 5 μ de DNA da amostra totalizando 25 μ . A sequência térmica e o tempo da PCR foram aplicados com uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, anelamento seguido de 35 ciclos que compreende três fases com desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Este processo foi realizado em aparelho termociclador modelo GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Água ultra pura (Promega®) foi utilizada como controlo negativo para todas as reacções e DNA positivo à *Anaplasma* como o controlo-positivo.

3.3.3. Ensaios da PCR convencional (cPCR) para *Anaplasma marginale* baseado no fragmento do gene *Msp5*

Posteriormente, todas as amostras foram todas submetidas a ensaios da cPCR baseados no gene *Msp5*, usando os seguintes primers: Amar msp5 eF: (GCA TAG CCT CCG CGT CTT TC) Amar msp5 eR: (TCC TCG CCT TGG CCC TCA GA) Amar msp5 iF: (TAC ACG TGC CCT ACC GAG TTA), a fim de detectar *Anaplasma marginale*, utilizando protocolo previamente descrito por SINGH *et al.* (2012). A reacção foi realizada num volume total de 25 μ contendo os seguintes reagentes: Água ultra pura ou RNase-free water:11.3 μ ; Buffer ou tampão:2.5 μ ; MgCl₂:1.5 μ ; DNTP's:2.0 μ ; Taq:0.2 μ ; 1.25 μ de cada primer, e 5 μ de DNA da amostra totalizando 25 μ . A sequência térmica e o tempo da PCR foram aplicados com uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, anelamento seguido de 34 ciclos que compreende três fases com desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Este processo foi realizado em aparelho termociclador modelo GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Água ultra pura (Promega®) foi utilizada como controlo negativo para todas as reacções e DNA positivo à *Anaplasma marginale* como controlo-positivo. Os produtos da PCR foram submetidos à electroforese horizontal em gel de agarose a 1.5%.

3.3.4. Electroforese do DNA em gel de agarose

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1.5%, em tampão de corrida TAE (Rotiphorese® Tampon 50x TAE) a 10%. A eletroforese foi realizada a 90V/250mA durante 60 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Promega, Madison, Estados Unidos). Os resultados foram visualizados e analisados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta acoplado a um programa computacional de análise de imagens (Biometra TI 1).

3.3.5. Purificação dos produtos reamplificados

Após a reacção da PCR para *Anaplasma* spp. e *Anaplasma marginale*, foram seleccionados os amplicons reamplificados positivos representativos e purificados utilizando-se Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Ref A 9282 (promega, Estados Unidos) de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação do DNA purificado foi realizada em aparelho espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, EUA).

3.3.6. Sequenciamento do DNA

O Sequenciamento do DNA consistiu no método de SANGER *et al.* (1977), conhecido como método de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeo que permite determinar a ordem exacta dos nucleotídeos em um segmento. Denomina-se sequenciamento as técnicas ou métodos utilizados para identificar uma sequência de DNA ou RNA. A sequência do DNA ou RNA é um pré-requisito para a análise detalhada de um gene. O sequenciamento dos amplicons foi realizado no LGC (laboratory of the government Chemist) laboratório de química do governo em Berlin na Alemanha.

3.3.7. Análise das sequências

As sequências de nucleotídeos provenientes do sequenciamento foram inseridas no programa Phred Phrap EWING (1998), para avaliação da qualidade dos eletroferogramas. Bases com

qualidade acima de 20 foram consideradas confiáveis. Também no mesmo programa foram geradas as sequências Consenso. As sequências consenso foram obtidas utilizando o programa CAP3 (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/MobyliPortal/portal.py>). O programa BLASTn ALTSCUL *et al.* (1990) foi usado para comparar as identidades dos nucleotídeos obtidos com sequências depositadas no banco de dados (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (BENSON *et al.*, 2002).

3.3.8. Análise Filogenética

As sequências de nucleotídeos salvas em modo “FASTA” foram alinhadas com outras sequências homólogas do mesmo gene sequenciado, retiradas do banco de dados (Genbank), utilizando o software MAFFT. Os alinhamentos salvos em modo “FASTA” foram transformados em modo Nexus, Phylip e Mega pelo site Alignment Transformation Environment (ambiente de transformação de alinhamentos) (GLEZ-PEÑA *et al.*, 2010). Para a construção das árvores filogenéticas foi realizada análise de Máxima Verossimilhança utilizando a plataforma online IQtree (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>). Análise de Máxima Verossimilhança é um método estatístico em que os estimadores atribuem à amostra a maior probabilidade de ser observada. O modelo evolutivo foi encontrado utilizando o software jModelTest 2 (GUINDON *et al.*, 2003; DARRIBA *et al.*, 2012). Os suportes dos cladogramas para as análises de Máxima Verossimilhança foram avaliados através de análises de bootstrap FELSENSTEIN (1985) de 1000 repetições. A edição da árvore filogenética assim como o enraizamento (via grupo externo) foi realizada utilizando o software Treegraph 2.0.56-381 beta (STOVER *et al.*, 2010).

4. RESULTADOS

4.1. Detecção molecular da anaplasmosose

Todas as amostras submetidas a cPCR foram positivas à *Anaplasma* spp. baseado no gene *16S rRNA* 94.28% (33/35) em vitelos/as; 100% (35/35) em novilhos e 91.42% (32/35) em vacas; com uma ocorrência global de 95.23% (100/105) respectivamente e foram positivas à *Anaplasma marginale* baseado no gene *msp5* 91.42% (32/35) em vitelos/as; 97,14% (34/35) em novilhos e 85.71% (30/35) em vacas; com uma ocorrência global de 92.38% (97/105). No entanto cinco (5) amostras foram negativas à *Anaplasma* spp. e oito (8) amostras negativas à *Anaplasma marginale* (Tabela 1).

Tabela 1: Percentagens das amostras positivas à *Anaplasma* spp. e *Anaplasma marginale*.

| Categoria animal | Número de amostras | de Positivos a <i>Anaplasma</i> spp (%) | Positivos a <i>Anaplasma marginale</i> (%) |
|-------------------------|---------------------------|--|---|
| Vitelos/as | 35 | (33/35) 94.28% | (32/35) 91.42% |
| Novilhos | 35 | (35/35) 100% | (34/35) 97,14% |
| Vacas | 35 | (32/35) 91.42% | (30/35) 85.71% |
| Totais | 105 | (100/105) 95.23% | (97/105) 92.38% |

4.2. Resultado da electroforese em gel de agarose

Todas as amostras positivas à electroforese em gel de agarose apresentaram uma linha ou banda bem definida de 450pb para *Anaplasma* spp. (Figura 1 e 2) e 458pb para *Anaplasma marginale* (Figura 3 e 4).



Figura 1: Resultados da electroforese em gel de agarose a 1.5%, onde observam-se fragmentos de DNA de aproximadamente 450pb de acordo com a indicação da seta, que caracterizam os

produtos amplificados. M: marcador do peso molecular (100bp), C- controlo negativo, C+ controlo positivo.

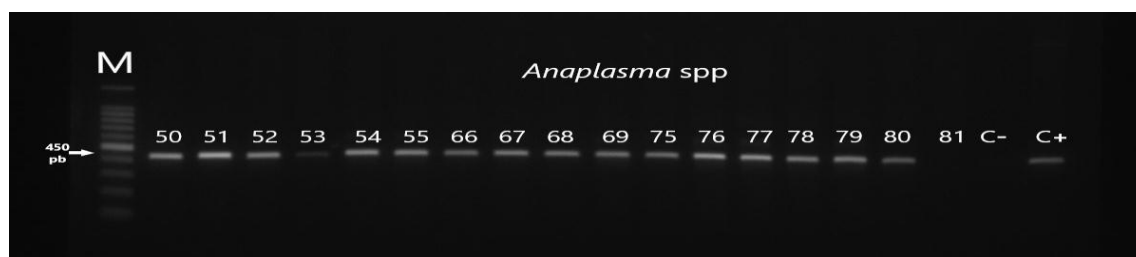


Figura 2: Resultados da electroforese em gel de agarose a 1.5%, onde observam-se fragmentos de DNA de aproximadamente 450pb de acordo com a indicação da seta, que caracterizam os produtos amplificados. Uma (1) amostra foi negativa à *Anaplasma spp.*



Figura 3: Resultados da electroforese em gel de agarose a 1.5%, onde observam-se fragmentos de DNA de 458pb de acordo com a indicação da seta, que caracterizam os produtos amplificados.

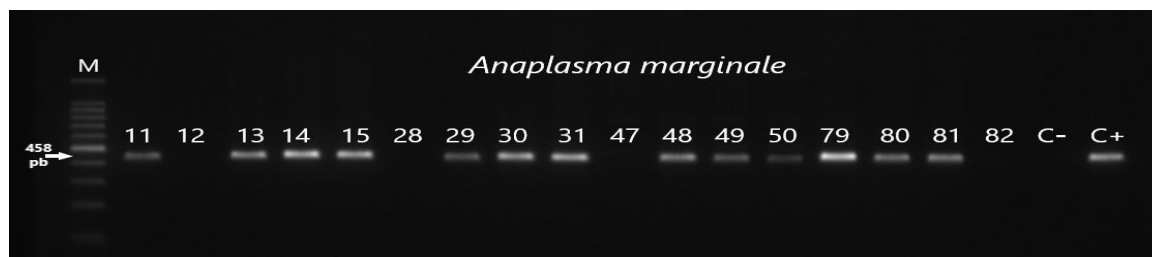


Figura 4: Resultados da electroforese em gel de agarose a 1.5%, onde observam-se fragmentos de DNA de 458pb de acordo com a indicação da seta, que caracterizam os produtos amplificados. Quatro (4) amostras foram negativas à *Anaplasma marginale*.

Dentre às amostras positivas, foram sequenciadas e depositadas no banco de dados 30 sequências representativas sendo 15 de *Anaplasma* spp. que é igual número de *Anaplasma marginale* respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Número de acesso no banco de dados das sequências de fragmentos dos genes *16S rRNA* e *msp5* (*Anaplasma* spp. e *Anaplasma marginale*) obtidas neste estudo.

| Número de ordem | Identificação da Amostra | Número de acesso no Genbank | |
|-----------------|--------------------------|-----------------------------|-------------|
| | | <i>16S rRNA</i> | <i>Msp5</i> |
| 1 | 9 | OM365905 | OQ363888 |
| 2 | 11 | ON408396 | OQ363889 |
| 3 | 16 | ON408397 | OQ363890 |
| 4 | 18 | ON408398 | OQ363891 |
| 5 | 34 | OM365908 | OQ363892 |
| 6 | 44 | ON408401 | OQ363893 |
| 7 | 46 | ON408402 | OQ363894 |
| 8 | 50 | ON408404 | OQ363895 |
| 9 | 54 | OM365909 | OQ363896 |
| 10 | 64 | ON408408 | OQ363897 |
| 11 | 75 | OQ362286 | OQ363898 |
| 12 | 77 | OQ362287 | OQ363899 |
| 13 | 101 | OQ362288 | OQ363900 |
| 14 | 104 | OQ362289 | OQ363901 |
| 15 | 105 | OQ362290 | OQ363902 |

4.3. Análise de sequências/ similaridade

4.3.1. Análise de sequências de *Anaplasma* spp. do gene *16S rRNA* e *msp5* e *Anaplasma marginale* detectados em bovinos amostrados em Nguluzane

A Análise pelo BLASTn revelou que as sequências de nucleotídeos (OM365905, ON408396, ON408398 e ON408008) de *Anaplasma* spp. obtidas neste estudo compartilham identidade de

98.83-99.77% com uma sequência de nucleotídeo (MK680807) de *Anaplasma marginale*, e uma sequência de nucleotídeo (MF289480) de *Anaplasma centrale* obtidas do GenBank. As três primeiras sequências também compartilham identidade de 99.77% com uma sequência (KU585989) de *Anaplasma platys* também obtida do GenBank. A sequência de nucleotídeo (ON408397) amplificada neste estudo compartilha identidades de 98.09; 97.85; 97.85; 97.85; 97.61; 97.61; 97.61% respectivamente com as seguintes sequências de nucleotídeos (KU586172, MN266939, KU585990, KC189854, ON231804, OP788188 e MZ203398) obtidas do GenBank dos seguintes agentes, Candidatus *Anaplasma cinensis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma sp. Omatjenne*, Candidatus *Anaplasma shandongen*, *Anaplasma phagocytophilum* e Candidatus *Anaplasma cameli* respectivamente. Outra sequência de nucleotídeo (ON408401) obtida neste estudo compartilha identidades de 98.33% com as seguintes sequências obtidas do banco de dados (MH762079, MF289477, KU585990 e MZ477262) de Candidatus *Anaplasma cinensis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma marginale* e *Anaplasma phagocytophilum* e a mesma sequência também compartilha identidade de 98.09% com duas sequências (MT510533 e ON231804) obtidas do banco de dados dos seguintes agentes, Candidatus *Anaplasma cameli* e Candidatus *Anaplasma shandongen*. A sequência de nucleotídeo (ON408404) obtida neste estudo compartilha identidade de 98.57% com duas sequências de nucleotídeos (MT510526 e MZ488425) obtidas do banco de dados dos seguintes agentes, Candidatus *Anaplasma cameli* e *Anaplasma phagocytophilum*, e a mesma sequência também compartilha identidade de (99.05% e 98.81%) com duas sequências (KU586172 e MN266939) obtidas do banco de dados dos seguintes agentes, Candidatus *Anaplasma cinensis* e *Anaplasma platys*. A sequência de nucleotídeo (OM365909) obtida neste estudo compartilha identidade de 99.30% com duas sequências (MT510533 e MF289483) obtidas do banco de dados dos seguintes agentes, Candidatus *Anaplasma cameli* e *Anaplasma phagocytophilum*, e também compartilha identidade de 99.54% com três sequências de nucleotídeos (MN266939, MH762079 e KU585990) dos seguintes agentes, *Anaplasma platys*, Candidatus *Anaplasma cinensis* e *Anaplasma marginale*. Uma sequência de nucleotídeos (ON408402) obtida neste estudo compartilha identidade de 99.53% com uma sequência (MN401150) do banco de dados de *Anaplasma platys* e também compartilha identidade de 95,58% com uma sequência de nucleotídeo (MT337508) de *Anaplasma phagocytophilum* do GenBank.

4.3.2. Análise de sequências de *Anaplasma marginale* do gene *msp5* detectados em bovinos amostrados em Nguluzane

A Análise pelo BLASTn revelou que oito sequências de nucleotídeos de *Anaplasma marginale* (OQ363892, OQ363893, OQ363894, OQ363896, OQ363897, OQ363899, OQ363900 e OQ363902) obtidas neste estudo compartilham identidades de 99.35-99,56% com a sequência (LC467711) do Sir Lanka obtida do GenBank. Duas sequências de nucleotídeos de *Anaplasma marginale* (OQ363889 e OQ363891) amplificadas no presente estudo compartilham identidades de 99.77% e 100% com uma sequência cujo número de acesso no GenBank é (MK188882) da Tailândia. Outras duas sequências (OQ363895 e OQ363901) também obtidas neste estudo compartilham identidades de 99.74% e 99.77% com uma sequência cujo número de acesso no GenBank é (MK715440) da Índia. Também duas sequências (OQ363888 e OQ363898) obtidas neste estudo compartilham identidades de 99.55% e 99.78% com uma sequência cujo número de acesso no GenBank é (MK715439) da Índia, finalmente, uma sequência de nucleotídeo (OQ363890) compartilha identidade de 100% com uma sequência de nucleotídeo de *Anaplasma marginale* obtida do GenBank com o número de acesso (LC706301) da Índia.

4.3.3. Análise filogenética de sequências dos genes *16S rRNA* e *msp5* de *Anaplasma* spp. e *Anaplasma marginale* amplificadas em amostras de bovinos de Nguluzane

As sequências obtidas no presente estudo em conjunto com aquelas disponíveis no banco de dados, foram utilizadas para construção de duas árvores filogenéticas, separadamente: uma de *Anaplasma* spp. e outra de *Anaplasma marginale*. Os números nas árvores indicam valores de probabilidade para os pontos de ramificação que variam entre 43%-83% para *Anaplasma* spp. e 33%-75% para *Anaplasma marginale*.

4.3.3.1. Árvore filogenética de *Anaplasma* spp

Na árvore filogenética de *Anaplasma* spp. (figura 5) as sequências Moçambicanas distribuem-se ao longo da árvore posicionando-se em quatro grupo distintos. No primeiro grupo posicionam-se seis sequências, uma de *Anaplasma* sp. de Moçambique (OM365905), uma de *Anaplasma*

marginale do Paquistão, uma sequência de *Anaplasma ovis* dos Estados Unidos, uma sequência de *Anaplasma centrale* da África do Sul uma de *Anaplasma ovis* da China e finalmente uma sequência de *Anaplasma centrale* da China. No segundo grupo posicionam-se apenas duas sequências de nucleotídeos (ON408398 e ON408396) de *Anaplasma* sp. Moçambicanas enquanto no terceiro grupo de sequências estão posicionadas seis sequências sendo cinco Moçambicanas e uma de *Anaplasma marginale* da China. No quarto grupo de sequências de nucleotídeos posicionam-se três sequências de *Anaplasma phagocytophilum* uma da China, uma Turquia e outra de *Anaplasma* sp. de Moçambique. Sequências de *Ehrlichia chaffeensis* foram utilizadas como grupo externo.

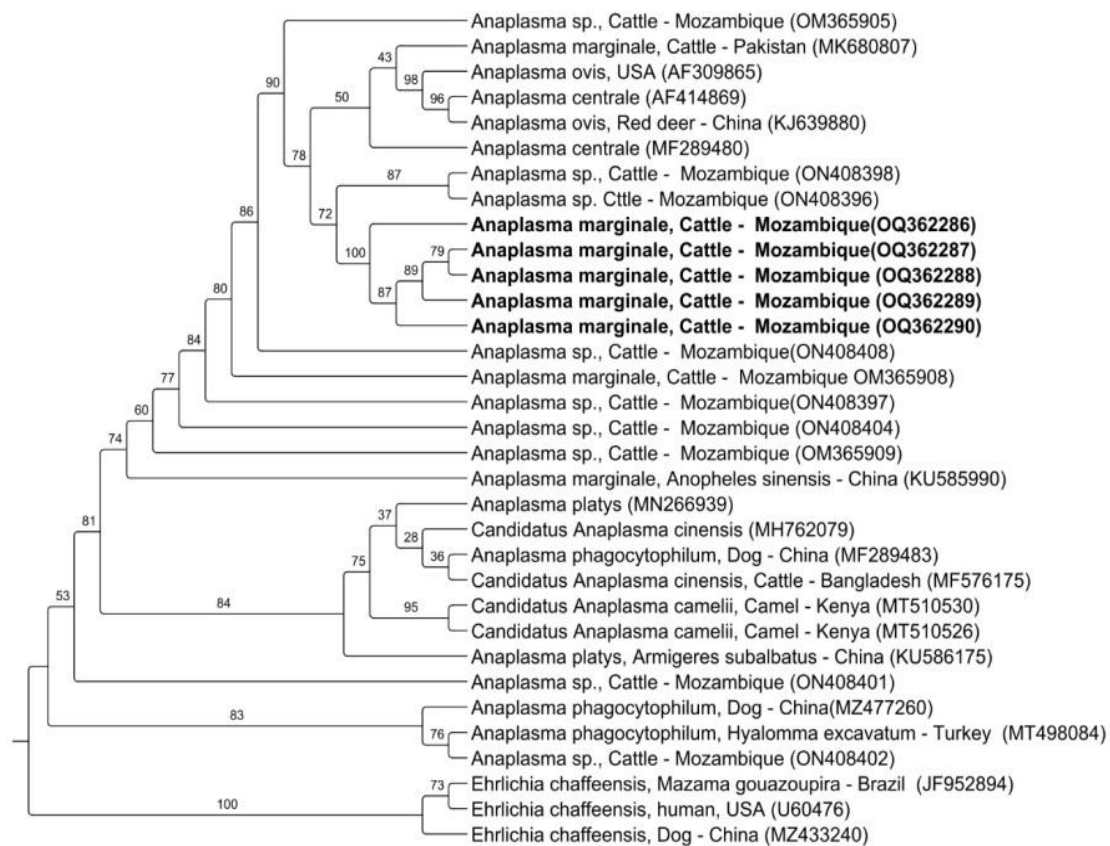


Figura 5: Análise filogenética das sequências de *Anaplasma* spp. detectadas em bovinos da província de Gaza, Moçambique, com base no gene *16S rRNA*- (alinhamento de 500 pb). A árvore foi construída utilizando o método Máxima Verossimilhança empregando o modelo evolutivo TIM3e+G4.

4.3.3.2. Árvore filogenética de *Anaplasma marginale*

Na Árvore filogenética as sequências de *Anaplasma marginale* Moçambicanas posicionam-se entre sequências de nucleotídeos da Índia, Tailândia e Egito, porém, há uma sequência de Moçambique (OQ363898), que se posiciona entre sequências do Egito, Sir Lanka e Benin. Sequências de *Anaplasma phagocytophilum* foram utilizadas como grupo externo.

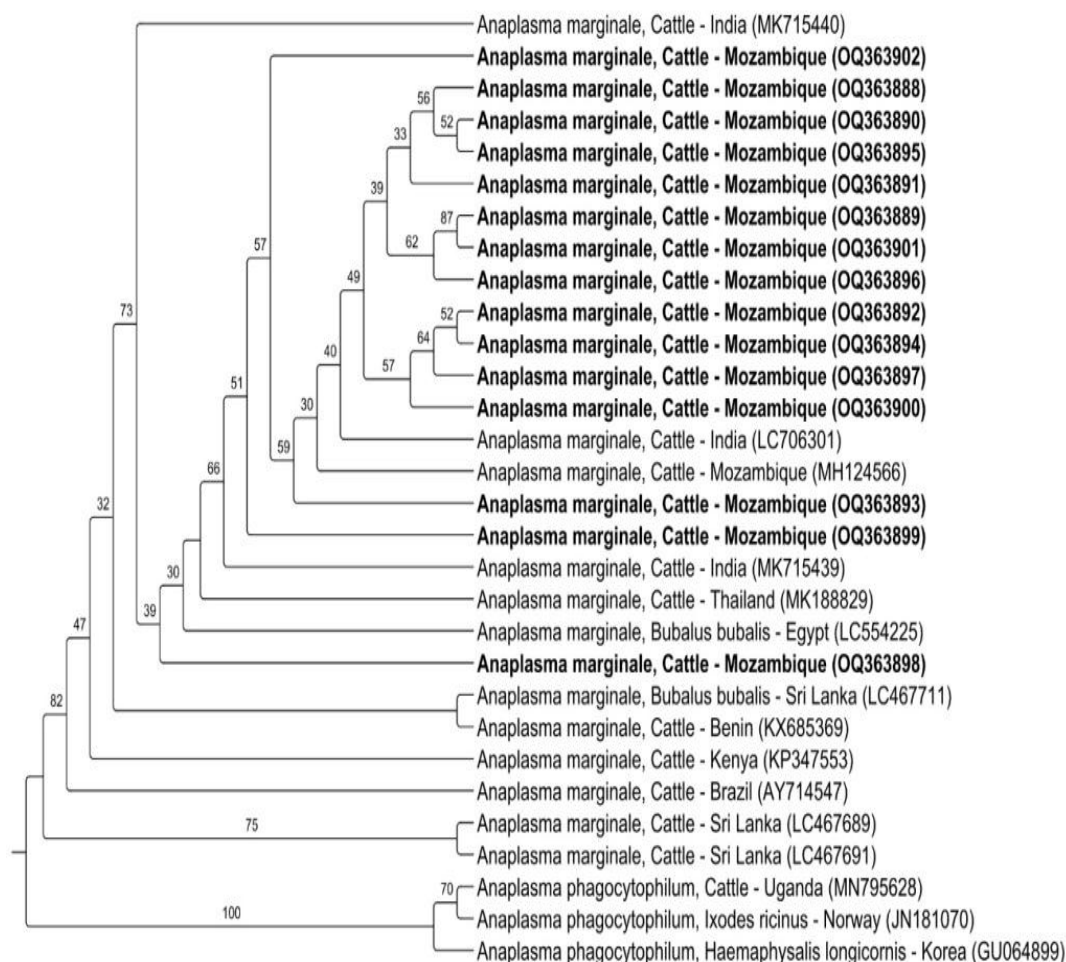


Figura 6: Análise filogenética das sequências de *Anaplasma marginale* detectadas em bovinos da província de Gaza, Moçambique, com base no gene *msp5-* (alinhamento de 500 pb). A árvore foi construída utilizando o método Máxima Verossimilhança empregando o modelo evolutivo HKY+F+G4.

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

No presente estudo, a ocorrência de *Anaplasma* spp. e *Anaplasma marginale* em bovinos da Unidade de Nguluzane, no Sul de Moçambique foi investigada por PCR. Os resultados do estudo demonstraram que esses ruminantes estão expostos em alta frequência a esses hemoparasitas. É a primeira evidência da ocorrência desses agentes na Unidade de Nguluzane Agro-pecuária Lda a ser estudada. Com base no BLAST foram identificadas *Anaplasma* spp. filogeneticamente associada a *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, *Anaplasma ovis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma* sp. *Omatjenne* Candidatus *Anaplasma cameli* Candidatus *Anaplasma cinensis*, e Candidatus *Anaplasma Shandongen* foram detectados em bovinos amostrados em Gaza, Moçambique. Por outro lado, utilizando metodologia semelhante, FERNANDES *et al.* (2019) não detectaram *Anaplasma* spp. filogeneticamente associada a *Anaplasma* sp. *Omatjenne* Candidatus *Anaplasma cameli*, Candidatus *Anaplasma cinensis* e Candidatus *Anaplasma Shandongen* em bovinos na província de Maputo. Por outro lado, utilizando metodologia semelhante, MACHADO *et al.* (2016) não detectaram *Anaplasma* spp. filogeneticamente associada a *A. ovis*, *Anaplasma* sp. *Omatjenne*, Candidatus *A. cameli*, Candidatus *A. Cinesis* e Candidatus *A. Shandongen* em búfalos africanos em Moçambique. Tais achados reforçam a relevância do emprego de diferentes métodos de detecção de patógenos, para melhor auxiliar na conclusão de um diagnóstico e na condução de levantamentos epidemiológicos.

Ao compararmos a taxa para *A. marginale* encontrada no presente estudo (92.38%) com a de outros estudos já anteriormente realizados em Moçambique, observa-se resultados semelhantes àquele encontrado (95.7%) por FERNANDES *et al.* (2017) em bovinos também na região Sul do país, para *A. marginale*. Anteriormente, MACHADO *et al.* (2016) encontraram 72,2% de positividade para *A. marginale* entre uma população de búfalos africanos oriundos da Reserva de Marromeu, em Moçambique, ELELU *et al.* (2016) encontraram 75,9% de positividade para *A. marginale* em bovinos na Nigéria e POTHMANN *et al.* (2016) relataram uma ocorrência de 89,7% para *A. marginale* entre bovinos amostrados em Madagascar. Tais achados enfatizam a necessidade da utilização de diferentes protocolos da PCR baseados em distintas regiões génicas a fim de explorar a diversidade de genótipos e espécies em uma dada amostra biológica.

Nos resultados analisados pelo Blast, mostram uma alta identidade de 90% de *Anaplasma phagocytophilum* (Anaplasmoose granulocítica humana) o que torna um perigo a Unidade e os pequenos produtores da região estudada. *Anaplasma phagocytophilum* é considerado um patógeno responsável por uma zoonose emergente nos Estados Unidos e Europa (KOCAN *et al.*, 2015). Todavia, existem relatos de transmissão deste agente para animais e humanos através da exposição à amostras de tecidos e sangue infectado (BAKKEN *et al.*, 1996; BATTILANI *et al.*, 2017). A *Anaplasma phagocytophilum* causa anaplasmoose granulocítica em equinos e seres humanos. Pacientes humanos infectados podem apresentar desde uma doença assintomática até um quadro grave (BAKKEN *et al.*, 2015). A Anaplasmoose granulocítica humana caracteriza-se por febre, dores de cabeça, náuseas, tosse, mal-estar, mialgia, e rigidez cervical. Diarreia e vômitos são menos comumente relatados. Em casos raros, alguns pacientes podem desenvolver síndrome de choque séptico ou tóxico, síndrome de desconforto respiratório agudo, ou infecções oportunistas por outros agentes, como vírus ou fungos (BAKKEN *et al.*, 2015; BATTILANI *et al.*, 2017).

Assim, os resultados do presente estudo demonstram grande potencial de transmissão na área estudada e apontam a importância de medidas de controle. Esses dados podem fornecer informações valiosas para os serviços nacionais da pecuária, bem como planejar futuras intervenções para a saúde animal. Mais estudos são necessários para monitorar os rebanhos e identificar outros factores que possam representar um risco epidemiológico na Unidade.

Futuros estudos em Moçambique são necessários para avaliar variações sazonais, áreas de ocorrência de carrças vectores deste agente entre ruminantes domésticos e selvagens. Ainda, a ocorrência do referido agente em outros potenciais reservatórios, tais como roedores, deve ser melhor investigada no país. Desta forma, destaca-se a importância da adoção de medidas preventivas quanto à anaplasmoose bovina em seu sentido mais amplo, considerando a ocorrência de espécies e genótipos encontrados no presente estudo. Neste sentido, o controle de vectores e acompanhamento veterinário dos rebanhos bovinos fazem-se necessários.

6. CONCLUSÃO

O estudo conclui que:

- Testes moleculares mostram uma alta exposição de bovinos à *Anaplasma* spp. e *Anaplasma marginale* na Unidade de Produção Nguluzane Agro-pecuária Lda. apesar da manada apresentar-se aparentemente saudável.
- A manada de bovinos de Nguluzane, apesar de apresentar-se aparentemente saudável, está infectado com *Anaplasma marginale*. A infecção por *Anaplasma marginale* é comum nas três categorias bovinas;
- No estudo foram detectadas *Anaplasma* spp. filogeneticamente relacionadas a *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, *Anaplasma ovis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma* sp. *Omatjenne*, Candidatus *Anaplasma cameli*, Candidatus *Anaplasma cinensis* e Candidatus *Anaplasma Shandongen*;
- *Anaplasma marginale* encontrada nas amostras deste estudo são geneticamente similares à *Anaplasma marginale* que ocorre nos países Asiáticos (Índia, Tailândia e Sri Lanka) de acordo com as sequências depositadas no banco de dados.

7. RECOMENDAÇÕES

Recomenda-se aos estudantes e aos investigadores:

- Estudos moleculares, com recurso a primer específicos para identificação de espécies de *Anaplasma* spp. reportadas filogeneticamente no presente estudo por forma a melhorar a percepção da sua diversidade;
- Estudos adicionais são necessários a fim de aprimorar os conhecimentos referentes a diferentes oligonucleotídeos iniciadores para espécies de *Anaplasma*.

A empresa recomenda-se:

- Dado que toda a manada está infectada por *Anaplasma* spp. com diferentes espécies e *Anaplasma marginale*, recomenda-se a realização de tratamentos com antibióticos de amplo espectro;
- Realização de despistes anuais de anaplasmose, sobretudo na época chuvosa onde a carga parasitária é elevada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, Amsterdam, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

AUBRY, P. GEALE, D.W. 2011. A review of bovine anaplasmosis. *Transbound. Emerg. Dis.* 58: 1-30.

ALFREDO, A. A.; JONSSON, N. N.; FINCH, T. M.; NEVES, L.; MOLLOY, J. B.; JORGENSEN, W. K. Serological survey of *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle in Tete Province, Mozambique. *Tropical Animal Health and Production*, Edinburgh, v. 37, n. 3, p. 121-131, 2005.

AKTAS, M. (2014) A Survey of Ixodid Ticks Species and Molecular Identification of Tick-Borne Pathogens. *Veterinary Parasitology*, 200, 3-4.

ARULKANTHAN, A.; BROWN, W. C.; MCGUIRE, T. C.; KNOWLES, D. P. Biased immunoglobulin G1 isotype responses induced in cattle with DNA expressing *msp1a* of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, Washington, v. 67, n. 7, p. 3481-3487, 1999.

BARBET, A. F.; ALLRED, D. R. The *msp1* beta multigenefamily of *Anaplasma marginale*: nucleotide sequence analysis of an expressed copy. *Infection and Immunity*, Washington, v. 59, n. 3, p. 971-996, 1991.

BAKKEN, J. S.; DUMLER, J. S. Human granulocytic anaplasmosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, Philadelphia, v. 29, n. 2, p. 341-55, 2015.

BAKKEN, J. S.; KRUEH, J. K.; LUND, T.; MALKOVITCH, D.; ASANOVICH, K.; DUMLER, J. S. Exposure to deer blood may be a cause of human granulocytic ehrlichiosis. *Clinical Infectious Diseases*, Chicago, v. 23, n. 1, p. 198, 1996.

BATTILANI, M.; DE ARCANGELI, S.; BALBONI, A.; DONDI, F. Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, Amsterdam, v. 49, p. 195-211, 2017.

BEKKER, C.P., DE VOS, S., TAOUFIK, A., SPARAGANO, O.A., JONGEJAN, F. Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridization. 2002. Vet. Microbiol. 89, 223-238.

BRADWAY, D. S.; TORIONI de ECHAIDE, S.; KNOWLES, D. P.; HENNAGER, S. G.; McELWAIN, T. F. Sensitivity and specificity of the complement fixation test for detection of cattle persistently infected with *Anaplasma marginale*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, Thousand Oaks, v. 13, n.1, p. 79-81, 2001.

BRAYTON, K. A.; KAPPMAYER, L. S.; HERNDON, D. R.; DARK, M. J.; TIBBALS, D. L.; PALMER, G. H.; MCGUIRE, T. C.; KNOWLES, D. P. Jr. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 102, n. 3, p. 844-849, 2005.

BENSON, D.A.; MIZRACHI, I.K.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; RAPP, B.A.; WHEELER, D.I. GenBank., Nucleic Acids Research Oxford, v. 30, n. 1, p. 17-20, 2002.

CASTRO, M. B.; NICHOLSON, W. L.; KRAMER, V. I.; CHILDS, J. E. Persistent infection in *Neotoma fuscipes* (Muridae: Sigmondontinae) with *Ehrlichia phagocytophila sensu lato*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 65, n. 4, p. 261-267, 2001.

CALDART, E. T.; MATA, H.; CANAL, C. W.; RAVAZZOLO, A.P. Análise filogenética: Conceitos básicos e suas utilizações como ferramentas para Virologia e epidemiologia molecular. P. 4, 2016.

COETZEE, J. F.; APLEY, M. D.; KOCAN, K. M.; RURANGIRWA, F. R.; VAN DONKERSGOED, J. Comparison of three oxytetracycline regimens for the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infections in beef cattle. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 127, n. 1, p. 61–73, 2005.

COETZEE, J. F.; SCHMIDT, P. L.; APLEY, M. D.; REINBOLD, J. B.; KOCAN, K. M. Comparison of the complement fixation test and competitive ELISA for serodiagnosis of *Anaplasma marginale* infection in experimentally infected steers. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v. 68, n. 8, p. 872-878, 2007.

CHEVENET, F.; BRUN, C.; BANULS, A. L.; JACQ, B.; CHRISTEN, R. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics*, v. 7, n. 10, p. 439, 2006.

DE MATOS, C. A. Species composition and geographic distribution of ticks infesting cattle, goats and dogs in Maputo province, Mozambique. Dissertation M.Sc. (Veterinary Science). Faculty of Veterinary Science, University of Pretoria. 2008. 130 p.

DIAS, J. A. T. S. Lista das carraças de Moçambique e respectivos hospedeiros. *Anais dos Serviços de Veterinária e Indústria Animal de Moçambique*, 3: 1960. 213-287 p.

DUGAT, T.; LAGRÉE, A. C.; MAILLARD, R.; BOULOUIS, H. J.; HADDAD, N. Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Lausanne, v.5: 61, p.1-18, 2015.

DUMLER, J. S. *Anaplasma* and Ehrlichia infection. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, Washington, v. 1063, p.361-373, 2005.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; STUART, C. R.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Reading, v.51, n.6, p.2145-2165, 2001.

DAHMANI, M., DAVOUST, B., BENTERKI, M.S., FENOLLAR, F., RAOULT, D. and MEDIANNIKOV, O. 2015. Development of a new PCR – Based Assay to detect *Anaplasmataceae* and the first report of *Anaplasma Phagocytophilum* and *Anaplasma Platys* in cattle from Algeria. *Comp. immun. Microbiol. and infect. Dis.* 39: 39 - 45.

DE LA FUENTE, J.; PASSOS, L. M. F.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; RIBEIRO, M. F. B.; FACURY-FILHO, E. J.; KOCAN, K. M. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 121, n. 3–4, p. 307-316, 2004.

DE LA FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; PRADO, T.; KOCAN, K. M. *Anaplasma marginale* msp1 alpha genotypes evolved under positive selection pressure but are not markers for geographic isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.41, n.4, p. 1609–1616, 2003.

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, v. 9, n. 8, p. 772-772, 2012.

ECHAIDE, S.T., KNOWLES, D.P., MCGUIRE, T.C., PALMER, G.H., SUAREZ, C.E., MCELWAIN, T.F. 1998. Detection of Cattle Naturally Infected with *Anaplasma marginale* in a Region of Endemicity by Nested PCR and a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5. *J Clin Microbiol*, Washington. 36, 777–782.

EMBRAPA. O programa BLAST: guia prático de utilização. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 2007.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred II. Error probabilities. *Genome Research*, New York, v. 8, n.3, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Research*, New York, v.8, n.3, p.175-185, 1998.

FABURAY, B.; MUNSTERMANN, S.; GEYSEN, D.; BELL-SAKYI, L.; CEESAY, A.; BODAAN, C.; JONGEJAN, F. Point seroprevalence survey of Ehrlichia ruminantium infection in small ruminants in the Gambia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12: 2005. 508-512 p.

FERNANDES, F. M. C. & MATIOLI. Noções de filogenética molecular. São Paulo. Depto. de Biologia, Instituto de Biociências, USP. v.63, n.1/2, p.37-38, jan./dez., 2001.

FERNANDES, S.J., MATOS, C.A., FRESCHI, C.R., SOUZA RAMOS, I.A., MACHADO, R.Z. and ANDRÉ, M.R. (2019): Diversity of Anaplasma Species in Cattle in Mozambique. *Ticks and Tick-borne Diseases* 10(3): 651–64.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, Lawrence, v.39, n.4, p.783-791, 1985.

FINE, A. B.; SWEENEY, J. D.; NIXON, C. P.; KNOLL, B. M. Transfusion-transmitted anaplasmosis from a leukoreduced platelet pool. *Transfusion*, Arlington, v. 56, n. 3, p.699-704, 2016.

GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 133, n. 3, p. 1–4, 2013.

GOMES, J.; SOARES, R.; SANTOS, M.; SANTOS-GOMES, G.; BOTELHO, A.; AMARO, A.; INÁCIO, J. Detection of Theileria and Babesia infections amongst asymptomatic cattle in Portugal. *Ticks Tick Dis.* 4, 2013. 148-151 p.

GOETHERT, H. K.; TELFORD III, S. R. Enzootic transmission of *Anaplasma bovis* in Nantucket cottontail rabbits. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 41, n. 8, p. 3744-3747, 2003.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*, New York, v.8, n.3, p. 195-202, 1998.

GUO, W. P.; TIAN, J. H.; LIN, X. D.; NI, X. B.; CHEN, X. P.; LIAO, Y.; YANG, S. Y.; DUMLER, J. S.; HOLMES, E. C.; ZHANG, Y. Z. Extensive genetic diversity of Rickettsiales bacteria in multiple mosquito species. *Scientific reports*, London, v. 6, n.38770, p. 1-11, 2016.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology*, v. 52, n. 5, p. 696-704, 2003.

GLEZ-PEÑA, D.; GÓMEZ-BLANCO, D.; REBOIRO-JATO, M.; DEZ-RIVEROLA, F.; POSADA, D. ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments. *Nucleic acids research*, v. 38, n. suppl_2, p. W14-W18, 2010.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, London, n.41, p.95-98, 1999.

HIGA, R. H. Entendendo e Interpretando os Parâmetros Utilizados por BLAST. *Instruções Técnicas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento / Embrapa*, 2001.

ISHMAEL, F. T.; STELLATO, C. Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, v.101, n. 4, p. 437-443, 2008.

JENSENIUS, M.; PAROLA, P.; RAOULT, D. Threats to international travellers posed by tick-borne diseases. *Travel. Med. Infect. Dis.* 2006. 4-13 p.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. Ticks and control methods introduction: ticks and tickborne diseases. *Revue scientifique et Technique, Office Internationales des Epizooties.* 13, 1994. 1201-1226 p.

JONSSON, N. N.; MATSCHOSS, A. L.; PEPPER, P.; GREEN, P. E.; ANSELL, J. Resistance of Holstein-Friesian cows to infestation by the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Veterinary Parasitology* 89 (4): 2000. 297-305 p

JONSSON, N. N; BOCK, R. E; JORGENSEN, W. K, Produtividade e efeitos na saúde de anaplasmose e babesiose em bovinos *Bos indicus* e seus cruzamentos, e os efeitos de diferentes intensidades de controlo de carraças na Austrália. *Parasitologia Veterinária* , v. 155, n. 1-2, pág. 1-9, 2008.

KIESER, S. T.; ERIKS, I. E; PALMER, G. H. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Infection and immunity, Washington*, v. 58, n.4, p. 1117-1119, 1990.

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

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; CABEZAS-CRUZ, A. The genus *Anaplasma*: new challenges after reclassification. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics), Paris*, v. 34, n. 2, p. 577-586, 2015.

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 Reviews, Washington*, v. 16, n. 4, p. 698-712. 2003.

KOCAN, K. M.; STILLER, D.; GOFF, W. L.; CLAYPOOL, P. L.; EDWARDS, W.; EWING, S. A.; MCGUIRE, T. C.; HAIR, J. A.; BARRON, S. J. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from parasitemic to susceptible cattle. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v. 53, n. 4, 499-507, 1992.

KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 27, n. 2–3, p. 95–125, 2006.

LI, H.; ZHENG, Y. C.; MA, L.; JIA, N.; JIANG, B. G.; JIANG, R. R.; HUO, Q. B.; WANG, Y. W.; LIU, H. B.; CHU, Y. L.; SONG, Y. D.; YAO, N. N.; SUN, T.; ZENG, F. Y.; DUMLER, J. S.; JIANG, J. F.; CAO, W. C. Human infection with a novel tick-borne *Anaplasma* species in China: A surveillance study. *The Lancet. Infectious Diseases*, New York, v. 15, n. 6, p. 663-670, 2015.

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

MATOS, C.A., GONÇALVES, L.R., DE SOUZA RAMOS, I.A., MENDES, N.S., ZANATTO, D.C.S., ANDRÉ, M.R. and MACHADO, R.Z.: Molecular Detection and Characterization of Ehrlichia Ruminantium from Cattle in Mozambique. *Acta Tropica* 191(January): 198– 203. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.01.007>. 2019.

MACHADO, R. Z.; TEIXEIRA, M. M. G.; RODRIGUES, A. C.; ANDRÉ, M. R.; GONÇALVES, L. R.; DA SILVA, J. B.; PEREIRA, C. L. Molecular diagnosis and genetic diversity of tick-borne Anaplasmatidae agents infecting the African buffalo *Syncerus caffer* from Marromeu Reserve in Mozambique. *Parasites & vectors*, London, v. 9: 454, 2016.

MASSUNG, R. F; SLATER, K. G. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 41, n. 2, p. 717-722, 2003.

MARTINS, T. M.; NEVES, L.; PEDRO, O. C.; FAFETINE, J. M.; DO ROSÁRIO, V. E.; DOMINGOS, A. Molecular detection of *Babesia* spp. and other haemoparasitic infections of cattle in Maputo Province, Mozambique. *Parasitology*, London, v.137, n.6, p. 939-946, 2010.

MARTINS, T. M.; PEDRO, O. C.; CALDEIRA, R. A.; do ROSÁRIO, V. E.; NEVES, L.; DOMINGOS, A. Detection of bovine babesiosis in Mozambique by a novel seminested hot-start PCR method. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 153, n. 3-4, p. 225-230, 2008.

MINISTÉRIO DA ADMINISTRAÇÃO ESTATAL (Ed.) (2005). Perfil do Distrito de Xai-Xai, Província de Gaza. Edição 2005.

MINISTÉRIO PARA A COORDENAÇÃO DA ACÇÃO AMBIENTAL. Perfil Ambiental e Mapeamento do uso actual da Terra nos Distritos de Gaza Moçambique 2012.

MIZRACHI, I. GenBank: the nucleotide sequence database. 2010.

NASCIMENTO, A. A. C.; ESPREAFICO, E. M.; LARSON, M. L. P.; MONESI, N.; ROSSI, N. M. M.; RODRIGUES, V. Tecnologia do DNA recombinante. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 1999. 85 p. Apostila.

NEI, M. KUMAR, S. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford Univ. Press, 2000.

OOSHIRO, M.; ZAKIMI, S.; MATSUKAWA, Y.; KATAGIRI, Y.; INOKUMA, H. Detection of *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* from cattle on Yonaguni Island, Okinawa, Japan. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 154, n. 3-4, p. 360-364, 2008.

PALOMAR, A. M.; PORTILLO, A.; SANTIBÁÑEZ, P.; MAZUELAS, D.; RONCERO, L.; GARCÍA-ÁLVAREZ, L.; SANTIBÁÑEZ, S.; GUTIÉRREZ, Ó.; OTEO, J. A. Detection of tick-borne *Anaplasma bovis*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma centrale* in Spain. *Medical and Veterinary Entomology*, Oxford, v. 29, n. 3, p. 349–353, 2015.

PALMER, G. H.; ABBOTT, J. R.; FRENCH, D. M.; MCELWAIN, T. F. Persistence of *Anaplasma ovis* infection and conservation of the *msp-2* and *msp-3* multigene families within the genus *Anaplasma*. *Infection and Immunity*, Washington, v. 66, n. 12, p. 6035-6039, 1998.

PARK, J., HAN, D.G., RYU, J.H. CHAE, J.B., CHAE, JS., YU, D.H., PARK, B.K., KIM, H.C. and CHO, K.S. 2018. Molecular Detection of *Anaplasma bovis* in Holstein cattle in the Republic of Korea *Acta Veterinaria Scandinavica* 60 (1): 1 – 5

PROSDOCIMI, F.; CERQUEIRA, G. C.; BINNECK, E.; SILVA, A. F.; REIS, A. N. dos; JUNQUEIRA, A. C.; SANTOS, A. C. F. dos; NBANI JÚNIOR, A.; WUST, C. I.; CAMARGO FILHO, F.; KESSEDJIAN, J. L.; PETRETSKI, J. H.; CAMARGO, L. P.; FERREIRA, R. de G. M.; LIMA, R. P.; PEREIRA, R. M.; JARDIM, S.; SAMPAIO, V. de S.; FLATSCHART, A. V. F. *Bioinformática: manual do usuário*. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 5, n. 29, nov.;dez.; 2002.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, A.S., SANTOS-SILVA, M.M., ALMEIDA, V.C, BACELLAR, F. & DUMLER, J.S. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in *Ixodes* ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira Island and Setubal District, main land Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 10(9), 1643-1648, 2004.

SANTOS, A.S., de BRUIN, A., VELOSO, A.R., MARQUES, C., PEREIRA DA FONSECA, I., DE SOUSA, R., SPRONG, H., SANTOS-SILVA, M.M. (2018). Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Candidatus Neoehrlichia* sp., *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp. in questing ticks from a recreational park, Portugal. *Ticks Tick Borne Dis*, 9(6): 1555-1564.

SASHIKA, M.; ABE, G.; MATSUMOTO, K.; INOKUMA, H. Molecular survey of *Anaplasma* and *Ehrlichia* infections of feral raccoons (*Procyon lotor*) in Hokkaido, Japan. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, Larchmont, v. 11, n. 4, p. 349-354, 2011.

SILAGHI, C.; SANTOS, A. S.; GOMES, J.; CHRISTOVA, I.; MATEI, I. A.; WALDER, G.; DOMINGOS, A.; BELL-SAKYI, L.; SPRONG, H.; VON LOEWENICH, F. D.; OTEO, J. A.; DE LA FUENTE, J.; DUMLER, J. S. Guidelines for the Direct Detection of *Anaplasma* spp. in Diagnosis and Epidemiological Studies. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, Larchmont, v. 17, n. 1, p.12-22, 2017.

SILVEIRA, J. A.; RABELO, E. M.; RIBEIRO, M. F. Molecular detection of tick-borne pathogens of the family Anaplasmataceae in Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*, Illiger, 1815). *Transboundary and emerging diseases*, Berlin, v. 59, n. 4, p. 353-60, 2012.

SIMUUNZA, M.; WEIRA, W.; COURCIERC, E.; TAITA, A.; SHIELS, B. Epidemiological analysis of tick-borne diseases in Zambia. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 175, n. 3-4, p. 331-342, 2011.

SINGH, H., Jyoti, Haque, M., Singh, N.K., Rath, S.S. 2012. Molecular detection of *Anaplasma marginale* infection in carrier cattle. *Ticks Tick Borne Dis.* 3, 55-8.

SOUZA, M. T. de. Técnicas básicas em biologia molecular. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2003b. 211 p.

SOUZA, J. F. Relações filogenéticas do grupo panarthropoda avaliadas através de sequências do gene rDNA 18s. 2001. 47f. Tese (Mestrado em Genética) - instituto de ciências biológicas departamento de biologia geral programa de pós graduação em genética , universidade federal de minas gerais, Belo Horizonte. 2011.

SREEKUMAR, C.; ANANDAN, S.; BALASUNDARAM, S.; RAJAVELU, G. Morphology and staining characteristics of *Ehrlichia bovis*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Oxford, v.19, n. 1, p. 79-83, 1996.

STRIK, N. I., ALLEMAN, A. R., BARBET, A. F., SORENSON, H. L., WAMSLEY, H. L., GASCHEN, F. P., LUCKSCHANDER, N., WONG, S., CHU, F., FOLEY, J. E., BJOERSDORFF, A., STUEN, S. and KNOWLES, D. P. 2007. Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* major surface protein 5 and the extent of its cross-reactivity with *A. marginale*. *Clin. Vaccine Immunol.* 14: 262-268.

STUEN, S.; GRANQUIST, E. G.; SILAGHI, C. *Anaplasma phagocytophilum*: a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Lausanne, v.3, n. 31, p. 1-33, 2013.

STOVER, B.C.; MÜLLER, K.F. TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC bioinformatics*, v. 11, n. 1, p. 7, 2010.

SHKAP, V.; MOLAD, T.; BRAYTON, K. A.; BROWN, W. C.; PALMER, G. H. Expression of major surface protein 2 variants with conserved T-cell epitopes in *Anaplasma centrale* vaccinates. *Infection and Immunity*, Washington, v. 70, n. 2, p. 642-648, 2002.

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

TEMBUE, A. A. M.; da SILVA, J. B.; da SILVA, F. J. M.; PIRES, M. S.; BALDANI, C. D.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; da FONSECA, A. H. Seroprevalence of IgG antibodies against *Anaplasma marginale* in cattle from South Mozambique. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 318-324, 2011.

TESHALE, S.; GEYSEN, D.; AMENI, G.; ASFAW, Y.; BERKVEN, D. Improved molecular detection of *Ehrlichia* and *Anaplasma* species applied to *Amblyomma* ticks collected from cattle and sheep in Ethiopia. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2015.

THEILER, A. Gall sickness of South Africa (anaplasmosis of cattle). *The Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, London, v.16, p. 98–115, 1910.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, London, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TRIFINOPOULOS, J.; NGUYEN, L. T.; VON HAESLER, A.; MINH, B. Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research*, London, v. 44, n. W1, p. W232-W235, 2016.

UETI, M. W.; KNOWLES, D. P.; DAVITT, C. M.; SCOLES, G. A.; BASZLER, T. V.; PALMER, G. H. Quantitative differences in salivary pathogen load during tick transmission underlie strain-specific variation in transmission efficiency of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, Washington, v. 77, n. 1, p. 70-75, 2009.

VILLAR, M.; LÓPEZ, V.; AYLLÓN, N.; CABEZAS-CRUZ, A.; LÓPEZ, J. A.; VÁZQUEZ, J.; ALBERDI, P.; De LA FUENTE, J. The intracellular bacterium *Anaplasma phagocytophilum* selectively manipulates the levels of vertebrate host proteins in the tick vector *Ixodes scapularis*. *Parasites & Vectors*, London, v. 9:467, p. 1-17, 2016.

VIDOTTO, M. C.; MCGUIRE, T. C.; McELWAIN, T. F.; PALMER, G. H.; KNOWLES, D. P. Jr. Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, Washington, v. 62, n. 7, p. 2940-2946, 1994.

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

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

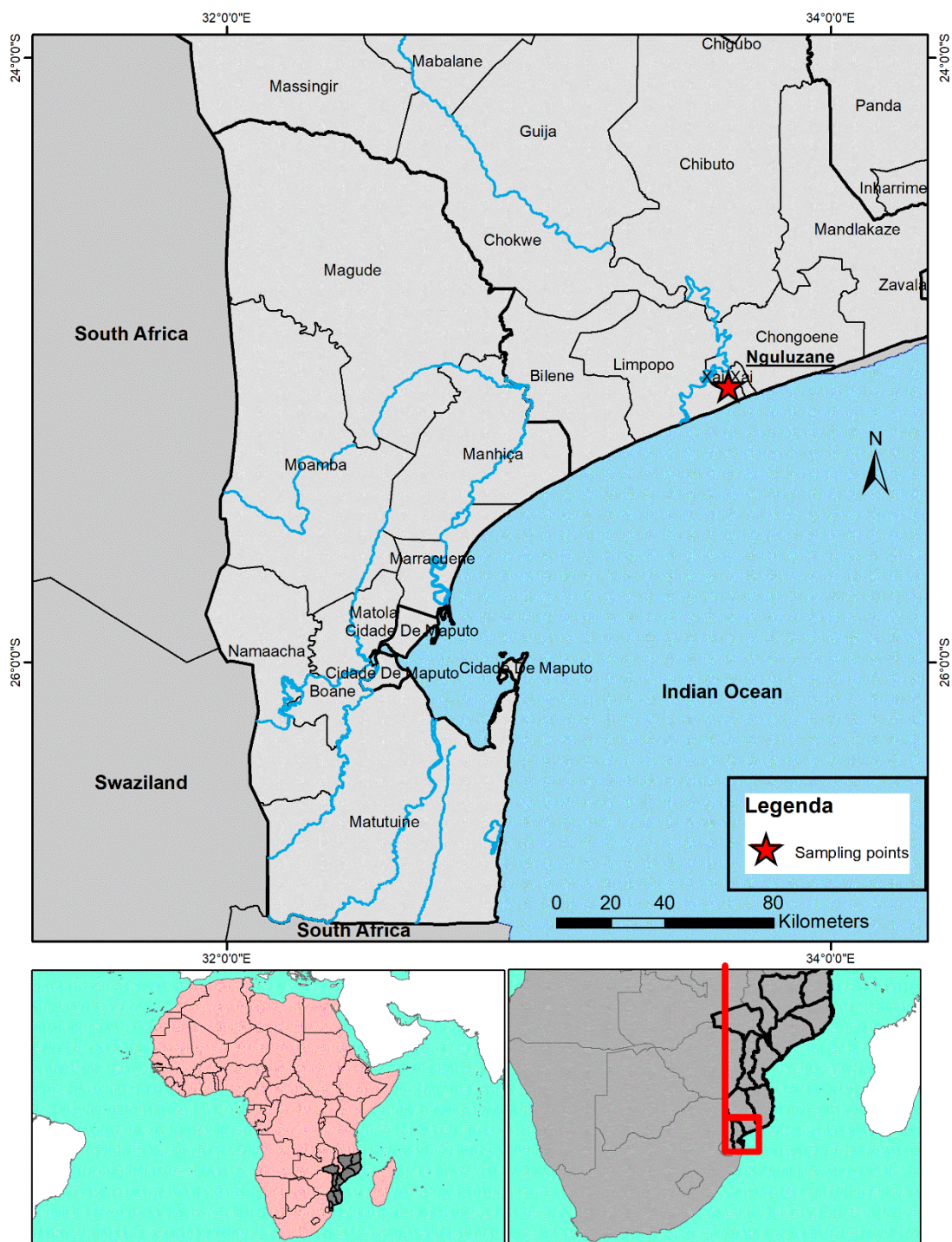
YANG, J.; LI, Y.; LIU, Z.; GUAN, G.; CHEN, Z.; LUO, J.; WANG, X.; YIN, H. Molecular evidence for *Anaplasma bovis* Infection in Wild Reeves' Muntjac (*Muntiacus reevesi*), Southwest China. Journal of Wildlife Diseases, Ames, v. 50, n.4, p. 982-985, 2014.

YBAÑEZ, A. P.; INOKUMA, H. *Anaplasma* species of veterinary importance in Japan. Veterinary World, Rajkot, v. 9, n. 11, p. 1190-1196, 2016

YBAÑEZ, A. P.; MATSUMOTO, K.; KISHIMOTO, T.; INOKUMA, H., Molecular analyses of a potentially novel *Anaplasma* species closely related to *Anaplasma phagocytophilum* detected in sika deer (*Cervus nippon yezoensis*) in Japan. Veterinary Microbiology, Amsterdam, v.157, n. 1-2, p. 232–236, 2012.

9. Anexos

Anexo I: Mapa de localização da área do estudo, indicando em vermelho o Distrito de Xai-Xai e destacando em negrito o ponto de amostragem na Unidade de Nguluzane.



Anexo II: Resultados do diagnóstico da PCR

| Número | Sexo | Categoria | Resultados da PCR Ehr spp | Resultados da PCR Msp5 |
|---------------|-------------|------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| 1-7174 | M | Vítelo | Positivo | Positivo |
| 2-7187 | M | Vítelo | Positivo | Positivo |
| 3-6443 | M | Vítelo | Positivo | Positivo |
| 4-7259 | M | Vítelo | Positivo | Positivo |
| 5-7216 | M | Vítelo | Positivo | Positivo |
| 6-7241 | M | Vítelo | Positivo | Positivo |
| 7-7405 | M | Vítelo | Positivo | Positivo |
| 8-7406 | M | Vítelo | Positivo | Positivo |
| 9-7350 | F | Vítela | Positivo | Positivo |
| 10-7358 | M | Vítelo | Positivo | Positivo |
| 11-7398 | F | Vítela | Positivo | Positivo |
| 12-7418 | M | Vítelo | Positivo | Negativo |
| 13-7419 | F | Vítela | Positivo | Positivo |
| 14-7404 | F | Vítela | Positivo | Positivo |
| 15-7499 | M | Vítelo | Positivo | Positivo |
| 16-7368 | F | Vítela | Positivo | Positivo |
| 17-7400 | M | Vítelo | Positivo | Positivo |
| 18-7483 | F | Vítela | Positivo | Positivo |
| 19-7420 | M | Vítelo | Positivo | Positivo |

| | | | | |
|---------|---|---------|-----------------|-----------------|
| 20-7481 | F | Vítela | Positivo | Positivo |
| 21-7505 | M | Vítelo | Positivo | Positivo |
| 22-7453 | F | Vítela | Positivo | Positivo |
| 23-7401 | M | Vítelo | Positivo | Positivo |
| 24-7349 | M | Vítelo | Positivo | Positivo |
| 25-7501 | F | Vítela | Positivo | Positivo |
| 26-7359 | F | Vítela | Positivo | Positivo |
| 27-7454 | M | Vítelo | Positivo | Positivo |
| 28-7482 | F | Vítela | Negativo | Negativo |
| 29-7367 | M | Vítelo | Positivo | Positivo |
| 30-7399 | F | Vítela | Positivo | Positivo |
| 31-7403 | F | Vítela | Negativo | Positivo |
| 32-7479 | F | Vítela | Positivo | Positivo |
| 33-7357 | M | Vítelo | Positivo | Positivo |
| 34-7498 | F | Vítela | Positivo | Positivo |
| 35-7503 | M | Vítelo | Positivo | Positivo |
| 36-5794 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 37-6232 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 38-6016 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 39-5983 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 40-6225 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 41-6208 | M | Novilho | Positivo | Positivo |

| | | | | |
|---------|---|---------|----------|-----------------|
| 42-6077 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 43-6229 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 44-6212 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 45-5935 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 46-6143 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 47-6226 | M | Novilho | Positivo | Negativo |
| 48-6164 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 49-6218 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 50-6221 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 51-5798 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 52-6110 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 53-6032 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 54-5965 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 55-5777 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 56-6136 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 57-6216 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 58-6237 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 59-5992 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 60-5850 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 61-6104 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 62-6140 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 63-6165 | M | Novilho | Positivo | Positivo |

| | | | | |
|---------|---|---------|-----------------|-----------------|
| 64-5977 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 65-5877 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 66-5929 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 67-6121 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 68-5957 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 69-6011 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 70-6013 | M | Novilho | Positivo | Positivo |
| 71-2542 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 72-3031 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 73-3632 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 74-5014 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 75-4849 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 76-5242 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 77-4495 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 78-4607 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 79-1173 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 80-2204 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 81-4403 | F | Vaca | Negativo | Positivo |
| 82-4963 | F | Vaca | Positivo | Negativo |
| 83-1323 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 84-4358 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 85-4160 | F | Vaca | Positivo | Positivo |

| | | | | |
|-------------------------|---|------|-----------------|-----------------|
| 86-4626 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 87-1731 | F | Vaca | Positivo | Negativo |
| 88-2661 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 89-4580 | F | Vaca | Positivo | Negativo |
| 90-4494 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 91-4246 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 92-2015 | F | Vaca | Positivo | Negativo |
| 93-4304 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 94-3339 | F | Vaca | Negativo | Positivo |
| 95-4042 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 96-1736 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 97-1571 | F | Vaca | Negativo | Positivo |
| 98-3969 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 99-1636 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 100-4452 | F | Vaca | Positivo | Negativo |
| 101-4611 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 102-2709 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 103-4440 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 104-4971 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| 105-190 | F | Vaca | Positivo | Positivo |
| Totais positivos | | | 100 | 97 |
| Totais negativos | | | 5 | 8 |

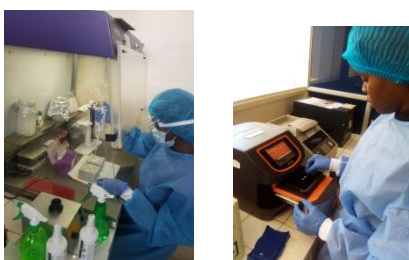
Anexo III: Demonstração dos passos desde a colheita até ao processamento das amostras no laboratório



a) Colheita das amostras pela veia coccígea



b) Extracção do DNA



c) Realização da PCR e Amplificação do DNA



d) Electroforese em gel de Agarose



e) Purificação do DNA