



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ALINE GIROTTO

**DETECÇÃO MOLECULAR DOS HEMOPARASITAS**  
*Anaplasma marginale, Anaplasma centrale* E '*Candidatus*  
*Mycoplasma haemobos*' EM BOVINOS LEITEIROS DE  
ASSENTAMENTOS RURAIS LOCALIZADOS NO ESTADO  
DO PARANÁ

---

Londrina  
2012

ALINE GIROTTO

**DETECÇÃO MOLECULAR DOS HEMOPARASITAS**  
*Anaplasma marginale, Anaplasma centrale* E '*Candidatus*  
**Mycoplasma haemobos'** EM BOVINOS LEITEIROS DE  
**ASSENTAMENTOS RURAIS LOCALIZADOS NO ESTADO**  
**DO PARANÁ**

Tese apresentada para a obtenção do título de  
Doutor em Ciência Animal (área de concentração  
em Sanidade Animal) da Universidade Estadual de  
Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Odilon Vidotto  
Co-orientador: Alexander Welter Biondo

Londrina  
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca  
Central da Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

G527d Girotto, Aline.

Detecção molecular dos hemoparasitas *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, e *Candidatus Mycoplasma haemobos* em bovinos leiteiros de assentamentos rurais localizados no estado do Paraná / Aline Girotto. – Londrina, 2012.  
59 f.: il.

Orientador:

Co-orientador: Alexander Welter Biondo.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Bovino de leite – Doenças – Paraná. 2. Bovino de leite – Infecções. 3. Bovino de leite – Parasita. 4. Anaplasmose. 5. Micoplasma. I. Vodotto, Odilon. II. Biondo, Alexander Welter. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDU 619:636.2(816.2)

ALINE GIROTTO

**DETECÇÃO MOLECULAR DOS HEMOPARASITAS *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale* E ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ EM BOVINOS LEITEIROS DE ASSENTAMENTOS RURAIS LOCALIZADOS NO ESTADO DO PARANÁ**

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (área de concentração em Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. orientador Dr. Odilon Vidotto  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. co-orientador Dr. Amauri A. Alfieri  
UEL – Londrina – PR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roberta Lemos Freire  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas Boas  
UEL – Londrina – PR

---

Jovem Pesquisador Arlei Marcili  
USP – São Paulo – SP

Londrina, 28 de setembro de 2012.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Protozoologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina e no Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob orientação do Prof. Dr. Odilon Vidotto.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa relacionados abaixo:

- 1. CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.**
- 2. FAP/PR – Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná.**

# DEDICATÓRIA

---

Aos meus pais, alicerces da minha vida...  
companheiros de todas as horas...

# AGRADECIMENTOS

---

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Odilon Vidotto, por acreditar em mim sem inicialmente me conhecer e pelo exemplo profissional e otimismo em todas as etapas deste trabalho.

Aos professores João Luis Garcia e Laurival Antônio Vilas Boas, pela colaboração na realização do experimento e aos membros da banca pelas importantes sugestões e contribuições.

A minha família, pela motivação e carinho sempre.

Aos meus pais Ademir e Elci, pelo constante amor, incentivo e por me ensinarem o valor do estudo e do trabalho.

Ao João Fabio, meu amor, pela compreensão, dedicação, cumplicidade e companheirismo.

A minha fiel estagiária e grande amiga Amanda Zangirolamo, pela boa vontade, disposição e carinho, auxiliando com eficiência a realização deste trabalho.

Ao meu amigo Alexei pela paciência e pela ajuda prestada nesses anos todos, principalmente nessa fase final.

Aos amigos Arnaldo, Gislaine, Adriana, Lígia, Aline, Elizabete (Bete), Lucianne e Jenifer, pela força e pela vibração em relação a esta jornada.

Aos colegas dos Laboratórios de Protozoologia, Parasitologia, Helminologia e Patologia Clínica Veterinária da UEL, pelo apoio.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna pela disponibilização do laboratório para realização de parte do experimento e aos colegas e amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias da USP- SP, pela amizade e apoio.

Aos professores, funcionários e colegas de Curso, pela atenção e carinho que sempre me dedicaram.

Aos proprietários entrevistados, pela concessão de informações valiosas para a realização deste estudo.

Aos 433 bovinos, que participaram involuntariamente da realização deste trabalho, cedendo seu valioso sangue e carrapatos, na maioria das vezes sem reclamar.

Aos meus alunos da União de Ensino do Sudoeste do Paraná - Unisep, por compreenderem a minha ausência em alguns momentos.

A todos que, com boa intenção, colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

"A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta de que nada arrisca, e que, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade".

Carlos Drummond de Andrade

## RESUMO

---

GIROTTI, Aline. **Detecção molecular de hemoparasitas *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale* e ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ em bovinos leiteiros de assentamentos rurais localizados no Estado do Paraná.** 2012. 59f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

### RESUMO

As hemoparasitoses são doenças prevalentes no rebanho bovino brasileiro e causam grandes prejuízos econômicos para a pecuária do país. A identificação de bovinos persistentemente infectados em áreas endêmicas é importante para monitorar a movimentação de animais infectados para áreas livres da doença, bem como para prevenir a infecção de animais suscetíveis. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo a detecção molecular dos hemoparasitas *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale* e *Mycoplasma* spp. em bovinos leiteiros de assentamentos rurais de quatro municípios da região Norte do Estado do Paraná. Foram coletadas 433 amostras de sangue de bovinos assintomáticos, entre Julho de 2009 e Junho de 2010, as quais foram submetidas ao hemograma e ao esfregaço sanguíneo. Posteriormente, realizou-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para amplificação de um fragmento do gene 16S rDNA dos agentes pesquisados. Do total de amostras, 89,14% (386/433) foram positivas para *A. marginale*, 33,94% (147/433) para *A. centrale*, 60,96% (264/433) para ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ (‘*C. M. haemobos*’), 31,17% (135/433) estavam coinfectadas com *A. marginale* e *A. centrale*, 9,23% (40/433) coinfectadas com *A. marginale* e ‘*C. M. haemobos*’, 1,84% (8/433) coinfectadas com *A. centrale* e ‘*C. M. haemobos*’ e 20,55% (89/433) apresentavam os três micro-organismos. Nenhum animal apresentava alterações clínicas no momento da coleta de sangue. Nos hemogramas, constatou-se que alguns bovinos encontravam-se anêmicos, porém, não foi observada associação entre positividade na PCR e anemia. Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que os agentes pesquisados encontram-se disseminados entre os animais da área amostrada. A detecção de bovinos persistentemente infectados é importante para a determinação da infecção e do estado imunológico dos animais. Neste estudo, a PCR mostrou ser uma ferramenta poderosa para a detecção e a diferenciação de *A. marginale* e *A. centrale* que parasitam os bovinos. Além disso, este é o primeiro relato do hemoplasma ‘*C. M. haemobos*’ em bovinos no Brasil, sendo observada uma ocorrência significativa deste hemoparasita em bovinos leiteiros da região Norte do Paraná.

**Palavras-chave:** Bovídeos. Anaplasrose. Micoplasma hemotrópico. DNA. Filograma.

## ABSTRACT

---

GIROTTI, Aline. **Molecular detection of hemoparasites *Anaplasma marginale* , *Anaplasma centrale* and 'Candidatus Mycoplasma haemobos' in dairy cattle of rural settlements located in the Paraná State.** 2012. 59f. Thesis (Doctorate in Science Animal) – State University of Londrina, Londrina, 2012.

### ABSTRACT

The hemoparasitoses are diseases quite prevalent in the Brazilian herd and cause great economic losses to the livestock in the country. The identification of persistently infected cattle in endemic areas is important to monitor the movement of infected animals for disease-free areas, as well as to prevent infection of susceptible animals. In this context, this study aimed the molecular detection of hemoparasites *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale* and *Mycoplasma* spp. in dairy cattle of rural settlements of four counties in the north of the Parana State. Were collected 433 blood samples from asymptomatic cattle, between July 2009 and June 2010, which were submitted to the CBC and blood smear. Later, there was the Polymerase Chain Reaction (PCR) to amplify a fragment of the 16S rDNA of the agents surveyed. Of the total sample, 89.14% (386/433) were positive for *A. marginale*, 34% (147/433) for *A. centrale*, 61% (264/433) for 'Candidatus Mycoplasma. haemobos' ('C. M. haemobos'), 31.2% (135/433) samples were coinfecting with *A. marginale* e *A. centrale*, 9.2% (40/433) coinfecting with *A. marginale*, and 'C. M. haemobos', 1.8% (8/433) co-infected with *A. centrale* and 'C. M. haemobos' and 20.5% (89/433) had three agents. No animal had, at the time of blood collection, clinical changes. The hemogram showed that some animal were anemic, however, there was no correlation between positive tests and anemia. The results of this study indicate that the agents surveyed are widespread among animals of the area sampled. The detection of persistently infected cattle is important for the determination of infection and the immune status of the animals. In this study, the PCR has proven to be a powerful tool for detection and differentiation between of *A. marginale* and *A. centrale* species parasitizing cattle. Moreover, this is the first report of hemoplasma 'C. M. haemobos' in cattle in Brazil, and was observed a significant occurrence of this hemoparasite in dairy cattle from northern Paraná.

**Key words:** Bovine. Anaplasmosis. Hemotropic mycoplasma. DNA. Philogram.

## LISTA DE TABELAS

---

### ARTIGO 2

- Tabela 1** – Oligonucleotides sequences used in this study for amplification of 16S rDNA gene fragment of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* ..... 39
- Tabela 2** – Positivity to *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* evaluated by PCR in 433 blood samples collected between July 2009 and June 2010 of cattle from Paraná State localities, Brazil..... 39

## LISTA DE FIGURAS

---

**Figura 1** - *Mycoplasma* sp na superfície do eritrócito .....17

### ARTIGO 1

**Figure 1** – Phylogram based on partial sequence analysis of 16S rRNA genes showing the clustering of the three cattle hemotropic isolates among the hemotropic *Mycoplasma* group. The tree shown was generated applying the Neighbor-Joining and UPGMA method (MEGA 4.1 software; Tamura et al., 2007). *Mycoplasma pneumoniae* was used as outgroup. The numbers at the nodes indicate bootstrap values in percent (1000 bootstraps). Numbers in brackets are GenBank accession numbers ..... 29

### ARTIGO 2

**Figure 1** – Map showing the localities of the collected samples in Parana State, Brazil..... 39

# SUMÁRIO

---

<b>1 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
1.1 – ANAPLASMOSE BOVINA .....	13
1.2 – MICOPLASMOSE BOVINA .....	16
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	20
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	26
2.1 – OBJETIVO GERAL .....	26
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
<b>3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	27
3.1 – <i>Short Communication-</i> <b>Molecular Detection and Occurrence of 'Candidatusmycoplasma Haemobos' in Dairy Cattle of Southern Brazil</b> .....	27
<b>Abstract</b> .....	27
<b>Resumo</b> .....	27
<b>References</b> .....	30
3.2 – <b>Molecular Diagnostic and Prevalence of the <i>Anaplasma marginale</i> and <i>Anaplasma Centrale</i> in Unvaccinated Carrier Cattle from Southern Brazil</b> .....	31
<b>Abstract</b> .....	31
<b>Introduction</b> .....	31
<b>Material and Methods</b> .....	32
<b>Results and Discussion</b> .....	33
<b>Conclusion</b> .....	35
<b>References</b> .....	36
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	40

<b>APÊNDICE</b> .....	41
APÊNCICE A – Detecção específica por PCR de um fragmento de 155pb do gene 16S rRNA de <i>A. marginale</i> , visualizado em gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Os retângulos brancos indicam o padrão de tamanho molecular (PM), controles positivo (C+), controle negativo (C-) e amostras de nº46 a 82 .....	42
APÊNCICE B – Detecção específica por PCR de um fragmento de 122pb do gene 16S rRNA de <i>A. centrale</i> , visualizado em gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. O retângulo branco indica o padrão de tamanho molecular (PM), controles positivo (C+), controle negativo (C-) e amostras de nº1 a 19 .....	43
APÊNCICE C – Detecção específica por PCR de um fragmento de 500pb do gene 16S rRNA de ‘C. M. haemobos’, visualizado em gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Os retângulos brancos indicam o padrão de tamanho molecular (PM), controles positivo (C+), controle negativo (C-) e amostras de nº86 a 120 .....	44
APÊNCICE D – Tabela de resultados da detecção por PCR de <i>A. marginale</i> , <i>A. centrale</i> e ‘C. M. haemobos’ nas 433 amostras de sangue bovino testadas.....	45
 <b>ANEXO</b> .....	 56
ANEXO A – Protocolo de PCR para amplificação de um fragmento de 155pb do gene 16S rRNA de <i>A. marginale</i> .....	57
ANEXO B – Protocolo de PCR para amplificação de um fragmento de 122pb do gene 16S rRNA de <i>A. centrale</i> .....	58
ANEXO C – Protocolo de PCR para amplificação de um fragmento de 500pb do gene 16S rRNA de ‘C. M. haemobos’ .....	59

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

---

### 1.1 – ANAPLASMOSE BOVINA

A anaplasmose bovina é causada por bactérias intraeritrocíticas obrigatórias, pertencentes ao reino **Bacteria**, **filo Proteobacteria**, **classe Alphaproteobacteria**, ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae e gênero *Anaplasma*. As principais espécies envolvidas são *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910) e *Anaplasma centrale* (THEILER, 1911). Estas duas riquetsias apresentam semelhança antigênica acentuada, porém, *A. centrale* é considerada atualmente uma subespécie de baixa patogenicidade para bovinos (KOCAN et al., 2003; DUMLER et al., 2001) e tem sido utilizada na forma viva para a vacinação de rotina de bovinos no Oriente Médio, Oceania, África e América do Sul, uma vez que a imunidade protetora cruzada e duradoura ao *A. marginale* pode ser adquirida após a infecção com *A. centrale* (VIDOTTO et al., 1998; SHKAP et al., 2008; MOLAD et al., 2006).

Devido à forma de utilização na vacina, por se tratar de organismos vivos, *A. centrale* está circulante entre os animais e, ocasionalmente, pode causar doença (CARELLI et al., 2008). A epidemiologia por métodos moleculares desta riquetsia é pouco estudada e algumas cepas têm sido reconhecidas com base na caracterização molecular (KOCAN et al., 2003). Em contraste, várias linhagens geográficas de *A. marginale* foram relatadas e apresentam diferentes características biológicas e genéticas (KANO et al., 2002). *A. marginale* juntamente com *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* formam um complexo de doenças hemolíticas, denominado Tristeza Parasitária Bovina que é responsável por prejuízos consideráveis na pecuária bovina mundial, principalmente devido à alta morbidade e mortalidade em bovinos suscetíveis, afetando o desempenho dos animais e limitando a produção (GRISI et al., 2002). As perdas econômicas associadas a esta doença estão relacionadas à redução do peso corporal, atraso no crescimento, aumento na duração do ciclo estral, abortos, baixa fertilidade em touros, gastos com mão-de-obra e com os tratamentos e manejos especiais realizados (CORREA et al., 2004; BARROS et al., 2005).

Uma vez inoculadas nos bovinos, as formas infectantes, conhecidas como corpúsculos iniciais, aderem à parede das hemácias, que são as únicas células parasitadas no hospedeiro vertebrado, penetram no seu interior através da invaginação e englobamento pela membrana da célula parasitada e iniciam a sua multiplicação por fissão binária, dando origem a um corpo de inclusão composto por quatro a oito corpúsculos iniciais, que são as unidades

infectantes. Tais corpúsculos, localizados perifericamente no caso de *A. marginale* e centralmente no caso de *A. centrale*, se deslocam em direção à periferia da hemácia até se fundirem com a membrana celular. A presença do parasita provoca alterações na membrana e na densidade citoplasmática da célula hospedeira e induz a formação de poros na membrana, através dos quais os corpúsculos deixam o eritrócito sem rompê-lo e invadem outras células vermelhas, continuando o ciclo (GIARDINA et al., 1983).

Nos carrapatos, os complexos eventos do desenvolvimento de *A. marginale* e *A. centrale* em seu interior são coordenados com o ciclo de alimentação do vetor (KOCAN et al., 2004). Durante o repasto sanguíneo são ingeridos eritrócitos infectados, que são a fonte de infecção para as células intestinais, onde ocorre o desenvolvimento do parasita e, posteriormente a disseminação para os outros tecidos. Dentro das células intestinais, as riquetsias se desenvolvem em vacúolos formados pela invaginação da membrana celular das células dos vetores. Inicialmente é possível observar a forma reticulada (vegetativa), que se divide por fissão binária, formando grandes colônias que podem conter centenas de organismos. A forma vegetativa evolui para corpos densos e se torna infectante, sendo capaz de sobreviver por um curto período de tempo no meio extracelular. Ao se disseminar pelo organismo do vetor e invadir as glândulas salivares, a riquetsia é transmitida aos hospedeiros vertebrados durante a alimentação do carrapato (KOCAN et al., 2010).

A enfermidade se manifesta após um período de incubação de 20 a 40 dias e na fase aguda da doença 10 a 90% dos eritrócitos podem estar parasitados. Os animais acometidos apresentam quadros de anemia e icterícia, resultantes da fagocitose maciça dos eritrócitos infectados pelo sistema reticuloendotelial, perdem peso, ficam letárgicos, e com o agravamento do quadro podem chegar ao óbito (DE LA FUENTE et al., 2001; KOCAN et al., 2003).

Bovinos de todas as idades podem ser infectados com *A. marginale*, porém, nos animais adultos com mais de dois anos, a doença é aguda e muitas vezes fatal. Bezerros com menos de seis meses, em função dos anticorpos colostrais, raramente apresentam a doença, Animais entre seis meses e um ano costumam desenvolver a doença de forma rápida. Animais entre um e dois anos de idade sofrem a forma aguda da doença, mas raramente fatal (KOCAN et al., 2003). Animais que sofrem a forma subclínica da doença ou animais recuperados de um quadro agudo de infecção por *A. marginale* tornam-se portadores e podem ser reservatórios da riquetsia por até sete anos (KOCAN et al., 2010).

Considerando que o tempo de vida médio de uma célula vermelha de sangue bovino é de 160 dias, para manter a infecção persistente, novos eritrócitos precisam

ser continuamente reinfectedos. Essa reinfecção acontece em função da evasão da resposta imune seguida pela replicação e surgimento de variantes antigênicas (proteínas de superfície da membrana - MSPs) de *A. marginale* que não são reconhecidas pelos anticorpos presentes nos animais infectados. Bovinos persistentemente infectados ou portadores têm imunidade duradoura e são resistentes à doença clínica ou ao desafio com cepas homólogas e parcialmente protegidos contra o desafio com cepas heterólogas (PALMER, 2000).

A anaplasmose apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo de forma endêmica em regiões tropicais e subtropicais da América Central e do Sul, além do Caribe, com exceção das áreas de deserto e de altitudes elevadas como os Andes (AUBRY et al., 2011). Nos Estados Unidos a doença é enzoótica nos estados do sudeste, oeste e ao longo da costa do Atlântico. A riquetsia *A. marginale* já foi relatada em países do leste europeu (KOCAN et al., 2003), Itália (CRINGOLI et al., 2002), Portugal (CAEIRO, 1999), Argentina (GUGLIELMONE et al., 1995), Bolívia (MAS et al., 2000), nos países asiáticos (LIU et al., 2005; SINGH et al., 2012), africanos (THEILER, 1910; THEILER, 1911) e no Oriente Médio (NOAMAN et al., 2010). No Brasil, devido às altas taxas de soroprevalência da anaplasmose, a maior parte do país pode ser considerada como área de estabilidade enzoótica (DALAGNOL et al., 1995; MADRUGA et al., 2000; MARANA et al., 2009).

A transmissão do *A. marginale* para bovinos ocorre biologicamente por carrapatos, mecanicamente por dípteros hematófagos, por fômites contaminadas com sangue e pela via transplacentária (SILVA, 2007; KOCAN et al., 2010). Entre as espécies de carrapatos mencionados como vetores da anaplasmose, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) tem sido apontado como o principal transmissor de *A. marginale* (AGUIRRE et al., 1994; KOCAN et al., 2001). A transmissão por esse vetor pode ocorrer de forma transtadial, quando a infecção acontece em um estágio e a transmissão no estágio seguinte ou de forma intraestadial, onde o carrapato adulto, durante o mesmo estágio, se infecta em um animal e transmite para outro. Os carrapatos machos desempenham importante papel na disseminação do agente, pois atuam como reservatórios e transmitem o patógeno repetidamente (KOCAN et al., 2001; KESLER et al., 2006). Embora já tenha sido relatada, a transmissão transovariana em carrapatos ainda é motivo de discussão (SHIMADA et al., 2004). Na América do Sul a distribuição da riquetsia está diretamente associada à distribuição do vetor, que se encontra disperso nas diferentes regiões do globo terrestre localizadas entre os paralelos 32° Norte e 32° Sul, classificadas de acordo com a situação epidemiológica em áreas livres da doença, áreas de instabilidade enzoótica e áreas de estabilidade enzoótica (FARIAS, 1995). Em áreas da América do

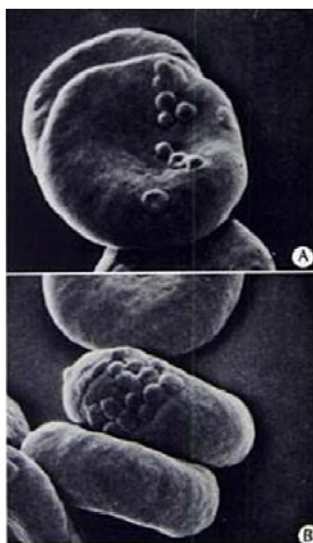
Sul, Central e África, onde não existe a presença de carrapatos, a forma mecânica é considerada a principal forma de transmissão, pois a riquetsia mantém a sua viabilidade na peças bucais dos vetores por até duas horas após a retirada do aparelho bucal de um animal e introdução em outro, possibilitando assim a transmissão (POTGIETER, 2004).

O diagnóstico da anaplasmoze bovina rotineiramente é realizado com base nos sinais clínicos, anatomopatológicos e na visualização dos corpúsculos de inclusão do parasita no interior das hemácias em extensões sanguíneas coradas por Giemsa (VIDOTTO; MARANA, 2001; CARELLI et al., 2007). Os esfregaços sanguíneos, apesar de simples e rápidos são eficientes apenas durante a fase aguda da infecção, pois a parasitemia, nos casos de infecção subclínica ou crônica e em animais portadores, permanece abaixo do limiar de detecção da microscopia óptica (GALE et al., 1996). Além disso, através da microscopia não é possível fazer a distinção entre *A. marginale* e *A. centrale* e estruturas como corpos de Heinz, Howell-Jolly ou artefatos de coloração, muitas vezes observadas em esfregaços sanguíneos corados por Giemsa, podem ser confundidas com o parasita. Vários métodos sorológicos para a detecção de anticorpos como teste de aglutinação em látex, teste de hemaglutinação, prova de fixação de complemento, imunofluorescência indireta e teste imunoenzimático (ELISA) vem sendo empregados extensivamente em estudos epidemiológicos (SOUZA et al., 2000; VIDOTTO; MARANA, 2001; BARROS et al., 2005). Porém, os avanços no campo da biologia molecular tornaram possível o uso de técnicas de amplificação específica do ácido desoxiribonucléico (DNA) dos agentes causais da doença. O elevado grau de sensibilidade e especificidade da reação em cadeia da polimerase (PCR) tornou possível a identificação dos agentes patogênicos, mesmo em animais assintomáticos (LEW et al., 2003; LIU et al., 2005; MOLAD et al., 2006; CARELLI et al., 2008). Essa metodologia molecular tem contribuído significativamente para a realização de estudos mais avançados sobre a epidemiologia da doença, permitindo a adoção de medidas profiláticas e estratégias de controle mais eficazes (VIDOTTO; MARANA, 2001).

## 1.2 – MICOPLASMOSE BOVINA

Micoplasmas hemotrópicos, também conhecidos como hemoplasmas, são pequenas bactérias pleomórficas não cultiváveis, sem parede celular, que podem causar anemia em várias espécies de mamíferos. São encontrados individualizados ou em cadeias em depressões leves na superfície dos eritrócitos e apresentam-se na forma esférica, discóide ou em anéis (SMITH et al., 1990; MESSICK, 2004) (Figura 1).

**Figura 1** – *Mycoplasma* sp na superfície do eritrócito.



**Fonte:** Livro Essentials of Veterinary Hematology.

Originalmente conhecidos como *Haemobartonella* e *Eperythrozoon*, da ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, estes organismos foram reclassificados como membros da classe Mollicutes, família Mycoplasmataceae, gênero *Mycoplasma*, com base em sequências de do gene 16S rRNA e semelhanças morfológicas (NEIMARK et al., 2001).

A infecção por hemoplasmas ganhou crescente importância em saúde pública desde a descoberta do seu potencial zoonótico (DOS SANTOS et al., 2008; YUAN et al., 2009). No entanto, o conhecimento sobre a epidemiologia e outros aspectos, como por exemplo, o ciclo de vida, o metabolismo, a transmissão desses organismos e a associação com outras doenças é incompleto. Este fato, em grande parte, está associado à impossibilidade de cultivo “in vitro” dos hemoplasmas, o que é limitante para as pesquisas.

Em bovinos, duas espécies distintas foram identificadas, *Mycoplasma wenyonii* (anteriormente, *Eperythrozoon wenyonii*) (NISHIZAWA et al., 2010) e uma espécie denominada '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' (sinônimo, '*Candidatus M. haemobovis*') (TAGAWA et al., 2008). Identificado pela primeira vez em 1934 em um bezerro esplenectomizado (ADLER; ELLENBOGEN, 1934), *M. wenyonii* exibe distribuição geográfica ampla (MESSICK, 2004), enquanto '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' foi relatado apenas no Japão (TAGAWA et al., 2008), China (SU et al., 2010), Suíça (MELI et al., 2010), Alemanha (HOELZLE et al., 2011); Hungria (HORNOK et al., 2011) e, recentemente, no Brasil (GIROTTI et al., 2012).

Tipicamente, as infecções por estes organismos são latentes produzindo

parasitemia de baixo grau e anemia moderada (NEIMARK et al., 2001). Ocasionalmente, bovinos infectados morrem ou apresentam sinais clínicos que incluem anemia, febre transitória, linfadenopatia, anorexia, edema de membros posteriores, edema escrotal, edema de tetos, infertilidade, perda de peso e redução na produção de leite. Na maioria dos casos, no entanto, a infecção permanece subclínica (MESSICK, 2004; SMITH et al., 1990).

Animais acometidos pela hemoplasmose podem apresentar hipoglicemia profunda, devido ao consumo da glicose pelo parasita ser superior à capacidade gliconeogênica do animal (BURKHARD et al., 2004). Embora alguns trabalhos relatem a ocorrência da doença associada aos sinais clínicos citados anteriormente, alguns autores não encontraram associação entre animais positivos nos testes diagnósticos e o desenvolvimento de sinais clínicos. Desta forma, a importância da infecção por '*C. M. haemobos*' e *M. wenyonii* ainda não está bem elucidada (TAGAWA et al., 2008, MELI et al., 2010, NISHIZAWA et al., 2010).

Pouco se sabe sobre as formas de transmissão dos micoplasmas hemotrópicos, porém, há evidências de que moscas, piolhos, pulgas e mosquitos podem atuar como vetores mecânicos (PRULLAGE et al., 1993; HOFFMANN-LEHMANN et al., 2004; WOODS et al., 2005), enquanto os carrapatos atuam como vetores biológicos (NEIMARK; KOCAN, 1997). Além disso, a via transplacentária também está sendo pesquisada (LAPIN et al., 2006; HORNOK et al., 2011).

A abordagem tradicional para o diagnóstico da infecção era realizada com base na observação dos agentes patogênicos na superfície dos eritrócitos através de exame microscópico de extensões sanguíneas coradas com Giemsa ou laranja de acridina. No entanto, a sensibilidade e a especificidade destes métodos são baixas, pois os resultados falso-positivos são evidentes, uma vez que artefatos de corante, corpúsculos de Howell-Jolly e até mesmo corpúsculos iniciais de *A. marginale* e *A. centrale* podem ser confundidos com o micro-organismo (KEMMING et al., 2004).

A introdução de técnicas moleculares, como a PCR e a PCR em tempo real permitiu a detecção e identificação mais eficiente destes organismos (SYKES et al., 2007; MESSICK, 2004). Investigações sobre a prevalência e fatores de risco da infecção por hemoplasma em cães e gatos utilizando métodos moleculares tem obtido êxito e apontam o local do domicílio, sexo, idade, raça, estado imunitário e co-infecção com outros agentes patogênicos como fatores importantes envolvidos no desenvolvimento da doença (NOVACCO et al., 2010; MACIEIRA et al., 2008; WILLI et al., 2006).

Embora esses métodos moleculares também sejam aplicados aos micro-

organismos encontrados nos bovinos (MELI et al., 2010; NISHIZAWA et al., 2010; TAGAWA et al., 2008), existem poucos relatos sobre investigação epidemiológica dos fatores de risco de infecções por hemoplasmas nesta espécie. Por outro lado, estudos sobre a prevalência dos hemoplasma bovinos são crescentes e relatam a descoberta da presença de 'C. M. haemobos' em diferentes países. No Japão, 23 (21,7%) de 106 bovinos saudáveis foram hemoplasmas positivos na PCR. Destes animais, 60,8% e 30,4% estavam parasitados por *M. wenyonii* e 'C. M. haemobos', respectivamente e 8,6% estava co-infectado (TAGAWA et al., 2010). Em 2008, o mesmo grupo de pesquisadores encontrou em uma população bovina composta por 78 animais, atendida em um hospital veterinário japonês, 21,8% de animais infectados por *M. wenyonii*, 16,7% por 'C. M. haemobos' e 5,1% co-infectados (TAGAWA et al., 2008).

Na Alenhanha, durante um surto da doença, foram detectados como positivos para 'C. M. haemobos', 50% (10/20) dos animais (HOELZLE et al., 2010). Na China, estavam infectados pelo mesmo agente, 41,7%(5/12) dos bovinos de corte, 14,3% (6/42) das vacas de leite e 32% (8/25) dos bubalinos avaliados (SU et al., 2010). Na Suíça, Meli et al. (2010) encontraram prevalências para hemoplasmas de 61,4% (35/57) em bovinos doentes, 72,1% (44/61) em bovinos assintomáticos e 91,8% (146/159) em bovinos provenientes de um rebanho com surto de anaplasnose e sugerem que a co-infecção com outros agentes, principalmente *A. marginale*, pode aumentar a patogenicidade e o significado clínico das hemoplasmoses bovinas. A esse respeito, Hornok e colaboradores (2010), levantaram a possibilidade do sinergismo patogênico entre os diferentes gêneros. Infecções simultâneas com até cinco agentes infecciosos, incluindo *M. wenyonii*, já foram relatadas em bovinos suíços (HOFFMANN-LEHMANN et al., 2004).

No Brasil, o primeiro estudo realizado em 433 amostras de sangue de bovinos assintomáticos para a detecção de hemoplasmas, relata a prevalência de 60,9% de animais positivos para 'C. M. haemobos' (GIROTTI et al., 2012), 9,2% co-infectados com *Anaplasma marginale*, 1,8% co-infectados com *Anaplasma centrale* e 20,5% com os três agentes (dados não publicados). Segundo Messick (2004), as infecções persistentes por hemoplasmas podem contribuir para a progressão de doenças retrovirais, neoplásicas ou imunomediadas. Desta forma, para que a doença nos rebanhos possa ser monitorada e a prevalência conhecida, estudos envolvendo os fatores de risco da infecção, bem como as vias de transmissão da hemoplasnose bovina devem ser realizados.

## REFERÊNCIAS

- ADLER, S.; ELLENBOGEN, V. A note on two new blood parasites of cattle, eperythrozoon and bartonella. *Journal of Comparative Pathology*, v. 47, p. 219-221, 1934.
- AGUIRRE, D. H.; GAIDO, A. B.; VINABAL, A. E.; DE ECHAIDE, S. T.; GUGLIELMONE, A. A. Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different levels of rickettsaemia. *Parasite*, v. 1, p. 405-407, 1994.
- AUBRY, P.; GEALE, D. W. A review of bovine anaplasmosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 58, n.1, p.1-30, 2011.
- BARROS, S. L.; MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; MENK, C. F.; ALMEIDA, M. A. O.; MELO, E. P. S.; KESSLER, R. H. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 6, p. 613-617, 2005.
- BURKHARD, M. J.; GARRY, F. Artfactual hypoglycemia associated with hemotrophic mycoplasma infection in a lamb. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 33, p. 244-248, 2004.
- CAEIRO, V. General review of tick species present in Portugal. *Parasitologia.*, s. 1, v. 41, p. 11-15, 1999.
- CARELLI, G.; DECARO, N.; LORUSSO, A.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; MARI, V. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. *Veterinary Microbiology*, v. 124, p. 107-114, 2007.
- CARELLI, G.; DECARO, N.; LORUSSO, E. First report of bovine anaplasmosis caused by *Anaplasma centrale* in Europe. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases*, v. 1149, p. 107-110, 2008.
- CORREA, W. M.; CORREA, C. N.; GOTTSCHALK, A. F. Bovine abortion associated with *Anaplasma marginale*. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, v. 42, p. 227-228, 2004.
- CRINGOLI, G.; OTRANTO, D.; TESTINI, G.; BUONO, V.; DI GIULIO, G.; TRAVERSA, D.; LIA, R.; RINALDI, L.; VENEZIANO, V.; PUCCINI, V. Epidemiology of bovine tick-borne diseases in southern Italy. *Veterinary Research*, v. 33, p. 421-428, 2002.
- DALAGNOL, C. A.; MARTINS, E.; MADRUGA, C. R. Prevalência de anticorpos contra *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* em bovinos de corte na região de clima Cfb. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 4, n. 2, p.220, 1995.
- DE LA FUENTE, J. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. *International Journal of Parasitology*, v. 31, p. 145-153, 2001.

DOS SANTOS, A. P.; DOS SANTOS, R. P.; BIONDO, A. W.; DORA, J. M.; GOLDANI, L. Z.; DE OLIVEIRA, S. T.; DE SÁ GUIMARÃES, A. M.; TIMENETSKY, J.; DE MORAIS, H. A.; GONZÁLEZ, F. H.; MESSICK, J. B. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, p. 1922-1924, 2008.

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

FARIAS, N. A. R. Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina. *Guaíba*, Porto Alegre: Agropecuária, 1995. 80p.

GALE, K. R.; DIMMOCK, C. M.; GARTSIDE, M.; LEATCH, G. *Anaplasma marginale*: detection of carrier cattle by PCR. *International Journal Parasitology*, v. 26, p. 1103–1109, 1996.

GIARDINA, S.; BRETANA, A.; MARQUEZ, Q. Ultrastructural aspects of intraerythrocytic development of a Venezuelan strain of *Anaplasma marginale*. *Tropenmed Parasitology*, v.34, p. 7-10, 1983.

GIROTTI, A.; ZANGIRÓLAMO, A. F.; BOGADO, A. L.; SOUZA, A. S.; SILVA, G. C.; GARCIA, J. L.; VILAS BOAS, L. A.; BIONDO, A. W.; VIDOTTO, O. Molecular detection and occurrence of 'Candidatus Mycoplasma haemobos' in dairy cattle of Southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 21, n. 3, p. 342-344, 2012.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; BORJA, G. E. M.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária*, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

GUGLIEMONE, A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary Parasitology*, v. 57, p. 109-119, 1995.

HOELZLE, K.; WINKLER, M.; KRAMER, M. M.; WITTENBRINK, M. M.; DIECKMANN, S. M.; HOELZLE, L. E. Detection of *Candidatus Mycoplasma haemobos* in cattle with anaemia. *Veterinary Journal*, v. 187, p. 408-410, 2011.

HOFFMANN-LEHMANN, R.; MELI, M. L.; DREHER, U. M.; GONCZI, E.; DEPLAZES, P.; BRAUN, U.; ENGELS, M.; SCHUPBACH, J.; THOMA, R.; GRIOT, C.; STARK, K. D. C.; WILLI, B.; SCHMIDT, J.; KOCAN, K. M.; LUTZ, H. Concurrent infection with vector-borne pathogens associated with fatal hemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 3775–3780, 2004.

HORNOK, S.; MICSUTKA, A.; MELI, M. L.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Molecular investigation of transplacental and vector-borne transmission of bovine haemoplasmas. *Veterinary Microbiology*, v. 152, p. 411-414, 2011.

KANO, F. S.; VIDOTTO, O.; PACHECO, R. C.; VIDOTTO, M. C. Antigenic characterization of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 87, p. 131-138, 2002.

KEMMING, G.; MESSICK, J. B.; ENDERS, G.; BOROS, M.; LORENZ, B.; MUENZING, S.; KISCH-WEDEL, H.; MUELLER, W.; HAHMANN-MUELLER, A.; MESSMER, K.; THEIN, E. *Mycoplasma haemocanis*: underestimated widespread, Kennel-related Disease? *Comparative Medicine*, v.54, n.4, p. 284-289, 2004.

KOCAN, K. M.; FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; COETZEE, J. F.; EWING, S. A. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*, v. 129, p. 285– 300, 2004.

KOCAN, K. M. Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of *Anaplasma marginale*. *International Journal Parasitology*, v. 31, p. 1705–1714, 2001.

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

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

LAPPIN, M. R.; GRIFFIN, B.; BRUNT, J.; RILEY, A.; BURNEY, D.; HAWLEY, J.; BREWER, M. M.; JENSEN, W. A. Prevalence of *Bartonella species*, *haemoplasma species*, *Ehrlichia species*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Neorickettsia risticii* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. *Journal Feline Medicine*, v. 8, p. 85–90, 2006.

LEW, A. E.; GALE, K. R.; MINCHIN, C. M. et al. Phylogenetic analysis of the erythrocytic *Anaplasma* species based on 16S rDNA and GroEL (HSP60) sequences of *A. marginale*, *A. centrale*, and *A. ovis* and the specific detection of *A. centrale* vaccine strain. *Veterinary Microbiology*, v. 92, p. 145–160, 2003.

LIU, Z.; LUO, J.; BAI, Q.; MA, M.; GUAN, G.; YIN, H. Amplification of 16S rRNA genes of *Anaplasma* species in China for phylogenetic analysis. *Veterinary Microbiology*, v. 107, p. 145–148, 2005.

LIU, Z.; LUO, J.; BAI, Q.; MA, M.; GUAN, G.; YIN, H. Amplification of 16S rRNA genes of *Anaplasma* species in China for phylogenetic analysis. *Veterinary Microbiology*, v. 107, p. 145–148, 2005.

MADRUGA, C. R.; MARQUES, A. P. C.; LEAL, C. R. B.; CARVALHO, C. M. E.; ARAÚJO, F. R.; KESSLER, R. H. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against *Anaplasma marginale*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. n. 20, v. 3, p. 109-112, 2000.

- MACIEIRA, D. B.; DE MENEZES, R. C.; DAMICO, C. B.; ALMOSNY, N. R.; MCLANE, H. L.; DAGGY, J. K.; MESSICK, J. B. Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and/or feline leukemia virus in Rio de Janeiro-Brazil. *Journal Feline Medicine*, v.10, p. 120-129, 2008.
- MARANA, E. R. M.; DIAS, J. A.; FREIRE, R. L.; VICENTINI, J. C.; VIDOTTO, M. C.; VIDOTTO, O. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in cattle from Center-South Region of Paraná State, Brazil by a competitive ELISA test with recombinant MSP5-PR1 protein. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 18, n. 1, p.20-26, 2009.
- MAS, J. J. C.; WIDDOWSON, M. A.; CUÉLLAR, A. M.; RIBERA, H.; WALKER, A. R. Risk of babesiosis and anaplasmosis in different ecological zones of Santa Cruz department, Bolivia. *Veterinary Parasitology*, v. 93, p. 29-38, 2000.
- MELI, M. L.; WILLI, B.; DREHER, U. M.; CATTORI, V.; KNUBBEN-SCHWEIZER, G.; NUSS, K.; BRAUN, U.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Identification, molecular characterization, and occurrence of two bovine hemoplasma species in Swiss cattle and development of real-time TaqMan quantitative PCR assays for diagnosis of bovine hemoplasma infections. *Journal Clinical Microbiology*, v. 48, p. 3563-3568, 2010.
- MESSICK, J. B. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 33, p. 2-13, 2004.
- MOLAD, T.; MAZUZ, M. L.; FLEIDEROVITZ, L.; FISH, L.; SAVITSKY, I.; KRIGEL, Y.; LEIBOVITZ, B. Molecular and serological detection of *A. central* and *A. marginale* infected cattle grazing within an endemic area. *Veterinary Microbiology*, v. 113, p. 55-62, 2006.
- NEIMARK, H.; KOCAN, K. M. The cell wall-less rickettsia *Eperythrozoon wenyonii* is a Mycoplasma. *FEMS Microbiology Letters*, v. 156, p. 287-291, 1997.
- NEIMARK, H.; JOHANSSON, K. E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J. G. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus Mycoplasma haemofelis' 'Candidatus Mycoplasma haemomuris' 'Candidatus Mycoplasma haemosuis' and 'Candidatus Mycoplasma wenyonii'. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*, v. 50, p. 891-899, 2001.
- NISHIZAWA, I.; SATO, M.; FUJIHARA, M.; SATO, S.; HARASAWA, R. Differential detection of hemotropic *Mycoplasma* species in cattle by melting curve analysis of PCR products. *Journal Veterinary Medicine Science*, v. 72, p. 77-79, 2010.
- NOAMAN, V.; SHAYAN, P. A new PCR-RFLP method for detection of *Anaplasma marginale* based on 16S rRNA. *Veterinary Research Communication*, v.34, n. 1, p. 43-50, 2010.
- NOVACCO, M.; MELI, M. L.; GENTILINI, F.; MARSILIO, F.; CECI, C.; PENNISI, M. G.; LOMBARDO, G.; LLORET, A.; SANTOS, L.; CARRAPIÇO, T.; WILLI, B.; WOLF, G.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. *Veterinary Microbiology*, v. 142, p. 276-284, 2010.

- PALMER, G. H.; BROWN, W. C.; RURANGIRWA, F. R. Antigenic variation in the persistence and transmission of the Ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Microbes and Infections*, v.2, p.167-176, 2000.
- POTGIETER, F. T.; STOLTSZ, W. H. Bovine anaplasmosis. In: COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. (Ed.). *Infectious Diseases of Livestock*, Oxford University Press, Southern Africa, Cape Town, ed. 3, p. 594–616, 2004.
- PRULLAGE, J. B.; WILLIAMS, R. E.; GAAFAR, S. M. On the transmissibility of *Eperythrozoon suis* by *Stomoxys calcitrans* and *Aedes aegypti*. *Veterinary Parasitology*, v. 50, p. 125–135, 1993.
- RIBEIRO, M. F. B.; PATARROYO, J. H.; SANTOS, J. L.; FARIAS, J. E. Epidemiologia da anaplasmoze bovina no estado de Minas Gerais. I. Prevalência de anticorpos aglutinantes e fluorescentes na Zona da Mata. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, n. 36, p. 425-432, 1984.
- SHIMADA, M. K.; YAMAMURA, M. H.; KAWASAKI, P. M.; TAMEKUNI, K.; IGARASHI, M.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C. Detection of *Anaplasma marginale* DNA in Larvae of *Boophilus microplus* Ticks by Polymerase Chain Reaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1026, p. 95–102, 2004.
- SHKAP, V.; LEIBOVITZCH, B.; KRIGEL, Y.; MOLAD, T.; FISH, L.; MAZUZ, M.; FLEIDEROVITCH, L.; SAVITSKY, I. Concomitant infection of cattle with the vaccine strain *Anaplasma marginale* ss central and field strains of *A. marginale*. *Veterinary Microbiology*, v. 130, p. 277–284, 2008.
- SILVA, R. A.; CORRÊA, F. N.; BOTTEON, R. C. C. M.; BOTTEON, P. T. L. Infecção natural por hemoparasitos em bezerros submetidos à quimio-profilaxia aos 30 dias de idade. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 16, n. 3, p. 163-165 2007.
- SINGH, H.; JYOTI; HAQUE, M.; SINGH, N. K.; RATH, S. S. Molecular detection of *Anaplasma marginale* infection in carrier cattle. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 3, p. 55-58, 2012.
- SMITH, J. A.; THRALL, M. A.; SMITH, J. L.; SALMAN, M. D.; CHING, S. V.; COLLINS, J. K. *Eperythrozoon wenyonii* infection in dairy cattle. *Journal American Veterinary Medicine Association*, v. 196, p. 1244-1250, 1990.
- SOUZA, J. C. P.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; SCOFIELD, A.; FONSECA, A. H. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 20, p. 97-101, 2000.
- SU, Q. L.; SONG, H. Q.; LIN, R. Q.; YUAN, Z. G.; YANG, J. F.; ZHAO, G. H.; HUANG, W. Y.; ZHU, X. Q. The detection of “*Candidatus Mycoplasma haemobos*” in cattle and buffalo in China. *Tropical Animal Health Production*, v. 42, p. 1805-1808, 2010.

SYKES, J. E.; DRAZENOVICH, N. L.; BALL, L. M.; LEUTENEGGER, C. M. Use of conventional and real-time polymerase chain reaction to determine the epidemiology of hemoplasma infections in anemic and nonanemic cats. *Journal Veterinary International Medical*, v. 21, p. 685-693, 2007.

TAGAWA, M.; MATSUMOTO, K.; INOKUMA, H. Molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and 'Candidatus Mycoplasma haemobos' in cattle in Hokkaido, Japan. *Veterinary Microbiology*, v. 132, p. 177-180, 2008.

THEILER, A. Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. 1st Report of the Director of Veterinary Research, *Department of Agriculture of the Union South Africa*, p. 7-46, 1911.

THEILER, A. Gall sickness of South Africa (anaplasmosis of cattle). *The Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, v. 23, p. 98-115, 1910.

VIDOTTO, O.; BARBOSA, C. S.; ANDRADE, G. M.; MACHADO, R. Z.; DA ROCHA, M. A.; SILVA, S. S. Evaluation of a Frozen Trivalent Attenuated Vaccine against Babesiosis and Anaplasmosis in Brazil. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 49, p. 420-423, 1998.

VIDOTTO, O.; MARANA, E. R. M. Diagnóstico em anaplasnose bovina. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.31, n.2, p.361-368, 2001.

WILLI, B., BORETTI, F. S., BAUMGARTNER, C., TASKER, S., WENGER, B., CATTORI, V., MELI, M. L., REUSCH, C. E., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, p. 961-969, 2006.

WILLI, B.; BORETTI, F. S.; BAUMGARTNER, C.; TASKER, S.; WENGER, B.; CATTORI, V.; MELI, M. L.; REUSCH, C. E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, p. 961-969, 2006.

WOODS, J. E.; BREWER, M. M.; HAWLEY, J. R.; WISNEWSKI, N.; LAPPIN, M. R. Evaluation of experimental transmission of 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. *American Journal Veterinary Research*, v. 66, p. 1008-1012, 2005.

YUAN, C. L.; YANG, Z. B.; YAO, C. B.; YANG, Z. B.; ZHU, J. G.; CUI, L.; YU, F.; ZHU, N. Y.; YANG, X. W.; HUA, X. G. Prevalence study of Eperythrozoon infection in pig farms and indicated the potential cross-transmission from swine to human in Shanghai, China. *American Journal Veterinary Research*, v. 70, p. 890-894, 2009.

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 – OBJETIVO GERAL

Detectar por meio de ferramentas moleculares a ocorrência e frequência de espécies de Anaplasmataceae e de Mycoplasmataceae (Mycoplasmas hemotrópicos) em amostras de sangue de bovinos leiteiros de assentamentos rurais da região norte do Estado do Paraná.

### 2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar o diagnóstico por PCR de *Anaplasma marginale* e *Anaplasma centrale*;
- Padronizar o diagnóstico por PCR de ‘C. M. haemobos’;
- Caracterizar por meio de sequenciamento os fragmentos do gene 16S rDNA amplificados nas PCRs de *Anaplasma* e de *Mycoplasma*;
- Determinar a frequência e distribuição da infecção pelas espécies de *Anaplasma* e *Mycoplasma* encontradas na população de bovinos leiteiros selecionados.

## 3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

### 3.1 – Research Note

#### Research Note

Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal, v. 21, n. 3, p. 342-344, jul.-set. 2012  
ISSN 0103-846X (impresso) / ISSN 1984-2961 (eletrônico)

## Molecular detection and occurrence of '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' in dairy cattle of Southern Brazil

Detecção molecular e ocorrência de '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' em bovinos de leite do Sul do Brasil

Aline Giroto<sup>1</sup>; Amanda Fonseca Zangirólamo<sup>1</sup>; Alexey Leon Gomel Bogado<sup>1</sup>;  
Arnaldo Sotero Luz e Souza<sup>1</sup>; Gislaíne Cristina Ferreira da Silva<sup>1</sup>; João Luis Garcia<sup>1</sup>;  
Laurival Antônio Vilas Boas<sup>1</sup>; Alexander Welker Biondo<sup>2,3</sup>; Odilon Vidotto<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, PR, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR, Brasil

<sup>3</sup>Department of Veterinary Pathobiology, University of Illinois – UIC, IL 61802, USA

Received May 1, 2012

Accepted September 24, 2012

#### Abstract

Bovine hemoplasmas are bacteria found on the erythrocyte surface or free in the plasma of cattle. The aim of the present study was to evaluate the occurrence of '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' ('*C. M. haemobos*') in Holstein and Jersey cattle raised in Londrina and surroundings, northern region of the State of Parana, Southern Brazil. PCR testing directed to 16S rRNA gene fragment was performed to investigate the occurrence and characterize the molecular identity of '*C. M. haemobos*'. A total of 264/433 (60.97%) blood samples were positive by PCR. Further alignment of 500-bp amplicons to available sequences at the GenBank database showed high identity (100%) to '*C. M. haemobos*'. To the author's knowledge, this is the first molecular confirmation of the hemoplasma '*C. M. haemobos*' in cattle from Brazil. Moreover, '*C. M. haemobos*' was observed in high occurrence in dairy cattle, and may have significant impact in livestock production.

**Keywords:** '*Candidatus Mycoplasma haemobos*', bovine, occurrence, phylogenetic tree, Brazil.

#### Resumo

Hemoplasmas de bovinos são bactérias encontradas na superfície de hemácias, ou livre no plasma de bovinos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' ('*C. M. haemobos*') em bovinos das raças Holandesa e Jersey da região de Londrina, norte do Paraná, sul do Brasil. Para investigar a ocorrência e caracterizar a identidade molecular do '*C. M. haemobos*' uma PCR baseada no fragmento do gene 16S rRNA foi realizada. A PCR identificou como positivas 264/433 (61%) amostras de sangue testadas. O alinhamento deste fragmento de 500 pb com seqüências disponíveis no GenBank mostrou 100% de identidade '*C. M. haemobos*'. Pela bibliografia consultada, esta é a primeira confirmação molecular do hemoplasma '*C. M. haemobos*' em bovinos no Brasil. Além disso, foi observada uma alta prevalência deste hemoplasma em bovinos de leite, que pode ter um impacto importante na pecuária bovina.

**Palavras-chave:** '*Candidatus Mycoplasma haemobos*', bovinos, árvore filogenética, ocorrência, Brasil.

Hemotropic mycoplasmas, also known as hemoplasmas, are cell wall-less organisms that attach to erythrocytes of a variety of domestic and wild animal species including human beings (MESSICK, 2004; SANTOS et al., 2008). In cattle, two distinct hemotropic *Mycoplasma* have been identified to date: *Mycoplasma wenyonii* (formerly *Eperythrozoon wenyonii*) (ADLER; ELLENBOGEN, 1934; SUTTON, et al., 1977) and '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' ('*C. M. haemobos*') (TAGAWA et al., 2008).

\*Corresponding author: Odilon Vidotto  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva,  
Universidade Estadual de Londrina – UEL, Rod. Celso Garcia Cid,  
Km 380, Campus Universitário, CEP 86051-980, Londrina, PR, Brasil  
e-mail: vidotto@uel.br

'*Candidatus Mycoplasma haemobos*' has been reported using molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR) and sequencing techniques in cattle from Switzerland, Germany, China, and Japan (HOFMANN-LEHMANN et al., 2004; TAGAWA et al., 2008; SU et al., 2010; HOELZLE et al., 2011). However, to the author's knowledge, no molecular detection has been reported to date in the Americas. Accordingly, the aim of the present study was to evaluate the occurrence of '*C. M. haemobos*' in Holstein and Jersey cattle raised in Londrina and surroundings, northern region of the State of Parana, Southern Brazil.

A total of 433 blood samples from dairy cattle (Holstein and Jersey) were collected between July 2009 and June 2010. Information relative to the sex, age and hematocrit of all animals was also obtained

www.cbpv.com.br/rbpv

and included in this study. Samples were drawn by jugular venopuncture, immediately placed in EDTA tubes and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  prior to DNA extraction. Total Genomic DNA was extracted from 200  $\mu\text{L}$  of each blood sample with a commercially available kit (DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN, Hilden, Germany) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until PCR testing. PCR was carried out using the primers (5'-ATC TAA CAT GCC CCT CTG TA-3'/5'-GTA GTA TTC GGT GCA AAC AA-3') as previously described (NISHIZAWA et al., 2010) with a few modifications: one microliter of DNA and 10 pmol of each primer were used in a 12.5  $\mu\text{L}$  PCR total volume, and an increase of  $6^{\circ}\text{C}$  for the annealing temperature was applied to improve the test specificity. DNA from '*C. M. haemobos*' and nuclease free water were used as positive and negative controls, respectively. The sensitivity of the PCR was evaluated by using a serial 10-fold dilution of DNA in water showing specific visible band until  $10^{-6}$  dilution. The detection limit was 10 fg of genomic DNA. To evaluate the specificity of the '*C. M. haemobos*' - PCR, DNA extracted from *Mycoplasma haemocanis*, *Mycoplasma haemofelis*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale* were used as DNA templates. PCR products were analyzed on 1.5% Agarose gel stained with commercial gel stain (SYBR<sup>®</sup> Safe DNA, Invitrogen, Eugene, OR, USA). The 100 bp ladder (Invitrogen, Eugene, OR, USA) was used as standard to initially determine the molecular mass of PCR products. The presence of DNA integrity and absence of PCR inhibitors in extracted samples that tested negative in PCR were

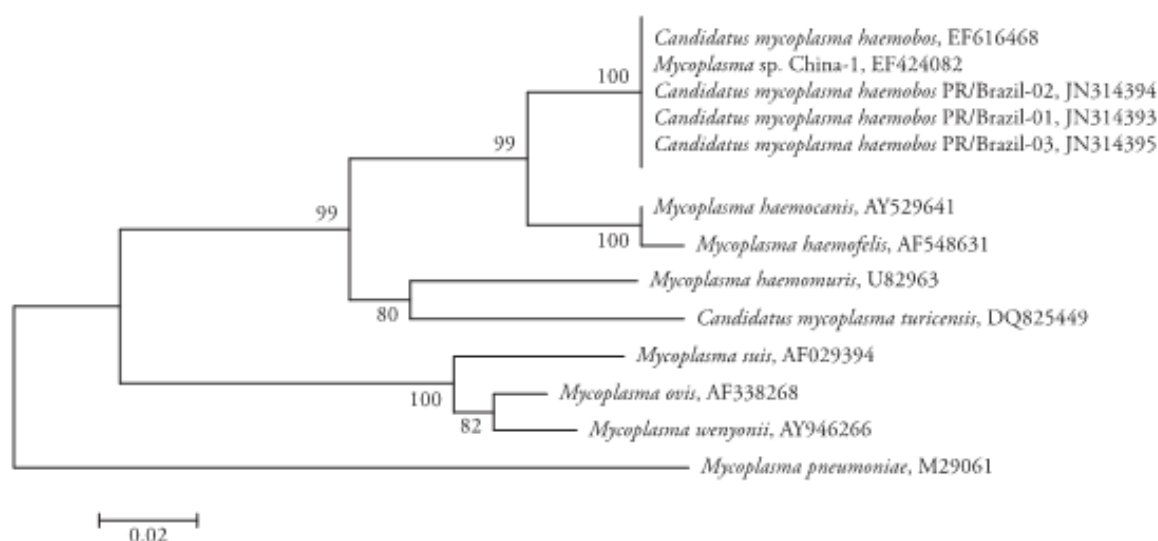
evaluate differences between variables;  $p \leq 0.05$  was considered as significant.

In the present study, DNA fragment of approximately 500 bp of the 16S rRNA gene of '*C. M. haemobos*' was amplified from 264/433 blood samples of dairy cattle. There was no amplification of DNA of any other agents used as specificity controls for '*C. M. haemobos*'. Direct sequencing of PCR amplicons from three representative samples confirmed that the amplified partial 16S rRNA (368bp) sequence represented '*C. M. haemobos*', ranged from 98 to 100% of identity with the known sequences in the GenBank database (EF616468, EF424082, EU367965, EF460765, EF616467), confirming the specificity of the PCR. The sequences were deposited in the GenBank database under accession numbers JN314393, JN314394 and JN314395. Moreover, the present results have shown a high occurrence of '*C. M. haemobos*' in dairy cattle from Southern Brazil, with 61.0% of positive animals.

A phylogenetic tree based on partial sequences of 16S rRNA genes (368 bp) found was produced applying the Neighbor-Joining method (Figure 1). The bootstrap values, calculated from 1000 replicates, show the percentage of replicate trees in which the associated ratio clustered together. The phylogenetic tree, sequence alignments, and identity tables (data not shown) were created by using Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 (TAMURA et al., 2007).

confirmed by the successful amplification of a housekeeping gene fragment (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - GAPDH) (BIRKENHEUER et al., 2003). Amplicons with the expected size were purified (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, Hilden, Germany) and submitted to direct sequencing using a commercial sequencer (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA); sequences were submitted to BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894, USA) to determine identity to other hemotropic *Mycoplasma* species. Epi info™ software was used to

Categorical variables were compared between PCR-positive and negative cattle using chi-square test. The hemoplasma-infected cattle in the present study did not appear to be clinically affected; no statistically significant differences in hematocrit were found between PCR-positive (ranged from 20% to 47%, average =  $31.76 \pm 5.21$ ) and PCR-negative (ranged from 19% to 43%, average =  $31.52 \pm 4.95$ ) animals ( $p = 0.054$ ). Furthermore, no statistical differences were observed for anemic animals ( $p = 0.445$ ). Animals above two years old ( $p = 0.001$ ), and females ( $p = 0.002$ ) presented higher occurrence of positive PCR. These results are consistent with the fact that females stay longer in the



**Figure 1.** Phylogenetic tree based on partial sequence analysis of 16S rRNA genes showing the clustering of the three cattle hemotropic isolates among the hemotropic *Mycoplasma* group. The tree shown was generated applying the Neighbor-Joining method (MEGA 4.1 software; TAMURA et al., 2007). *Mycoplasma pneumoniae* was used as out-group. The numbers at the nodes indicate bootstrap values in percent (1000 bootstraps). Numbers in brackets are GenBank accession numbers.

herds and, consequently, are more exposed to potential vectors (SMITH et al., 1990). Considering the frequency of vectors from our region in cattle, such as *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Stomoxys calcitrans*, these species could be involved in the transmission of this pathogen; however, this observation needs further investigation.

The 61.0% of positive animals reported in this study represents the first epidemiological information of cattle infected with 'C. M. haemobos' in Brazil. The epidemiological studies of cattle infected with this hemoplasma are from Hungary (HORNOK et al., 2012) and Switzerland (MELI et al., 2010), where 87.5% of animals

samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41(9): 4172-4177. PMID:12958243. PMID:193857. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.9.4172-4177.2003>

Hoedzle K, Winkler M, Kramer MM, Wittenbrink MM, Dieckmann SM, Hoedzle LE. Detection of *Candidatus Mycoplasma haemobos* in cattle with anaemia. *Vet J* 2011; 187(3): 408-410. PMID:20188610. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.01.016>

Hofmann-Lehmann R, Meli ML, Dreher UM, Gönzci E, Deplazes P, Braun U, et al. Concurrent infections with vector-borne pathogens associated with fatal hemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland. *J Clin Microbiol* 2004; 42(8): 3775-3780. PMID:15297529. PMID:497630. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.8.3775-3780.2004>

were found positive during an outbreak of bovine anaplasmosis and 65.4% of fatal cases were of anemic cows, respectively.

It is important to emphasize that in the present study, the animals were apparently healthy, and there was no significant statistical difference between hematocrit and positive and negative animals. Meli et al. (2010) found that the majority of positive animals were healthy; this result was similar to the findings of this research, where 50.8% of healthy animals were also positive for 'C. M. haemobos'. In the present study, it was not possible to determine whether the positive animals for 'C. M. haemobos' had presented the disease in the past, especially because the region studied presents a high incidence of anaplasmosis and other hemoparasites in the herds (ANDRADE et al., 2001).

Although the results indicate high occurrence of 'C. M. haemobos' within the healthy dairy cattle population of Northern Parana, Southern Brazil, infected animals may represent chronically asymptomatic carriers and the impact on dairy production is yet to be established. In addition, the results might have important implications on further studies regarding the pathogenicity and molecular epidemiology of 'C. M. haemobos'. To the author's knowledge, this is the first report of detection and occurrence of 'C. M. haemobos' in dairy cattle in Brazil based on molecular evidence.

## Acknowledgements

The authors are grateful to "CNPq" and "Fundação Araucaria do Parana" for the financial support and fellowship. This study is part of the PhD thesis by Aline Giroto at the Animal Science Graduate Program, "Universidade Estadual de Londrina" - UEL.

## References

Adler S, Ellenbogen V. A note on two new blood parasites of cattle, *Eperythrozoon* and *Bartonella*. *J Comp Pathol Ther* 1934; 47: 219-221.

Andrade GM, Vidotto O, Vidotto MC, Yoshihara E, Kano FS, Amaral CHS. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in dairy cattle and, studies on the dynamics of natural infection of Holstein calves in Southern Brazil. *Semina Cienc Agrar* 2001; 22(2): 155-159.

Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asia genotype) and *B. canis* DNA in canine blood

Hornok S, Micsutka A, Fernández de Mera IG, Meli ML, Gönczi, E, Tánzos B, et al. Fatal bovine anaplasmosis in a herd with new genotypes of *Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis* and concurrent haemoplasmosis. *Res Vet Sci* 2012; 92(1): 30-35. PMID:21094505. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.10.011>

Messick JB. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Vet Clin Pathol* 2004; 33(1): 2-13. PMID:15048620. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-165X.2004.tb00342.x>

Meli ML, Willi B, Dreher UM, Cattori V, Knubben-Schweizer G, Nuss K, et al. Identification, molecular characterization, and occurrence of two bovine hemoplasma species in Swiss cattle and development of real-time TaqMan quantitative PCR assays for diagnosis of bovine hemoplasma infections. *J Clin Microbiol* 2010; 48(10): 3563-3568. PMID:20686093. PMID:2953077. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02224-09>

Nishizawa I, Sato M, Fujihara M, Sato S, Harasawa R. Differential detection of hemotropic *Mycoplasma* species in cattle by melting curve analysis of PCR products. *J Vet Med Sci* 2010; 72(1): 77-79. PMID:19893280. <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.09-0338>

Santos AP, Santos RP, Biondo AW, Dora JM, Goldani LZ, Oliveira ST, et al. Hemoplasma Infection in HIV-positive Patient, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(12): 1922-1924. PMID:19046522. PMID:2634649. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1412.080964>

Smith JA, Thrall MA, Smith JL, Salman MD, Ching, SV, Collons JK. *Eperythrozoon wenyonii* infection in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1990; 196(8): 1244-1250. PMID:2332369.

Su QL, Song HQ, Lin RQ, Yuan ZG, Yang JF, Zhao GH, et al. The detection of "Candidatus *Mycoplasma haemobos*" in cattle and buffalo in China. *Trop Anim Health Prod* 2010; 42(8): 1805-1808. PMID:20596775. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-010-9640-0>

Sutton, RH, Charleston WA, Collins GH. *Eperythrozoon wenyonii* - ablood parasite of cattle. A first report in New Zealand. *N Z Vet J* 1977; 25: 8-9. PMID:275683. <http://dx.doi.org/10.1080/00480169.1977.34338>

Tagawa M, Matsumoto K, Inokuma H. Molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and 'Candidatus *Mycoplasma haemobos*' in cattle in Hokkaido, Japan. *Vet Microbiol* 2008; 132(1-2): 177-180. PMID:18571343. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.05.006>

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24(8): 1596-1599. PMID:17488738. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msm092>

## 3.2 – Full Article

**Molecular Diagnostic and Prevalence of the *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* in Unvaccinated Carrier Cattle from Southern Brazil.**

**Abstract:** *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* are obligate intracellular bacteria that parasitize the erythrocytes of cattle and other ruminants. The anaplasmosis can be acute or chronic in cattle and is most commonly found in tropical and subtropical regions of the world, causing severe damage to the development of cattle of several countries. Cattle that recover from clinical disease become carriers of *Anaplasma* spp and, due to the very low amount of infected erythrocyte in this stage of the infection, the rickettsemia can be only detected by molecular methods. The objective of this study was to detect the infection by *A. marginale* and *A. centrale* in unvaccinated carrier cattle from four counties of southern Brazil. PCR assay was used to assess the frequency of *A. marginale* and *A. centrale* infections in a total of 433 blood samples of dairy cattle of rural settlements in the north of the Parana State, Brazil. A pair of primers that amplifies a 155 bp fragment of the 16S rDNA of *A. marginale* and a pair of primers that amplifies a 122 bp fragment of the gene 16S rDNA for *A. centrale* were used. The DNA amplifications revealed that 89.14% (386/433) blood samples were positive for *A. marginale*, 34.0% (147/433) were positive for *A. centrale* and 31.29% (135) positive samples were co-infected. These results showed that cattle from studied area carry the two *Anaplasmas* without present clinical signs of anaplasmosis, which is consistent with the status of enzootic stability for the north region of Parana State. Furthermore, this is the first report of *A. centrale* in Brazil found naturally parasitizing unvaccinated cattle.

**Key words:** Anaplasmosis. Dairy cattle. Molecular detection.

**Introduction**

Anaplasmosis is an important vector-borne disease of ruminants caused by the intraerythrocytic rickettsiae of the genus *Anaplasma* (DUMLER et al., 2001). Based upon location within the infected erythrocyte, two species of *Anaplasma* that infect cattle have been described, *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale*. Despite differences in virulence and the different localization within infected erythrocytes (KOCAN et al., 2003), the two rickettsiae are antigenically related. Since cross-protective immunity to *A. marginale* can be acquired after *A. centrale* infection, the latter is used as a live vaccine for routine vaccination of cattle in Middle East, Oceania, Africa and South America (SHKAP et al., 2008).

Diagnosis of bovine anaplasmosis is made by finding corpuscles of *Anaplasma* in Giemsa-stained blood smears in animals clinically suspected, during the acute disease, whereas it is not useful to detect pre-symptomatic and carrier animals. Several serological tests have employed extensively for epidemiological studies, although they do not discriminate between different *Anaplasma* species because of antigenic similarity (PALMER,

1986). Molecular methods, with a high degree of sensitivity and specificity, have been developed to identify *A. marginale* and *A. centrale* DNA (MOLAD et al., 2006).

Anaplasmosis caused by *A. marginale* is an economically important and endemic disease of cattle in most tropical and subtropical regions of the world (PALMER et al., 1986; GRISI et al., 2002), including South America (BARROS et al., 2005). Although severe disease may also occur with *A. centrale*, it usually causes mild anemia in most cases (CARELLI et al., 2008).

*A. centrale* is also widely distributed but has never been reported in southern Brazil by PCR assay. In the present study, we applied PCR assays to detect and discriminate field infection with *A. marginale* and *A. centrale* in cattle in southern Brazil.

## Materials and Methods

### *Sample collection*

Blood samples were collected from jugular vein of 433 Holstein and Jersey dairy cattle (381 female and 52 male) ranging between 0 and 12 years from rural settlements of four counties in the north of the Parana State (Figure 1), between July 2009 and June 2010. The EDTA blood samples were obtained in vacuum tubes (Vacutainer, Becton Dickinson, San Jose, CA) and kept frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until DNA extraction. Hemogram using automated equipment and the Giemsa stained blood smears were performed. The sample size was calculated assuming a prevalence of 50% with a confidence level of 95% and efficacy of 5% (EpiInfo – CDC Atlanta).

### *DNA extraction and polymerase chain reaction*

For DNA extraction 200  $\mu\text{l}$  of each blood samples was used. Total genomic DNA was extracted using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturers' instructions. Extracted DNA was eluted in 100  $\mu\text{l}$  elution buffer and stored at  $20^{\circ}\text{C}$  until PCR analysis.

The amplification of the 16S rRNA of *A. marginale* and *A. centrale* was performed by PCR with four sets of specific primers (Table 1). PCR was performed in a total of 12,5  $\mu\text{l}$  solution containing 0.2mM dNTP, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2  $\mu\text{M}$  each primer, 1.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 1  $\mu\text{l}$  of DNA samples. Optimal PCR

conditions included a pre-denaturation of 5 min at 95 °C, followed by 35 cycles of 94 °C for 40 sec, 59 °C for 40 sec, 72 °C for 1 min, plus a final extension step at 72 °C for 5 min. The thermal conditions for amplification of the *A. centrale* were as for the *A. marginale* amplification, except that the annealing temperature was 62 °C. In each test, distilled water was included as a negative control and DNA of the *A. marginale* e *A. centrale* were included as a positive control. All amplifications were carried out in Applied Biosystems thermal cycler.

The PCR products were detected in 1.5% agarose gel electrophoresis then stained with SYBR<sup>®</sup>Safe (Invitrogen, Eugene, OR, USA). After electrophoretic migration of 8 µl of amplified material, the PCR products were visualized using UV transilluminator. The 100 bp ladder (Invitrogen, Eugene, OR, USA) was used as standard for initially determine the molecular length of PCR products. The presence of DNA integrity and absence of PCR inhibitors in extracted samples that tested negative in PCR, was confirmed by the successful amplification of a housekeeping gene fragment (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - GAPDH) (BIRKENHEUER et al., 2003). Amplicons with the expected size were purified (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, Hilden, Germany) and submitted for direct sequencing using a commercial sequencer (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Partial sequences of *A. marginale* and *A. centrale* obtained were submitted to BLAST analysis (ALTSCHUL et al., 1990) to determine the closest similarities to corresponding sequences.

## Results and Discussion

In the present study, DNA fragment of 155 bp of the 16S rRNA gene of *A. marginale* was amplified from 89.4% (387/433) blood samples of dairy cattle while DNA fragment of 122 bp of the 16S rRNA gene of *A. centrale* was amplified from 34% (147/433) blood samples. Among these positive samples, 135 (31.29%) had double infection (Table 1). Direct sequencing of PCR amplicons from three samples confirmed that the amplified partial 16S rRNA sequence represented *A. marginale* e *A. centrale*, with 100% of similarity with the known sequences of *A. marginale* and *A. centrale* deposited in Genbank, by BLAST analysis, PCR methods based on the 16S rRNA gene used allowed the discrimination between these two species.

Previous epidemiological studies with dairy cattle performed in the north region of Parana State had showed seropositivity rates for *A. marginale* ranging from 87.4%

to 92.7%, a condition of enzootic stability (VIDOTTO et al., 1998; ANDRADE et al., 2001). Our present finding is in consent with these previous seroepidemiological studies conducted in the same area. By other hands, Marana et al. (2009) reported a seroprevalence of 58.74% in mix bred cattle in the Center-Southern Region of the Paraná State. Likewise, Yoshihara et al. (2003) in the Umuarama Region, Northwest of Paraná State found a prevalence of 76.10% in Nelore bred cattle. Considering the criteria of enzootic stability or instability (MAHONEY et al., 1980; MADRUGA et al., 1986) based on high or low rates of seroprevalence, Parana state, South region of Brazil, can be considered stable or instable for anaplasmosis. This will depend on several factors, such as, climate, animal bred, management and tick burden.

The *A. marginale* seroprevalence rate in Brazil, according to studies in other regions, varies from 81.1 to 98.8% (RIBEIRO et al., 1984; OLIVEIRA et al., 1992; DALAGNOL et al., 1995; ARAUJO et al., 1998; MADRUGA et al., 2000; SOUZA et al., 2000; 2001) indicating that most area of the country can be considered in enzootic stability.

Although *A. marginale* can to be pathogenic, in our study the animals PCR positive were healthy showing no clinical signs compatible with other disease or anaplasmosis. According Kocan et al. (2010), the animals who suffer subclinical disease or animals recovered from an acute infection by *A. marginale* become carriers and serve as a reservoir of bacteria for up to seven years and are a source of infection for mechanical transmission by ticks and other animals. This explains the high rate of infection with *Anaplasma* spp. found in our study, with no obvious clinical signs of anaplasmosis and indicates that the immunological system of these animals are already sensitized by the presence and circulation of the parasites in the environment.

*A. marginale* subsp. *centrale* is a naturally attenuated subtype that has been used as a vaccine for a long time. The immunization with *A. centrale* does not prevent infection with *A. marginale*, but the severity of the disease is reduced and death is prevented (VIDOTTO et al., 1998). After a single immunization with *A. centrale* most cattle remain infected for 3-5 years (KRIGEL et al., 1992). An animal primarily infected with *A. marginale*, or with the related vaccine subspecies *A. centrale* can be infected with the heterologous subspecies, and carries both bacteria (SHKAP et al., 2008). The results of our study suggest that this *A. centrale* vaccine strain is transmitted from one animal to another through natural convection, as none of the animals in this study had been vaccinated. To date, there is no report of prevalence of the *A. centrale* in Brazil, thus, it was not possible to compare our findings with the prevalence of the disease in the same area or other areas. The results of present study have three implications. Firstly, the *A. centrale* is reported at the first time in

Brazil in carrier cattle. Secondly, the disease has a high prevalence in locality affecting a significant number of animals. Thirdly, the potential role of *R. B. microplus* and hematophagous insects in the transmission of *A. centrale* would warrant further studies.

Microscopic examination of Giemsa stained blood smears are used traditionally to detect *A. marginale* and *A. centrale* during the acute phase of the disease (TORIONI et al., 1998; BRADWAY et al., 2001; CARELLI et al., 2007). Due to the very low amount of infected erythrocyte in the carrier cattle, this method is not reliable for detecting pre-symptomatic or carrier animals (CARELLI et al., 2007). In these instances, the infection is generally diagnosed by serologic demonstration of antibodies and currently by confirmation by molecular detection methods. Our results showed that the traditional microscopic examination of blood smears was not able to detect low bacteremia in carrier cattle because inclusion bodies were recognized in only 3,23% (14/ 433) of blood smears, in agreement with previously published data (ERIKS et al., 1989; 1993; KIESER et al., 1990; FRENCH et al., 1998; TORIONI et al., 1998).

The high rate of infection without clinical signs in animals analyzed in our study is explained by Palmer (2000) which states that persistently infected or carriers cattle have lasting immunity and are resistant to the disease or to challenge with homologous strains and partially protected against challenge with heterologous strains. No relevant hematologic findings were found, however 21 animals presented hematocrit below 24%, but none had severe anemia. At the same time, this is the first identification of *A. centrale* in unvaccinated cattle from north Paraná region.

## **Conclusion**

In conclusion the present study indicated that anaplasmosis is highly prevalent in northern of Paraná State. The detection of persistently infected bovines is of importance for determining the infection and immune status of the animals. In this study, PCR has proven to be a powerful tool for detection and differentiating between of *A. marginale* and *A. centrale* species parasitizing cattle.

## References

- Andrade, G.M, Vidotto, O., Vidotto, M.C., Yoshihara, E., Kano, F.S., Amaral, C.H.S. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in dairy cattle and, studies on the dynamics of natural infection of Holstein calves in Southern Brazil. *Semina, Ciências Agrárias.*, Londrina, v. 22, n. 2, p. 155-159, 2001.
- Araujo, F.R., Madruga, C.R., Leal, C.R.B., Bastos, P.A.S., Marques, A.P.C. Freqüência de anticorpos anti*Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da Bahia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia*, v. 50, n. 3, p. 243-246, 1998.
- Barros S.L., Madruga C.R., Araújo F.R., Menk C.F., Almeida de M.A.O., Melo E.P.S., Kessler R.H. Serological survey of Babesia bovis, Babesia bigemina, and Anaplasma marginale antibodies in cattle from semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, n. 100, p. 513-517, 2005.
- Birkenheuer, A.J., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of Babesia gibsoni (Asia genotype) and B. canis DNA in canine blood samples. *Journal Clinical Microbiology*, v. 41, n. 9, p. 4172 – 4177, 2003.
- 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 Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 13, n. 1, p. 79-81, 2001.
- Carelli G., Decaro N., Lorusso A., Elia G., Lorusso E., Mari V., Ceci L., Buonavoglia C. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. *Veterinary Microbiology*. n.124, p. 107-114, 2007.
- Carelli G., Decaro N., Lorusso E., Paradies P., Elia G., Martella V., Buonavoglia C., Ceci L. First report of bovine anaplasmosis caused by *Anaplasma centrale* in Europe. *Annals New York Academy Science*, n. 1149, p. 107-110, 2008.
- Dalagnol, C. A.; Martins, E.; Madruga, C. R. Prevalência de anticorpos contra Babesia bovis, Babesia bigemina, Anaplasma marginale em bovinos de corte na região de clima Cfb. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 4, n. 2, p.220, 1995.
- Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasma taceae 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 Systematic Evolutionary Microbiology*, n. 51, p. 2145–2165, 2001.

Eriks I.S., Palmer G.H., McGuire T.C., Allred D., Barbet A.F. Detection and quantitation of *Anaplasma marginale* in carrier cattle by using a nucleic acid probe. *Journal Clinical Microbiology*, n. 27, p. 279–284, 1989.

Eriks I.S., Stiller D., Palmer G.H. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. *Journal Clinical Microbiology*, n. 31, p. 2091–2096, 1993.

French D.F., McElwain T.F., McGuire T.C., Palmer G.H. Expression of *Anaplasma marginale* major surface proteinvariants during persistent cyclic rickettsemia. *Infect Immunology*, n. 66, p. 1200–1207, 1998.

Grisi, L., Massard, C.L., Borja, G.E.M., Pereira, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária*, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

Kieser S.T, Eriks I.S, Palmer G.H . Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infect Immunology*, n. 58, p. 1117–1119, 1990.

Kocan, K. M., J. De La Fuente, A. A. Guglielmone, A.N.D., Melendez R. D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clinical Microbiology*, v. 16, p. 698–712, 2003.

Kocan, K. M.; Fuente, J.; Blouin, E. F.; Coetzee, J. F.; Ewing, S. A. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, v. 167, n. 2-4, p. 95-107, 2010.

Madruga, C.R.; Marques, A.P.C.; Leal, C.R.B.; Carvalho, C.M.E.; Araújo, F.R.; Kessler, R.H. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against *Anaplasma marginale*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. n. 20, v. 3, p. 109-112, 2000.

Marana, E.R.M.; Dias, J.A.; Freire, R.L.; Vicentini, J.C.; Vidotto, M.C.; Vidotto, O. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in cattle from Center-South Region of Paraná State, Brazil by a competitive ELISA test with recombinant MSP5-PR1 protein. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 18, n. 1, p.20-26, 2009.

Molad T., Mazuz M.L., Fleiderovitz L., Fish L., Savitsky I., Leibovitz B., Molloy J., Jongejan F., Shkap V., Krigel Y. Molecular and serological detection of *A. centrale*- and *A. marginale*-infected cattle grazing within an endemic area. *Veterinary Microbiology*, n. 113, p. 55–62, 2006.

Noaman V, Shayan P, Amininia N. Molecular diagnostic of *Anaplasma marginale* in carrier cattle. *Iran Journal Parasitology*, n. 4, p. 31-38, 2009.

Oliveira, A.A., Pedreira, P.A.S., Almeida, M.F.R.S. Doenças de bezerro. II Epidemiologia da anaplasmosose no Estado de Sergipe. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 44, n. 5, p. 377-386, 1992.

Palmer G.H., Barbet A.F., Kuttler K.L., McGuire T.C. Detection of an *Anaplasma marginale* common surface protein present in all stages of infection. *Journal Clinical Microbiology*, n. 23, p. 1078-1083, 1986.

Palmer, G.H.; Brown, W.C.; Rurangirwa, F.R. Antigenic variation in the persistence and transmission of the *Ehrlichia and Anaplasma marginale*. *Microbes and Infectious*, Paris, v.2, p.167-176, 2000.

Ribeiro M.F.B., Patarroyo J.H., Santos J.L. & Farias J.E. Epidemiologia da anaplasmoze bovina no estado de Minas Gerais. I. Prevalência de anticorpos aglutinantes e fluorescentes na Zona da Mata. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, n. 36, p. 425-432, 1984.

Shkap V., Leibovitch, B., Krigel, Y., Molad, T., Fish, L., Mazuz, M., Fleiderovitch, L., Savitsky, I. 2008. Concomitant infection of cattle with the vaccine strain *Anaplasma marginale* ss *centrale* and field strains of *A. marginale*. *Veterinary Microbiology*. v. 130, p. 277–284, 2008.

Souza, J. C. P.; Soares, C. O; Madruga, C. R.; Massard, C. L. Prevalência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em bovinos na mesorregião do médio Paraíba. *Ciência Rural*, v.31, n. 2, p. 309-314, 2001.

Souza, J. C. P., Soares, C. O., Massard, C. L., Scofield, A., Fonseca, A. H. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, n. 3, v.20, p. 97-101, 2000.

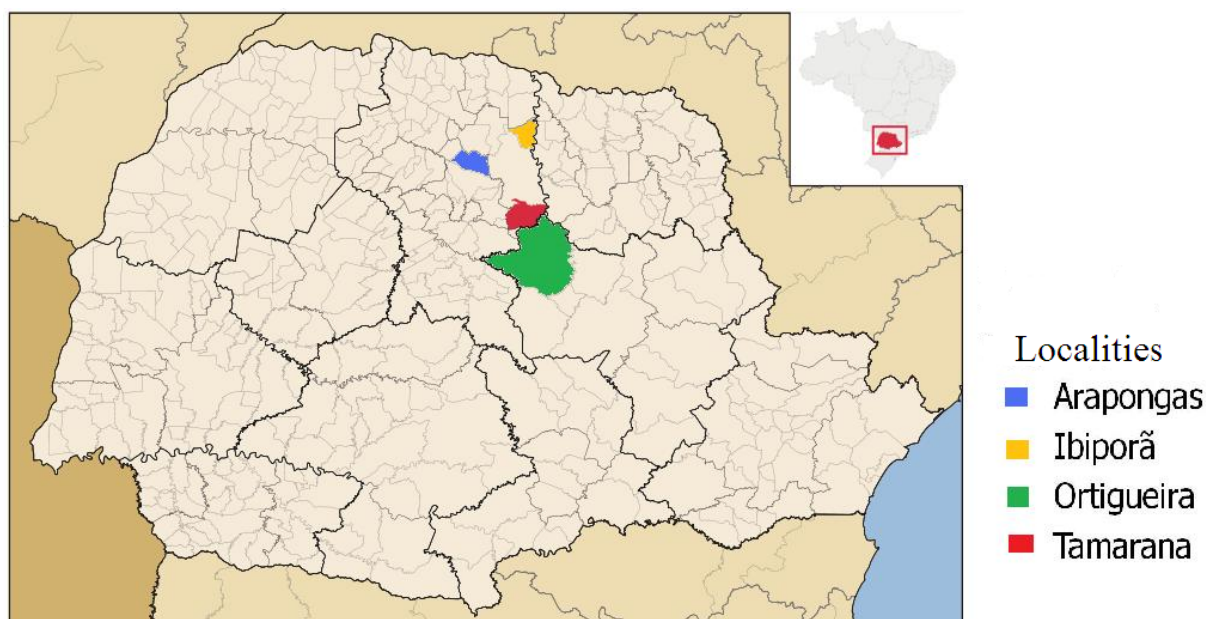
Torioni D.E., Echaide S., Knowles D.P., Mcguire T.C., Palmer G.H., Suarez C.E., Mcelwain T.F. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *Journal Clinical Microbiology*, n. 36, p. 777–782, 1998.

Vidotto, M.C., Vidotto, O., Andrade, G.M., Palmer, G. H., Mcelwain, T. and Knowles, D.P. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in Cattle in Parana State, Brazil, by MSP-5 Competitive ELISA. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 849, p. 424-426, 1998.

Vidotto, O., Barbosa, C.S., Andrade, G.M., Machado, R.Z., Da Rocha, M.A. and Silva, S.S. Evaluation of a Frozen Trivalent Attenuated Vaccine against Babesiosis and Anaplasmosis in Brazil. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 49, p. 420–423, 1998.

Yoshihara, E., Vidotto, O., Yamamura, M. H., Marana, E. R. M., Pacheco, R., Silveira, A. P. Studies of natural infection with *Anaplasma marginale* in nelore cattle in the Umuarama Municipality, Paraná State, Brazil. *Revista Brasileira Parasitology Veterinary*, v. 12, n. 1, p. 21-26, 2003.

**Figure 1** - Map showing the localities of the collected samples in Parana State, Brazil.



**Table 1** - Oligonucleotides sequences used in this study for amplification of 16S rDNA gene fragment of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale*.

Oligonucleotides	Amplicon (bp)
<b>AmF 5'TGCTTATGGCAGACATTTCCAT3'</b>	155bp
<b>AmR 5'GGGAAAGAGGACAACCACACA3'</b>	
<b>AcF 5'TGCAGTTGAGAAGTTCCGTATCA 3'</b>	122bp
<b>AcR 5' TGTTGCCTTAGCTGGGTCAAT 3'</b>	

**Table 2** - Positivity to *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* evaluated by PCR in 433 blood samples collected between July 2009 and June 2010 of cattle from Paraná State localities, Brazil.

Localities	Positive samples for <i>A. marginale</i>	Positive samples for <i>A. centrale</i>	Co-infected samples	Total samples by region
<b>Arapongas</b>	196 (50,77%)	111 (75,51%)	102 (75,55%)	222 (51,27%)
<b>Tamarana</b>	46 (11,91%)	6 (4,08%)	6 (4,44%)	53 (12,24%)
<b>Ibiporã</b>	100 (25,90%)	9 (6,12)	9 (6,66%)	110 (25,40%)
<b>Ortigueira</b>	44 (11,39%)	21(14,28%)	18 (13,33%)	48 (11,08)
<b>Total</b>	386 (89,14%)	147 (33,94%)	135 (31,17%)	433 (100%)

## 4 CONCLUSÕES

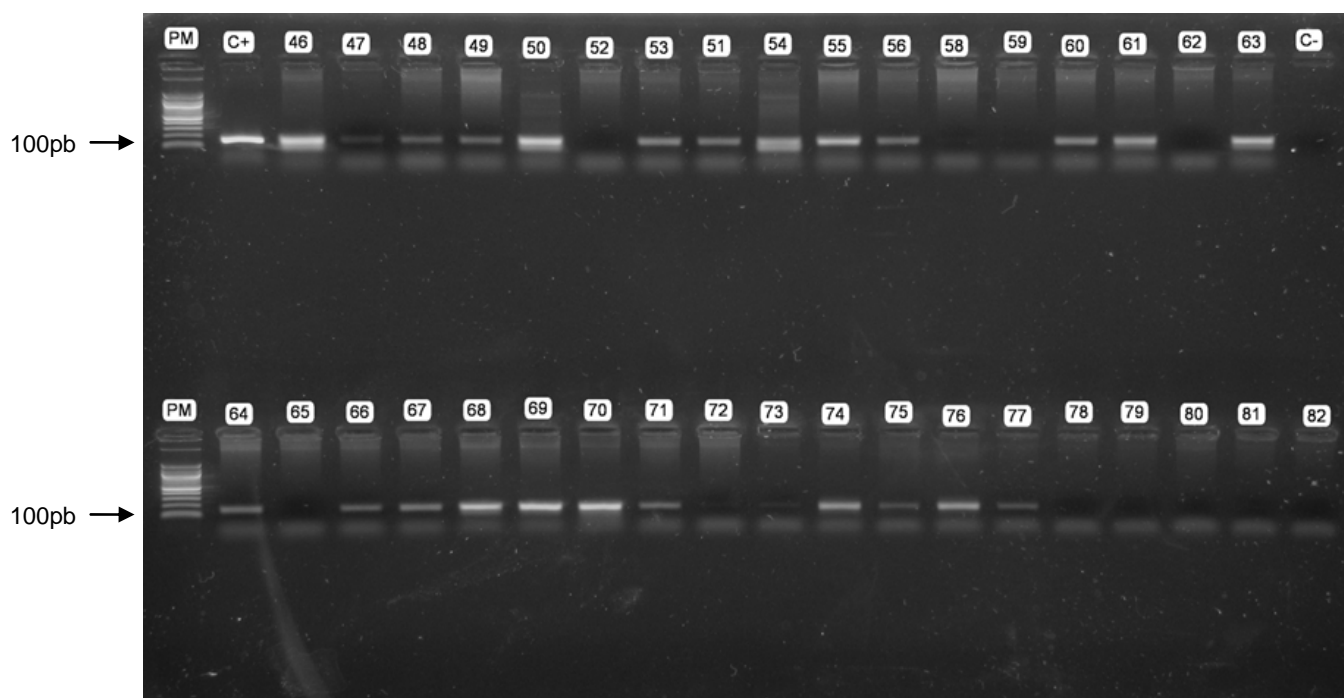
---

- A PCR é uma ferramenta eficiente na detecção e diferenciação entre as espécies *Anaplasma marginale* e *Anaplasma centrale* em bovinos naturalmente infectados;
- A PCR é uma ferramenta eficiente para detecção de ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’;
- A PCR com primers específicos para *Anaplasma centrale* realizada neste estudo possibilitou o primeiro relato de detecção molecular desta espécie em bovinos leiteiros pertencentes à assentamentos rurais da região norte do Estado do Paraná;
- A PCR com primers específicos para ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ realizada neste estudo possibilitou o primeiro relato das Américas da detecção molecular e prevalência deste micoplasma hemotrópico em bovinos;
- Anaplasmosose apresenta elevada prevalência nos bovinos leiteiros de assentamentos rurais da área estudada;
- A infecção por ‘*C. M. haemobos*’ não mostrou relação com a ocorrência de anemia.

## APÊNDICES

---

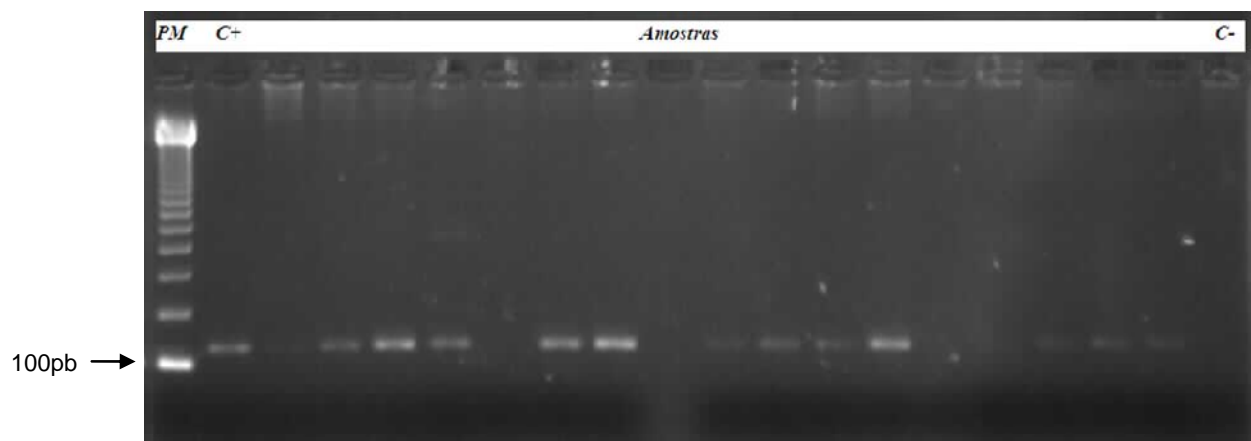
## APÊNDICE A



Detecção específica por PCR de um fragmento de 155pb do gene 16S rDNA de *A. marginale*, visualizado em gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Os retângulos brancos indicam o padrão de tamanho molecular (PM) (Invitrogen™ Life Technologies, EUA), controle positivo (C+), controle negativo (C-) e amostras de nº46 a 82.

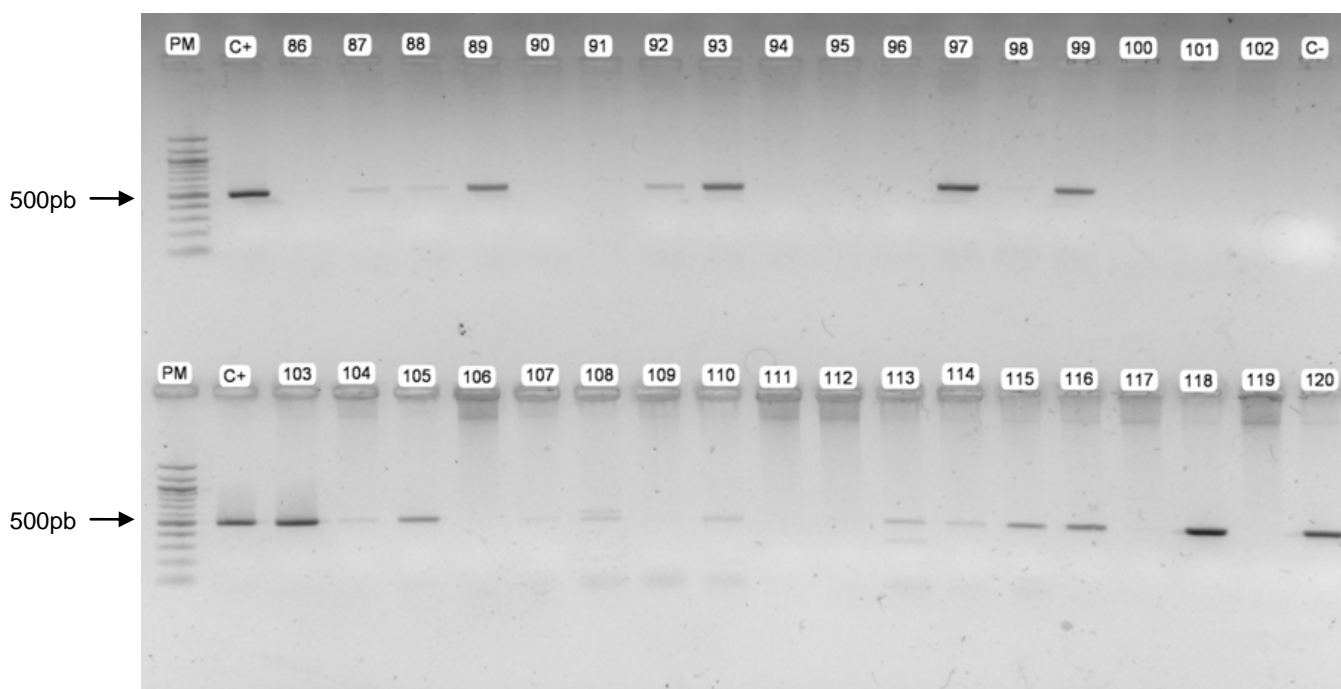
## APÊNDICE B

---



Detecção específica por PCR de um fragmento de 122pb do gene 16S rRNA de *A. centrale*, visualizado em gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. O retângulo branco indica o padrão de tamanho molecular (PM) (Invitrogen™ Life Technologies, EUA), controle positivo (C+), controle negativo (C-) e amostras de nº1 a 19.

## APÊNDICE C



Detecção específica por PCR de um fragmento de 500pb do gene 16S rDNA de '*C. M. haemobos*', visualizado em gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Os retângulos brancos indicam o padrão de tamanho molecular (PM) (Invitrogen™ Life Technologies, EUA), controle positivo (C+), controle negativo (C-) e amostras de nº86 a 120.

## APÊNDICE D

Tabela de resultados da detecção por PCR de *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale* e 'Candidatus Mycoplasma haemobos' nas 433 amostras de sangue bovino testadas.

<b>Amostras</b>	<b><i>A. centrale</i></b>	<b><i>A. marginale</i></b>	<b>'C. M. haemobos'</b>
<b>1</b>	+	+	+
<b>2</b>	+	+	+
<b>3</b>	-	+	+
<b>4</b>	-	+	+
<b>5</b>	+	+	+
<b>6</b>	+	+	+
<b>7</b>	+	+	+
<b>8</b>	+	+	+
<b>9</b>	+	+	+
<b>10</b>	+	+	+
<b>11</b>	+	+	+
<b>12</b>	+	+	+
<b>13</b>	-	+	+
<b>14</b>	-	+	+
<b>15</b>	-	+	+
<b>16</b>	+	+	+
<b>17</b>	-	+	-
<b>18</b>	-	+	+
<b>19</b>	+	+	+
<b>20</b>	+	+	+
<b>21</b>	+	+	+
<b>22</b>	+	+	+
<b>23</b>	-	+	+
<b>24</b>	-	+	+
<b>25</b>	+	+	+
<b>26</b>	+	+	+
<b>27</b>	+	+	+
<b>28</b>	-	+	+
<b>29</b>	+	-	+
<b>30</b>	+	+	+
<b>31</b>	-	+	+
<b>32</b>	+	+	+
<b>33</b>	-	+	-
<b>34</b>	-	+	+
<b>35</b>	-	+	+
<b>36</b>	+	+	+
<b>37</b>	+	+	+

---

<b>Amostras</b>	<b><i>A. centrale</i></b>	<b><i>A. marginale</i></b>	<b>'C. M. haemobos'</b>
<b>38</b>	+	+	+
<b>39</b>	+	+	+
<b>40</b>	+	+	+
<b>41</b>	+	-	-
<b>42</b>	+	+	-
<b>43</b>	+	+	+
<b>44</b>	+	-	+
<b>45</b>	+	-	+
<b>46</b>	-	-	+
<b>47</b>	+	+	+
<b>48</b>	+	+	+
<b>49</b>	+	+	+
<b>50</b>	-	+	+
<b>51</b>	+	+	+
<b>52</b>	+	-	+
<b>53</b>	+	+	-
<b>54</b>	+	+	-
<b>55</b>	+	+	+
<b>56</b>	+	+	+
<b>57</b>	+	+	+
<b>58</b>	-	-	+
<b>59</b>	+	-	+
<b>60</b>	-	+	-
<b>61</b>	+	+	+
<b>62</b>	-	-	+
<b>63</b>	+	+	+
<b>64</b>	+	+	+
<b>65</b>	-	-	-
<b>66</b>	-	+	+
<b>67</b>	-	+	+
<b>68</b>	-	+	+
<b>69</b>	-	+	+
<b>70</b>	+	+	+
<b>71</b>	+	+	+
<b>72</b>	+	-	-
<b>73</b>	-	+	-
<b>74</b>	-	+	-
<b>75</b>	-	+	+
<b>76</b>	-	+	-
<b>77</b>	-	+	-
<b>78</b>	-	-	-

---

---

<b>Amostras</b>	<b><i>A. centrale</i></b>	<b><i>A. marginale</i></b>	<b>'C. M. haemobos'</b>
<b>79</b>	-	-	-
<b>80</b>	-	-	-
<b>81</b>	-	-	-
<b>82</b>	-	-	-
<b>83</b>	+	+	-
<b>84</b>	-	+	-
<b>85</b>	-	+	-
<b>86</b>	-	+	-
<b>87</b>	-	+	+
<b>88</b>	-	+	+
<b>89</b>	-	+	+
<b>90</b>	+	+	-
<b>91</b>	-	-	+
<b>92</b>	-	-	+
<b>93</b>	-	+	+
<b>94</b>	-	-	-
<b>95</b>	-	-	-
<b>96</b>	-	+	-
<b>97</b>	+	-	+
<b>98</b>	+	+	-
<b>99</b>	-	-	+
<b>100</b>	-	+	-
<b>101</b>	-	+	-
<b>102</b>	+	+	-
<b>103</b>	-	+	+
<b>104</b>	-	+	+
<b>105</b>	-	+	+
<b>106</b>	-	+	-
<b>107</b>	-	+	+
<b>108</b>	+	+	+
<b>109</b>	-	+	-
<b>110</b>	-	+	+
<b>111</b>	-	+	-
<b>112</b>	+	+	-
<b>113</b>	+	+	+
<b>114</b>	+	+	+
<b>115</b>	+	+	+
<b>116</b>	+	+	+
<b>117</b>	-	+	-
<b>118</b>	+	+	+
<b>119</b>	+	+	-

---

---

<b>Amostras</b>	<b><i>A. centrale</i></b>	<b><i>A. marginale</i></b>	<b>'C. M. haemobos'</b>
<b>120</b>	-	+	+
<b>121</b>	-	+	+
<b>122</b>	+	+	+
<b>123</b>	+	+	+
<b>124</b>	+	+	-
<b>125</b>	+	+	-
<b>126</b>	+	+	-
<b>127</b>	-	+	+
<b>128</b>	-	+	-
<b>129</b>	+	+	+
<b>130</b>	-	+	+
<b>131</b>	-	+	-
<b>132</b>	-	+	-
<b>133</b>	-	+	-
<b>134</b>	-	+	-
<b>135</b>	-	+	-
<b>136</b>	-	+	-
<b>137</b>	-	+	-
<b>138</b>	-	-	-
<b>139</b>	-	+	-
<b>140</b>	-	+	-
<b>141</b>	-	+	-
<b>142</b>	-	+	+
<b>143</b>	-	+	-
<b>144</b>	-	+	+
<b>145</b>	-	+	-
<b>146</b>	-	+	+
<b>147</b>	+	+	-
<b>148</b>	+	+	-
<b>149</b>	+	+	-
<b>150</b>	+	+	-
<b>151</b>	+	+	-
<b>152</b>	+	+	-
<b>153</b>	+	+	+
<b>154</b>	+	+	+
<b>155</b>	+	+	+
<b>156</b>	+	+	-
<b>157</b>	+	+	-
<b>158</b>	-	+	+
<b>159</b>	+	+	+
<b>160</b>	+	+	+

---

---

<b>Amostras</b>	<b><i>A. centrale</i></b>	<b><i>A. marginale</i></b>	<b>'<i>C. M. haemobos</i>'</b>
<b>161</b>	+	+	+
<b>162</b>	+	+	+
<b>163</b>	+	+	+
<b>164</b>	+	+	+
<b>165</b>	+	+	+
<b>166</b>	-	+	+
<b>167</b>	-	+	+
<b>168</b>	+	+	+
<b>169</b>	-	+	-
<b>170</b>	+	+	-
<b>171</b>	+	+	-
<b>172</b>	+	+	+
<b>173</b>	não existe	não existe	não existe
<b>174</b>	-	+	+
<b>175</b>	-	+	+
<b>176</b>	-	+	+
<b>177</b>	-	+	+
<b>178</b>	-	+	+
<b>179</b>	não existe	não existe	não existe
<b>180</b>	+	+	+
<b>181</b>	-	+	+
<b>182</b>	-	+	+
<b>183</b>	+	+	+
<b>184</b>	-	+	-
<b>185</b>	+	-	+
<b>186</b>	+	+	-
<b>187</b>	+	+	+
<b>188</b>	-	+	+
<b>189</b>	+	+	-
<b>190</b>	-	+	-
<b>191</b>	+	+	-
<b>192</b>	-	+	+
<b>193</b>	+	+	+
<b>194</b>	+	+	+
<b>195</b>	+	+	-
<b>196</b>	+	+	+
<b>197</b>	+	+	+
<b>198</b>	+	+	+
<b>199</b>	-	+	+
<b>200</b>	não existe	não existe	não existe
<b>201</b>	+	+	+

---

---

<b>Amostras</b>	<b><i>A. centrale</i></b>	<b><i>A. marginale</i></b>	<b>'C. M. haemobos'</b>
<b>202</b>	+	+	+
<b>203</b>	+	+	+
<b>204</b>	-	+	+
<b>205</b>	-	+	-
<b>206</b>	+	+	-
<b>207</b>	-	-	+
<b>208</b>	-	+	+
<b>209</b>	-	+	-
<b>210</b>	-	+	+
<b>211</b>	-	+	-
<b>212</b>	-	+	-
<b>213</b>	-	+	-
<b>214</b>	+	+	+
<b>215</b>	+	+	-
<b>216</b>	-	+	-
<b>217</b>	-	+	-
<b>218</b>	-	+	+
<b>219</b>	-	+	-
<b>220</b>	-	+	+
<b>221</b>	+	+	+
<b>222</b>	+	+	+
<b>223</b>	-	+	+
<b>224</b>	+	+	+
<b>225</b>	-	-	+
<b>226</b>	-	+	+
<b>227</b>	+	+	-
<b>228</b>	-	+	+
<b>229</b>	-	+	+
<b>230</b>	+	+	+
<b>231</b>	+	+	-
<b>232</b>	-	+	+
<b>233</b>	-	+	+
<b>234</b>	-	+	+
<b>235</b>	-	+	-
<b>236</b>	-	+	+
<b>237</b>	-	+	+
<b>238</b>	-	+	+
<b>239</b>	-	+	-
<b>240</b>	-	+	-
<b>241</b>	+	+	+
<b>242</b>	-	+	-

---

---

<b>Amostras</b>	<b><i>A. centrale</i></b>	<b><i>A. marginale</i></b>	<b>'C. M. haemobos'</b>
<b>243</b>	-	-	-
<b>244</b>	-	-	-
<b>245</b>	-	+	+
<b>246</b>	-	+	+
<b>247</b>	-	+	+
<b>248</b>	-	+	+
<b>249</b>	-	+	+
<b>250</b>	-	+	+
<b>251</b>	-	+	+
<b>252</b>	-	+	+
<b>253</b>	-	+	+
<b>254</b>	-	+	+
<b>255</b>	-	+	+
<b>256</b>	-	+	+
<b>257</b>	-	+	+
<b>258</b>	-	+	+
<b>259</b>	-	+	+
<b>260</b>	-	-	+
<b>261</b>	+	+	+
<b>262</b>	-	+	+
<b>263</b>	-	+	+
<b>264</b>	-	+	+
<b>265</b>	-	-	+
<b>266</b>	-	+	-
<b>267</b>	-	+	-
<b>268</b>	-	+	+
<b>269</b>	-	+	+
<b>270</b>	-	+	-
<b>271</b>	-	+	-
<b>272</b>	-	+	+
<b>273</b>	-	+	-
<b>274</b>	+	+	-
<b>275</b>	-	+	+
<b>276</b>	-	+	+
<b>277</b>	-	+	-
<b>278</b>	-	-	+
<b>279</b>	-	+	+
<b>280</b>	-	-	-
<b>281</b>	-	+	-
<b>282</b>	-	-	+
<b>283</b>	-	+	+

---

---

<b>Amostrs</b>	<b><i>A. centrale</i></b>	<b><i>A. marginale</i></b>	<b>'C. M. haemobos'</b>
<b>284</b>	-	+	+
<b>285</b>	-	+	+
<b>286</b>	-	+	+
<b>287</b>	-	+	+
<b>288</b>	+	+	-
<b>289</b>	-	+	+
<b>290</b>	-	+	-
<b>291</b>	-	-	+
<b>292</b>	-	+	+
<b>293</b>	-	+	+
<b>294</b>	-	+	-
<b>295</b>	-	+	+
<b>296</b>	-	+	+
<b>297</b>	-	+	-
<b>298</b>	-	+	-
<b>299</b>	-	+	-
<b>300</b>	-	-	+
<b>301</b>	-	+	+
<b>302</b>	-	+	-
<b>303</b>	-	+	-
<b>304</b>	-	+	-
<b>305</b>	-	+	+
<b>306</b>	-	+	-
<b>307</b>	-	+	+
<b>308</b>	-	+	+
<b>309</b>	-	+	-
<b>310</b>	-	+	-
<b>311</b>	-	+	+
<b>312</b>	-	+	+
<b>313</b>	-	+	+
<b>314</b>	-	+	+
<b>315</b>	-	+	-
<b>316</b>	-	+	+
<b>317</b>	-	+	+
<b>318</b>	-	-	+
<b>319</b>	-	+	+
<b>320</b>	-	+	+
<b>321</b>	-	+	-
<b>322</b>	-	+	+
<b>323</b>	-	+	+
<b>324</b>	-	+	+

---

---

<b>Amostras</b>	<b><i>A. centrale</i></b>	<b><i>A. marginale</i></b>	<b>'<i>C. M. haemobos</i>'</b>
<b>325</b>	-	+	+
<b>326</b>	-	+	+
<b>327</b>	-	+	+
<b>328</b>	-	+	+
<b>329</b>	-	+	-
<b>330</b>	-	+	+
<b>331</b>	-	+	+
<b>332</b>	-	-	-
<b>333</b>	-	-	+
<b>334</b>	-	+	+
<b>335</b>	-	-	-
<b>336</b>	-	+	+
<b>337</b>	-	+	-
<b>338</b>	+	+	+
<b>339</b>	-	+	-
<b>340</b>	-	+	+
<b>341</b>	-	+	+
<b>342</b>	-	+	+
<b>343</b>	+	+	-
<b>344</b>	+	+	+
<b>345</b>	-	+	-
<b>346</b>	-	+	+
<b>347</b>	-	+	-
<b>348</b>	-	+	-
<b>349</b>	-	+	-
<b>350</b>	-	+	+
<b>351</b>	-	+	+
<b>352</b>	-	+	-
<b>353</b>	-	+	-
<b>354</b>	-	+	-
<b>355</b>	não existe	não existe	não existe
<b>356</b>	-	+	-
<b>357</b>	-	+	-
<b>358</b>	-	+	+
<b>359</b>	-	+	-
<b>360</b>	-	+	-
<b>361</b>	+	+	+
<b>362</b>	-	+	+
<b>363</b>	-	+	-
<b>364</b>	-	+	+
<b>365</b>	-	+	-

---

---

<b>Amostras</b>	<b><i>A. centrale</i></b>	<b><i>A. marginale</i></b>	<b>'C. M. haemobos'</b>
<b>366</b>	-	+	-
<b>367</b>	-	-	+
<b>368</b>	-	+	-
<b>369</b>	-	+	-
<b>370</b>	-	+	-
<b>371</b>	+	+	+
<b>372</b>	-	+	-
<b>373</b>	-	+	-
<b>374</b>	-	+	+
<b>375</b>	-	+	+
<b>376</b>	-	+	+
<b>377</b>	-	+	+
<b>378</b>	-	+	+
<b>379</b>	-	+	+
<b>380</b>	+	+	+
<b>381</b>	+	+	-
<b>382</b>	+	+	-
<b>383</b>	+	-	-
<b>384</b>	-	+	+
<b>385</b>	-	+	+
<b>386</b>	-	+	+
<b>387</b>	+	+	+
<b>388</b>	+	-	-
<b>389</b>	-	+	-
<b>390</b>	+	+	-
<b>391</b>	+	+	-
<b>392</b>	+	+	-
<b>393</b>	-	+	-
<b>394</b>	+	+	-
<b>395</b>	+	+	+
<b>396</b>	+	+	-
<b>397</b>	+	+	-
<b>398</b>	+	+	-
<b>399</b>	+	+	+
<b>400</b>	+	+	+
<b>401</b>	-	+	-
<b>402</b>	-	+	+
<b>403</b>	+	+	-
<b>404</b>	+	+	-
<b>405</b>	+	+	-
<b>406</b>	-	+	-

---

---

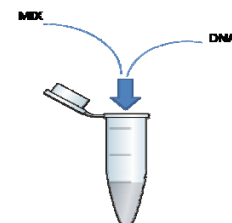
<b>Amostrs</b>	<b><i>A. centrale</i></b>	<b><i>A. marginale</i></b>	<b>'C. M. haemobos'</b>
<b>407</b>	-	-	-
<b>408</b>	-	+	-
<b>409</b>	-	+	-
<b>410</b>	-	+	-
<b>411</b>	-	+	+
<b>412</b>	+	-	+
<b>413</b>	-	+	+
<b>414</b>	+	+	+
<b>415</b>	-	+	-
<b>416</b>	-	+	-
<b>417</b>	-	+	+
<b>418</b>	-	+	+
<b>419</b>	-	+	-
<b>420</b>	-	+	-
<b>421</b>	-	+	-
<b>422</b>	-	+	-
<b>423</b>	+	+	+
<b>424</b>	-	+	+
<b>425</b>	-	-	-
<b>426</b>	-	+	-
<b>427</b>	-	+	+
<b>428</b>	-	+	+
<b>429</b>	-	+	+
<b>430</b>	-	+	+
<b>431</b>	+	+	-
<b>432</b>	-	-	+
<b>433</b>	-	-	+
<b>434</b>	-	+	+
<b>435</b>	+	+	+
<b>436</b>	-	+	-
<b>437</b>	-	+	-

---



*Anaplasma marginale***PREPARAÇÃO DO MIX**

Reagentes	Volume (12,5µl)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	4,12µl
<b>Mix (dNTP + MgCl<sub>2</sub>)</b>	6,25 µl
<b>PrimerF</b>	0,5µl
<b>PrimerR</b>	0,5µl
<b>Taq (5U/µl )</b>	0,13µl
<b>DNA</b>	1 µl
<b>Total</b>	12,5µl

**TERMOCICLADOR**

Ciclo de temperatura: “AMARG”

5' – 95°C

40" – 94°C

40" – 59°C

1' – 72°C

5' – 72°C

35x

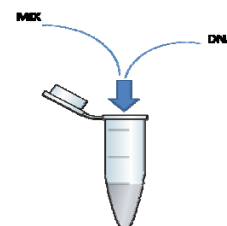
**PRIMERS** (amplicon de 155pb)

5' TGCTTATGGCAGACATTTCCAT 3'

5' GGGAAAGAGGACAACCACACA 3'

***Anaplasma centrale*****PREPARAÇÃO DO MIX**

Reagentes	Volume (12,5µl)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	4,12µl
<b>Mix (dNTP + MgCl<sub>2</sub>)</b>	6,25 µl
<b>PrimerF</b>	0,5µl
<b>PrimerR</b>	0,5µl
<b>Taq (5U/µl )</b>	0,13µl
<b>DNA</b>	1 µl
Total	12,5µl

**TERMOCICLADOR**

Ciclo de temperatura: "AMARG"

5' – 95°C

40" – 94°C

40" – 62°C

1' – 72°C

5' – 72°C

35x

**PRIMERS** (amplicon de 122pb)

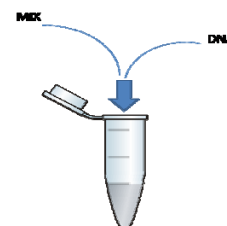
5' TGCAGTTGAGAAGTTCCGTATCA 3'

5' TGTTGCCTTAGCTGGGTCAAT 3'

## 'Candidatus *Micoplasma haemobos*'

### PREPARAÇÃO DO MIX

Reagentes	Volume (12,5µl)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	4,12µl
<b>Mix (dNTP + MgCl<sub>2</sub>)</b>	6,25 µl
<b>PrimerF</b>	0,5µl
<b>PrimerR</b>	0,5µl
<b>Taq (5U/µl )</b>	0,13µl
<b>DNA</b>	1 µl
Total	12,5µl



### TERMOCICLADOR

Ciclo de temperatura: "HAEMOBOS"

5' – 95°C

30" – 94°C

2' – 64°C

1' – 72°C

5' – 72°C

35x

**PRIMERS** (amplicon de 500pb)

5' ATC TAA CAT GCC CCT CTG TA 3'

5' GTA GTA TTC GGT GCA AAC AA 3'