



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

**ELIZABETE REGINA MARANGONI MARANA**

**PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM TESTE DE ELISA  
COMPETITIVO UTILIZANDO A PROTEÍNA  
RECOMBINANTE MSP5-PR1 PARA O DIAGNÓSTICO  
SOROLÓGICO DA ANAPLASMOSE BOVINA**

---

Londrina  
2006

**ELIZABETE REGINA MARANGONI MARANA**

**PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM TESTE DE ELISA  
COMPETITIVO UTILIZANDO A PROTEÍNA  
RECOMBINANTE MSP5-PR1 PARA O DIAGNÓSTICO  
SOROLÓGICO DA ANAPLASMOSE BOVINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal, da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Odilon Vidotto

Londrina  
2006

**ELIZABETE REGINA MARANGONI MARANA**

**PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM TESTE DE ELISA  
COMPETITIVO UTILIZANDO A PROTEÍNA  
RECOMBINANTE MSP5-PR1 PARA O DIAGNÓSTICO  
SOROLÓGICO DA ANAPLASMOSE BOVINA**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Odilon Vidotto

*Universidade Estadual de Londrina - PR*

---

Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado

*Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita  
Filho, UNESP- SP*

---

Prof. Dr. João Luis Garcia

*Universidade Estadual do Centro-Oeste-  
Guarapuava - PR*

---

Profa. Dra. Marilda Carlos Vidotto

*Universidade Estadual de Londrina - PR*

---

Prof. Dr. Ademir Benedito da Luz Pereira

*Universidade Estadual de Londrina - PR*

Londrina, 24 de março de 2006.

## **DEDICATÓRIA**

À DEUS PAI

pela vida que me concedeu e pela capacidade  
de vivê-la.

A meu esposo David e meu filho Fernando  
Luís pelo amor, apoio, incentivo, paciência e  
companheirismo que têm demonstrado ao  
longo de nossas vidas.

A meus pais Sebastião Marangoni e Clarice  
Aparecida de Carvalho Marangoni (*in  
memorium*) e a meus sogros Silvestre Marana  
e Maria José Paine Marana, aos meus irmãos  
Carlos Eduardo, Elianete Maria e Angelo  
Fernando pelo carinho, amor, paciência e  
compreensão em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Londrina, ao Centro de Ciências Agrárias, ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela oportunidade que tem concedido de melhor qualificar seus servidores.

Ao meu orientador Prof. Dr. Odilon Vidotto pela grande colaboração e incentivos para a conquista deste trabalho, e tem contribuído para ampliar os conhecimentos, desde o período de graduação, especialização, mestrado e doutorado.

A Profa. Dra. Marilda Carlos Vidotto pelos ensinamentos, sugestões e incentivos para a conquista deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Italmir Teodorico Navarro sempre pronto a ouvir, sugerir, orientar e pela amizade, atenção, companheirismo e confiança que sempre demonstra.

A Profa. Dra. Roberta Lemos Freire pela orientação no desenvolvimento das análises estatísticas, pela amizade e confiança.

Ao Prof. Dr. João Luís Garcia pela colaboração, amizade, sugestões e valioso auxílio científico prestados durante a execução deste trabalho.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação pelo carinho e atenção constantes e pela amizade e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Sergio da Silva e Silva para colaboração e fornecimento dos soros bovinos de Santa Vitória do Palmar, RS.

Ao funcionário Ademir pela amizade e colaboração para que o funcionamento do Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública pudesse desenvolver suas atividades, pela preparação de materiais de laboratório necessários para a realização deste trabalho.

Aos secretários Nelson Alexandre Moretto, Reinaldo Aparecido Peroza e Valdecir pela colaboração que sempre dedicaram a todos.

A todos os funcionários do Departamento que sempre foram atenciosos, carinhosos em todas as fases deste Doutorado.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

A autora do presente trabalho nasceu em Cambé, no estado do Paraná, é casada residente em Londrina. Formou-se em Farmácia Bioquímica pela Universidade Estadual de Londrina em 1977, cursou Medicina Veterinária formando-se em agosto de 1988 pela Universidade Estadual de Londrina.

Exerceu a Medicina Veterinária durante dois anos, como sócio-proprietária da Clínica Veterinária Sheepegog Ltda. em Cambé-PR, de novembro de 1988 a dezembro de 1990, quando assumiu a responsabilidade técnica do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina-PR, até setembro de 1993.

É especialista em Sanidade Animal com apresentação de Monografia de conclusão de Curso sob orientação do Prof. Dr. Ernest Ekehardt Muller intitulada “Mastite Bovina: importância econômica e sanitária; etiologia; diagnóstico rápido”.

Trabalhou na área de Inspeção de Leite, ministrando aulas na disciplina de Inspeção de Produtos de Origem Animal, no controle de qualidade do Leite Pasteurizado tipo A, marca BELLO e DE LEITE, na Assessoria de Controle de Qualidade da Cooperativa Agropecuária de Londrina - CATIVA, em Londrina-PR.

Retornou a Universidade Estadual de Londrina, assumindo a responsabilidade técnica do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas em dezembro de 1994, quando iniciou o Curso de Mestrado em Sanidade, até retornar a trabalhar no Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública e Laboratório de Protozoologia, a partir de setembro de 1996.

É mestre em Ciência Animal com a Dissertação de conclusão do Curso de Mestrado em Sanidade Animal, como exigência final para sua conclusão, sob orientação do Prof. Dr. Odilon Vidotto intitulada “Comparação dos testes sorológicos de Conglutinação Rápida, Imunofluorescência Indireta, ELISA e cELISA para detecção de anticorpos contra *Anaplasma marginale*.”

MARANA, Elisabete Regina Marangoni. **Padronização e avaliação de um teste de ELISA competitivo utilizando a proteína recombinante MSP5-PR1 para o diagnóstico sorológico da anaplasmoze bovina.** 2006. 109f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2006.

## RESUMO

*Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) é o agente etiológico da anaplasmoze bovina que se encontra distribuída mundialmente afetando regiões tropicais e subtropicais. É transmitido por vetores, sendo a doença caracterizada clinicamente por febre, anemia hemolítica, perda de peso, aborto e morte. *A. marginale* possui seis Proteínas Majoritárias de Superfície (MSPs) caracterizadas e designadas MSP1a (105 kDa), MSP1b (100 kDa), MSP2 (36 kDa), MSP3 (86 kDa), MSP4 (31 kDa), MSP5 (19 kDa). Estas proteínas estão envolvidas em importantes eventos entre as células do hospedeiro e o parasita, como respostas humoral e celular, transporte de nutrientes, adesão e invasão de eritrócitos e variação antigênica. A MSP5 é uma proteína altamente conservada entre os isolados estudados de diferentes regiões geográficas, inclusive centrale de *Anaplasma centrale* e *A. ovis*. O presente trabalho teve como objetivo padronizar e avaliar um teste imunoenzimático um teste imunoenzimático competitivo (cELISA-PR1), utilizando a rMSP5 do isolado PR1 de *A. marginale* desenvolvido para o diagnóstico sorológico de anaplasmoze. O gene *msp5* foi clonado no plasmídeo pRSET<sub>B</sub> e expresso em *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) One Shot (Invitrogen®). O seqüenciamento do gene *msp5* mostrou 98% identidade com os isolados Florida e Saint Maries, 97% com isolados Brasil-Pernambuco e Havana; e 91% com *A. centrale*. A proteína recombinante rMSP5 a partir do isolado PR1 (rMSP5-PR1) foi reconhecida pelo anticorpo de monoclonal ANAF16C1 em Western blotting. O cELISA-PR1 e a IFI foram comparados com cELISA pela análise de 283 soros bovinos, sendo 135 amostras negativas oriundas da região de Santa Vitória do Palmar - RS, e 147 amostras de soros positivas de bovinos naturalmente infectados com *A. marginale* que obtiveram densidade óptica inferior a 0,490 em 490nm (DO<sub>490</sub>) através do cELISA foram selecionadas de 245 amostras da região Sul do Brasil. Os testes apresentaram especificidade de 100% e 99,3%, sensibilidade de 100% e 98%, com um coeficiente *kappa* de 0,993 e 0,978, respectivamente. Na comparação de cELISA-PR1 e IFI com cELISA, a análise de 245 amostras de soros de bovinos naturalmente infectados com *A. marginale* na região de Sul do Brasil apresentou uma prevalência de 77,55%, 81,63% e 76,73% respectivamente, com especificidade de 96,7% e 98,9%, sensibilidade de 98,9%, 96,3% e um coeficiente *kappa* de 0,956 e 0,699, respectivamente. Conclui-se, através dos resultados obtidos, que cELISA-PR1 pode ter uso semelhante ao cELISA em testes diagnósticos contra *A. marginale* durante a infecção aguda, avaliação sorológica, e identificação de bovinos portadores sãos. A soroprevalência de *A. marginale* foi determinada em 223 amostras de soros de bovinos com dois anos de idade ou mais, da Região de Centro-Sul no Estado de Paraná: região de Ponta Grossa, Guarapuava e Laranjeiras; através da pesquisa de anticorpos da classe IgG contra *A. marginale* por ensaio imunoenzimático de competição cELISA-PR1. De todos os soros bovinos analisados, 130 (58,74%) reagiram ao cELISA-PR1, uma porcentagem significativa de animais, sendo esta região de instabilidade de enzoótica, susceptível à infecção por *A. marginale* e ao desenvolvimento de anaplasmoze. O tipo de exploração da propriedade, sistema de criação e manejo, a presença de outros animais (ovino, caprino, eqüinos, animais silvestres), forma de comercialização de animais não apresentou diferença significativa entre as variáveis analisadas apresentando  $p > 0,01$ .

**Palavras-chave:** *Anaplasma marginale*. Bovino. MSP5. Proteína recombinante. cELISA. IFI. Comparação. Soroprevalência. Paraná. Prevalência. Sensibilidade. *Kappa*.

MARANA, Elisabete Regina Marangoni. **Standardization and evaluation of a assay competitive ELISA using recombinant MSP5-PR1 for the serological diagnosis of bovine anaplasmosis.** 2006. 109f. Thesis (Doctorate Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2006.

## ABSTRACT

*Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) is the ethiological agent of hemolytic disease which affects flocks throughout the world, mainly in tropical regions. It is transmitted by ticks infecting animals and humans, causing an economically important illness which is clinically characterized by fever, hemolytic anemia, weight loss, abortion; and during the acute phase of the infection, even death. *A. marginale* has six Major Surface Proteins (MSPs) characterized and designated MSP1a (105 kDa), MSP1b (100 kDa), MSP2 (36 kDa), MSP3 (86 kDa), MSP4 (31 kDa), MSP5 (19 kDa). These proteins are involved in important events between host cells and parasite, such as humoral and cellular responses, nutrient transportation, attachment and invasion of erythrocytes, and antigenic variation. MSP5 is a highly preserved protein among the isolates studied from different geographical regions, including *Anaplasma centrale* and *A. ovis*. Its antigenic characteristics observed in epidemiological and immunological studies, molecular biology, nPCR, hybridization, sequencing and recombinant MSP5 protein enable its use in assays in the diagnosis of cattle anaplasmosis, giving these high sensitivity and specificity. A modified competitive ELISA test was developed for the serological diagnosis of cattle with anaplasmosis using recombinant MSP5 protein (rMSP5) from PR1 isolate from *A. marginale*, expressed by the plasmid pRSET B/*m*sp5 in *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) One Shot (Invitrogen®). The antigenic characterization of the PR1 isolate from *A. marginale* contributed to the identification of MSP5, preserved in the isolate *A. marginale* studied. The sequencing showed 98% identity with the isolates Florida and Saint Maries, 97% with isolates Brasil-Pernambuco and Havana; and 91% with *A. centrale*. The rMSP5-PR1 was recognized by the monoclonal antibody ANAF16C1 in Western Blotting. The cELISA-PR1 and IFI were compared with cELISA by analyzing 283 cattle sera, being 135 negative sera samples in the Santa Vitória do Palmar region, RS, and 147 positive sera samples from cattle naturally infected with *A. marginale* in the Londrina region, North of Paraná. These samples presented specificity of 100.0% and 99.3%, sensitivity of 100.0% and 98.0%,  $k=0.993$  e  $k=0.978$  respectively. In the comparison of cELISA-PR1 and IFI with cELISA, the analysis of 245 sera samples from cattle naturally infected with *A. marginale* in the region of Londrina showed a prevalence of 77.55%, 81.63% and 76.73% respectively, with specificity of 96.7% and 98.9%, sensitivity of 98.9% and 96.3%,  $k=0.956$  and  $k=0.699$  respectively. It can be concluded, through the results obtained, that cELISA-PR1 can have a similar usage as cELISA in diagnostic tests against *A. marginale* during acute infection, serological surveys, and identification of persistently infected cattle. *A. marginale* prevalence was determined in 217 sera samples in 2-year old or older cattle, from the Center-South Region in the State of Paraná: Ponta Grossa, Guarapuava and Laranjeiras do Sul regions; through survey of antibodies IgG class against *A. marginale* through immune-enzymatic assays by cELISA-PR1 competition. From all the cattle sera examined, 130 (58,74%) reacted to cELISA-PR1 test, a significant percentage of animals, being this region of enzootic instability, susceptible to infection by *A. marginale* and development of anaplasmosis. The kind of exploration in the property, the breeding and handling system, the presence of other animals (ovine/caprino, horses, wild animals), and means of commercialization of animals were analyzed. The statistical analysis showed that there were no significant differences among the analyzed variables.

**Keywords:** *Anaplasma marginale*. Cattle. MSP5. Recombinant protein. cELISA. IFI. Comparison. Seroprevalence. Paraná. Prevalence. Sensitivity. *Kappa*.

## LISTA DE TABELAS

### Artigo para publicação 1

- Tabela 1.** Resultados do cELISA-PR1 e IFI com soros de bovinos positivos naturalmente infectados e de área livre de infecção com *A. marginale* frente ao cELISA ..... 49
- Tabela 2.** Resultados do cELISA-PR1 e IFI com soros de bovinos naturalmente infectados com *A. marginale* da região Londrina, Norte do Paraná..... 49
- Tabela 3.** Validação do cELISA-PR1 com os resultados da sorologia de bovinos comparados com a IFI e o cELISA, como teste ouro..... 50

### Artigo para publicação 2

- Tabela 1.** Número de propriedades, número total de bovinos maiores de 24 meses do circuito quatro de produtores do Estado do Paraná (2001), das Regionais de Ponta Grossa, Guarapuava e Laranjeiras do Sul, número de animais e propriedades amostradas pela SEAB-PR ..... 67
- Tabela 2.** Resultados sorológicos de bovinos da região Centro-Sul do Paraná, 2005, obtidos pelo cELISA-PR1 contra rMSP5-PR1 de *Anaplasma marginale* associados com características de exploração submetidos à análise estatística pelos testes Qui, quadrado e *Odds Ratio* ..... 68
- Tabela 3.** Resultados sorológicos de *A. marginale* nos bovinos da região Centro-Sul do Paraná, 2005, associados à presença ou ausência de outras espécies animais na propriedade, sistema de piquete para pastagem à análise estatística pelos testes Qui, quadrado e *Odds Ratio* ..... 69

## LISTA DE FIGURAS

### Artigo para publicação 1

- Figura 1.** Plasmídeo recombinante pRSET/*msp5* visualizado em gel de agarose 1% após clivagem com a enzima de restrição *BamHI* ..... 51
- Figura 2.** Proteína rMSP5 de *A. marginale* purificada sob condições híbridas em coluna de resina de Níquel ..... 52
- Figura 3.** Western blotting da rMSP5-PR1 com anticorpos policlonais de bovinos naturalmente e experimentalmente infectados e de coelho inoculado com rMSP5-PR1 ..... 53
- Figura 4.** Percentagem de inibição observada pelo cELISA-PR1 ..... 54

### Artigo para publicação 2

- Figura 1.** Mapa do Estado do Paraná, demonstrando o circuito produtor e núcleos regionais de Ponta Grossa, Guarapuava e Laranjeiras do Sul da Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SEAB-PR) ..... 70

## SUMÁRIO

<b>1 REVISÃO DA LITERATURA: ANAPLASMA MARGINALE: PROTEÍNAS MAJORITÁRIAS DE SUPERFÍCIE</b> .....	13
1.1 INTRODUÇÃO .....	13
1.2 PROTEÍNAS PRINCIPAIS DE SUPERFÍCIE (MSPs) .....	14
1.2.1. MSP1 .....	15
1.2.2. MSP2 .....	17
1.2.3. MSP3 .....	19
1.2.4. MSP4 .....	20
1.2.5. MSP5 .....	21
1.2.6. Novos Antígenos Protetores .....	22
1.2.7. Filamentos de Actina .....	22
1.3 ALGUNS ASPECTOS DA BIOLOGIA MOLECULAR NA CARACTERIZAÇÃO DA MSP5 .....	22
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	27
2.1 OBJETIVO GERAL .....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO 1</b> .....	28
Padronização e Avaliação de um Teste Imunoenzimático de Competição para o diagnóstico sorológico da anaplasmosse bovina utilizando a proteína recombinante MSP5-PR1 .....	29
Resumo .....	30
Abstract.....	31
Introdução.....	32
Material e Métodos.....	33
Obtenção do DNA de <i>A. marginale</i> e amplificação do gene <i>msp5</i> .....	33
Clonagem e seqüenciamento do gene <i>msp5</i> no vetor pCR4-TOPO TA.....	33
Clonagem do gene <i>msp5</i> no vetor pRSET e expressão da MSP5 recombinante.....	33
Purificação da rMSP-PR1 .....	34
Caracterização antigênica da rMSP5-PR1 pela Técnica de Western-blotting .....	35
Amostras de soro .....	36
Teste de Imunofluorescência Indireta .....	36

Teste de ELISA de Competição .....	36
Avaliação do ELISA de Competição tendo como antígeno a Proteína Recombinante rMSP5-PR1 (rMSP5-PR1) .....	37
Análise Estatística .....	38
Resultados e Discussão.....	38
Seqüenciamento do gene <i>mSP5</i> .....	38
Construção do plasmídio recombinante pRSET/ <i>mSP5</i> .....	38
Expressão e Caracterização Antigênica da Proteína rMSP5-PR1 .....	39
Avaliação do cELISA-PR1 .....	40
Conclusão .....	43
Referências .....	44
<b>4 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO 2</b> .....	55
Soroprevalência de <i>Anaplasma marginale</i> em bovinos da Região Centro-Sul do Estado do Paraná - Brasil por Teste Imunoenzimático Competitivo modificado utilizando proteína recombinante MSP5-PR1 .....	56
Resumo .....	57
Abstract.....	58
Introdução.....	59
Material e Métodos.....	60
Região estudada e amostragem .....	60
Questionário .....	60
ELISA de competição com o antígeno proteína recombinante rMSP5-PR1 .....	60
Análise Estatística .....	61
Resultados e Discussão.....	61
Conclusão .....	63
Referências .....	64
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	71
<b>ANEXOS</b> .....	81
Anexo.1 .....	82
Anexo 2 .....	84

# 1 REVISÃO DA LITERATURA: *ANAPLASMA MARGINALE* PROTEÍNAS MAJORITÁRIAS DE SUPERFÍCIE

## 1.1 INTRODUÇÃO

*Anaplasma marginale* (THEILER, 1910) pertencente à ordem *Rickettsiales*, família Anaplasmataceae (DUMLER, 2001) é transmitido por carrapatos que infectam animais (BIBERSTEIN, 1999). É o principal agente etiológico da anaplasnose bovina que atinge rebanhos em todo mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (KREIER; RISTIC, 1981) causando doença economicamente importante, caracterizada clinicamente por febre, anemia hemolítica, perda de peso, aborto e morte (ALDERINK; DIETRICH, 1981). Bovinos portadores são, com baixos níveis de parasitemia, são fontes de infecção permanente para bovinos susceptíveis (KUTTLER, 1984).

A transmissão desta rickettsia nos bovinos ocorre através de diversas espécies de carrapatos da família *Ixodidae* e numerosas espécies de insetos hematófagos, respectivamente. Outros mecanismos de transmissão da anaplasnose podem ocorrer, como através de instrumentos clínicos e/ou cirúrgicos contaminados com sangue. O carrapato *Boophilus microplus* é considerado o vetor mais importante de *A. marginale* no Brasil e em outras regiões tropicais e subtropicais, enquanto nos EUA a transmissão é realizada por *Dermacentor sp.* A biologia do microrganismo no carrapato ainda é discutida, embora tenha sido encontrado em vários tecidos do vetor (RIBEIRO, 1996; ERIKS; STILLER; PALMER, 1993; RISTIC, 1981; KOCAN, 1995, GUGLIELMONE, 1994).

O ciclo biológico no hospedeiro vertebrado se inicia quando a rickettsia invade os eritrócitos através de um processo de endocitose. O corpúsculo inicial se adere e forma uma invaginação na membrana do eritrócito. Posteriormente o microrganismo invade a célula e permanecendo dentro de um vacúolo. No vacúolo, o corpúsculo inicial se divide por fissão binária formando um corpúsculo de inclusão limitado por uma membrana, possivelmente de origem eritrocítica. Apresenta formação de um a oito corpúsculos intra-eritrocitários periféricos variando entre 0,1 a 0,8  $\mu\text{m}$ , no *Anaplasma centrale* estes são centrais, com menor virulência em bovinos (RISTIC, 1981). Após ser liberado, cada corpúsculo inicial invadirá outro eritrócito, o número de células infectadas dobra dentro de 24 a 48 horas (KREIER; RISTIC, 1981). O período de latência é de três a seis semanas, com

dramaticamente aumento do número de eritrócitos infectados (RISTIC, 1981). A fase aguda caracteriza-se por alta parasitemia, ultrapassando  $10^9$  eritrócitos infectados por mililitro (mL) de sangue (ALLEMAN et al., 1997), chegando a apresentar 75% dos eritrócitos infectados, acarretando anemia severa, quadro que pode persistir por 7 a 14 dias. Os animais ao se recuperarem da fase aguda podem permanecer como portadores sãos, adoecendo raramente e apresentando uma oscilação entre  $<10^{4.3}$  a  $10^7$  eritrócitos infectados por mL de sangue (ERIKS; STILLER; PALMER et al., 1993).

O esfregaço sangüíneo corado pela técnica de Giemsa representa o método de diagnóstico mais amplamente utilizado para detecção da rickettsia dentro do eritrócito. No entanto, não tem se mostrado eficaz em diagnosticar animais infectados com baixa parasitemia. Abordagens moleculares como sondas genéticas (VISSER et al., 1992) e “nested” PCR (reação em cadeia pela polimerase) (TORIONI DE ECHAIDE, 1998) possibilitaram a detecção do microrganismo e/ou de seus componentes celulares em animais durante a fase crônica da doença (ERIKS et al., 1989). O ensaio imunoenzimático por competição (cELISA), utilizando a proteína majoritária de superfície MSP5 do *A. marginale*, altamente conservada nos isolados estudados, tem sido empregado em estudos epidemiológicos e para pesquisar a presença de anticorpos contra *A. marginale* em soro na população bovina em várias regiões geográficas (VIDOTTO et al., 1997).

## 1.2 PROTEÍNAS PRINCIPAIS DE SUPERFÍCIE (MSPs)

A imunização com preparações de membrana externa do isolado Florida de *A. marginale*, analisadas antigenicamente, revelou a presença de antígenos imunoprotetores (TEBELE et al., 1991a). Seis proteínas majoritárias de superfície (MSPs) foram caracterizadas e designadas de MSP1a (105 kDa), MSP1b (100 kDa), MSP2 (36 kDa), MSP3 (86 kDa), MSP4 (31 kDa), MSP5 (19 kDa) (de la FUENTE et al., 2001b; ALLEMAN et al., 1997; BARBET et al., 2001; OBERLE et al., 1993; VISSER et al., 1992).

*A. marginale* apresenta ligações químicas intermoleculares entre as MSPs. MSP2 e MSP5 ocorrem como monômeros e multímeros ligados por pontes de dissulfeto; o complexo MSP1 se apresenta ligado por pontes de dissulfeto e associado de forma não covalente a MSP1a e MSP1b, e MSP2; MSP5 está associada de forma não covalente a MSP1.

MSP1, MSP2, MSP3 e MSP4 estão muito próximas e MSP5 está associada de forma não covalente com este complexo de ligações cruzadas (VIDOTTO et al., 1994).

### 1.2.1 MSP1

A proteína MSP1 foi identificada e caracterizada no isolado de *A. marginale* Flórida como um complexo protéico formado por MSP1a (105 kDa) e MSP1b (100 kDa). Estas proteínas induzem resposta protetora em bovinos, têm sido descritas como adesina para eritrócitos bovinos e células de carrapato (de la FUENTE et al., 2003; McGAREY et al., 1994a; OBERLE et al., 1988).

MSP1a é codificada por uma cópia simples do gene (*msp1 $\alpha$* ), geneticamente estável na infecção aguda, infecção persistente, na multiplicação em carrapatos. Está envolvida nos mecanismos de transporte de nutrientes, adesão e invasão aos eritrócitos e contribui para imunidade na infecção em bovinos. O polimorfismo genético da MSP1a entre os isolados de *A. marginale* é verificado no número de cópias da seqüência gênica codificadora para a proteína, presença de diferentes números de repetições, gene de uma simples cópia e é invariável dentro da espécie. A amplificação pela PCR do gene *msp1 $\alpha$*  de nove isolados dos Estados Unidos resultou em fragmentos com número variável de repetições, variando de duas no isolado Virgínia a oito no isolado Flórida (BOWIE et al., 2002; BROWN et al., 2001a; de la FUENTE; VAN DER BUSSCHER; KOCAN, 2001b; McGAREY et al., 1994a; BARBET et al., 1987).

No Brasil foram analisados isolados de *A. marginale* identificados com três, cinco e seis repetições de aminoácidos (VIDOTTO et al., 2006). Assim, têm se empregado estas repetições de aminoácidos de MSP1a como marcador genético estável de isolados de *A. marginale* de diferentes regiões geográficas. *A. marginale* apresentou variação genética entre diferentes isolados em análise de polimorfismos no comprimento de fragmento de restrição (RFLP), de padrões de PCR REP/ERIC, de PCR baseado em repetições sucessivas de seqüências de aminoácidos específicas de MSPs e seqüência de proteína (de la FUENTE et al., 2004; FERREIRA et al., 2001; de la FUENTE; VAN DER BUSSCHER; KOCAN, 2001b).

A MSP1a foi identificada como o maior componente imunogênico do complexo MSP1 protetor ao reagir com linfócitos-T CD4<sup>+</sup>. Foi observada proliferação

vigorosa de células mononucleares do sangue periférico e linhagens de linfócitos-T em bezerros imunizados com MSP1, em resposta à imunização com os isolados Flórida e isolados heterólogos de *A. marginale*. A resposta imune específica é direcionada contra a região C-terminal da MSP1a, que se apresenta altamente, promovendo forte indução de memória proliferativa de linfócitos-T CD4<sup>+</sup> e resposta de INF $\gamma$  em bovinos com presença de halotipos classe II do complexo de histocompatibilidade, sugerindo que se possa incluir epitopos linfócitos T da região C-terminal da MSP1a em vacinas (BROWN et al., 2001a; de la FUENTE et al., 2001a).

A MSP1a está presente nos isolados Flórida, Idaho, Norte do Texas, Virgínia, Washington (OBERLE, et al., 1988), mas não no isolado de Zimbabwean (TEBELE; PALMER, 1991b). Os isolados brasileiros de *A. marginale* apresentaram MSP1a na caracterização antigênica demonstrada por anticorpos monoclonais (OLIVEIRA et al., 2003; KANO et al., 2002). A amplificação e o seqüenciamento do gene *mSP1 $\alpha$*  têm contribuído para a caracterização dos isolados de diferentes países, observando massa molecular e diferente número de repetições de amino ácidos, assim como a amplificação de regiões de repetição do *A. centrale* ou *A. ovis* (de la FUENTE et al., 2002; LEW et al., 2002).

Bovinos imunizados com MSP1 do isolado Flórida e desafiados com o isolado heterólogo WASHINGTON-O desenvolveram proteção cruzada contra *A. marginale*, apesar da variação de tamanho da MSP1a entre os isolados (PALMER et al., 1989). A imunidade protetora está associada com o desenvolvimento de opsonização, anticorpos neutralizantes (BROWN et al., 2001a) adesinas, neutralizando a invasão celular no hospedeiro, sugerindo que estas adesinas atuem na hemaglutinação de eritrócitos de bovinos (McGAREY e ALLRED, 1994).

A MSP1b é codificada pelos genes *mSP1 $\beta$ 1* e *mSP1 $\beta$ 2*, família multigênica com fragmentos de restrição múltiplos apresentando uma variação de aproximadamente de 3kDa entre diferentes isolados americanos. Os isolados Flórida e Oklahoma apresentaram estes genes conservados com identidade em 96% para a *mSP1 $\beta$ 1* e 92% para *mSP1 $\beta$ 2*, sugerindo seu emprego na produção de vacinas (BOWIE et al., 2002; BARBET e ALLRED, 1991; OBERLE et al., 1988), porém estudos empregando imunização de bovinos com vacinas de DNA (pcDNA3.1/MSP1b), utilizando o isolado Jaboticabal de *A. marginale*, apresentou proteção parcial contra desafios homólogos (ANDRADE et al., 2004)

Recentemente foram identificados três genes *mSP1 $\beta$*  completos no isolado Flórida, cada um codificando uma única proteína MSP1b, estruturalmente identificada

durante a fase aguda da rickettsemia (CAMACHO-NUEZ et al., 2000). MSP1b presente nos isolados brasileiros estudados reagiu com o anticorpo monoclonal específico identificando o isolado Flórida e os isolados brasileiros Minas Gerais e PR-L1 (KANO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003).

### 1.2.2 MSP2

A proteína MSP2 (36kDa) se mostrou conservada nos estágios de infecção em eritrócitos e carrapatos, sendo codificada por uma família polimórfica. A localização de MSP2 e das MSP1a e MSP1b na superfície eritrocítica atuam na hemaglutinação de eritrócitos bovinos. O gene polimórfico *mSP2*, transcrito por substituições múltiplas de aminoácidos, inserções e deleções definidas por seqüências de transcrição de *mSP2* expressas, codifica MSP2 estruturalmente distintas, resultando numa população de *A. marginale* no sangue bovino em contínua mudança, caracterizada por ciclos de rickettsemia persistente (FRENCH et al., 1998; PALMER et al., 1994; McGAREY; ALLRED, 1994; PALMER et al., 1985).

Os carrapatos se infectam com *Anaplasma* spp ao se alimentarem, e variantes MSP2-específicas são selecionadas e expressas no intestino e na glândula salivar. A pressão de seleção de *A. marginale* ocorreria nas glândulas salivares do carrapato, onde variantes limitadas são expressadas, independente da resposta imunológica do bovino e de variantes presentes no sangue de animais infectados, quando da alimentação dos carrapatos. A expressão diferencial de proteínas de membrana externa no operon foi observada na bactéria transmitida por carrapato e a regulação da expressão pode ser amplamente aplicada no conhecimento da adaptação do patógeno na transição hospedeiro-carrapato. Maiores seqüências de variantes ocorrem em infecções persistentes em bovinos (LÖRH et al., 2002a; 2002b; de la FUENTE et al., 2001c; RURANGIRWA et al., 1999; BARBET et al., 2001).

Uma região hipervariável da MSP2, de cerca de 100 aminoácidos, codifica epitopos imunogênicos de linfócitos-B indutores de anticorpos variante-específicos, apresentando variação antigênica em um mesmo ciclo da infecção aguda, compatível com o polimorfismo em cada ciclo durante a rickettsemia, levando a *A. marginale* persistente (BARBET et al., 2001; FRENCH; BROWN; PALMER, 1999; 1988; EID et al., 1996).

A proteína MSP2 purificada do isolado Flórida de *A. marginale* induziu proteção homóloga e heteróloga ao isolado Washington-O, promovendo prevenção completa a retardo significativo do início da rickettsemia. Bovinos imunizados com membrana externa com saponina como adjuvante, foram protegidos contra desafio homólogo e estimularam produção de títulos elevados de IgG2, linhagens de células T CD4<sup>+</sup>, linfócitos-T produtores de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e mononucleares no sangue periférico. Epitopos de linfócitos-T conservados em diferentes isolados de *A. marginale*, incluindo pelo menos MSP2 e MSP3, poderiam ser mapeados para sua utilização em vacinas (BROWN et al., 1998a, 1998b PALMER et al., 1988a).

A região hipervariável da MSP2, entre terminais amino e carboxil altamente conservados, apresenta variante de epitopos de linfócitos-B. Peptídeos imunodominantes induziram a produção de altos níveis de IFN- $\gamma$ , citocina associada à proteção contra ehrlichia, necessária para rápida geração de IgG2 variante-específica, onde os ciclos de rickettsisemia são controlados a níveis 100 a 1000 vezes menores que aqueles responsáveis pela doença clínica durante a fase aguda (BROWN et al., 2003, 2001b).

A esta região hipervariável da proteína MSP2 contem seqüências de epitopos imunogênicos a linfócitos-T CD4<sup>+</sup>, levando à variação extensa e dinâmica na seqüência de aminoácidos durante a rickettsisemia, através da recombinação de pseudogenes de *msp2* no sítio de expressão, seguida por conversão do segmento seqüencial do gene produzindo variantes adicionais, acarretando mudanças no reconhecimento do epitopos de célula T na região hipervariável. Linfócitos-T CD4<sup>+</sup> MSP2-específicos reconheceram epitopos comuns a vários isolados de *A. marginale* e *A. ovis*. A variação antigênica em epitopos de células-B e -Th pode contribuir no mecanismo de evasão imune, permitindo a persistência de *A. marginale* por longos períodos em reservatórios mamíferos. *A. centrale* causa anaplasmoose branda, possui polipeptídeos de 33-39 kDa, presentes em *A. marginale* e apresentam imunodominância e reatividade cruzada nestes epitopos compartilhados, podendo ser responsáveis pela imunidade protetora cruzada entre isolados estudados (BROWN et al., 2003, 2001b; SHKAP et al., 1991; PALMER et al., 1988a, 1988b).

*A. marginale* e *A. centrale* possuem pelo menos quatro epitopos de linfócitos-T CD4<sup>+</sup> conservados, e desafios com *A. marginale* desencadeiam resposta de linfócitos-T CD4<sup>+</sup> induzidas por vacinação com *A. centrale*. A organização genômica é conservada entre as duas espécies com múltiplos pseudogenes e um sítio de expressão ligado ao operon pelo gene *msp2*, demonstrando possuírem epitopos MSP2 similares justificando a resposta do sistema imune e a eficácia da vacina com *A. centrale* (SHKAP et al., 2002).

Imunidade protetora requer indução de IFN- $\gamma$  e opsonização de subclasses de IgG contra os epitopos que ativam macrófagos para fagocitose e eliminam o invasor. Interleucina (IL-2) atua como adjuvante para MSP2 e, co-adsorvida com alumínio, estimulou resposta de IFN- $\gamma$  e linhagens de linfócitos-T CD4<sup>+</sup> em bovinos imunizados, pela alta resposta proliferativa por macrófagos com alta resposta de IgG, predominantemente IgG1 (TUO et al., 2000).

### 1.2.3 MSP3

A proteína MSP3 (86 kDa) é proteína codificada por família de multigenes com polimorfismos estrutural e antigênico entre isolados de *A. marginale*, podendo variar antigenicamente em animais portadores sãos. MSP3 foi identificada nos isolados americanos Virgínia, Missouri, Mississippi, Washington-O, Idaho e Flórida (de la FUENTE; VAN DER BOSSCHER; KOCAN., 2001b; ALLEMAN et al., 1997; McGUIRE et al., 1991).

MSP3 é reconhecida em todos os estágios da infecção, detectada em isolados de oito regiões geográficas em portadores sãos durante cerca de cinco anos, podendo ser utilizado como antígeno em diagnóstico sorológico, mas não em testes com antígeno recombinante devido ao polimorfismo apresentado. Soro de animais infectados por *A. ovis*, *Ehrlichia risticii* e *E. ewingii* apresentaram reação cruzada com MSP3. Polimorfismo antigênico foi observado entre isolados de *A. marginale* de diferentes regiões geográficas (ALLEMAN; BARBET, 1996; McGUIRE et al., 1991; PALMER et al., 1986).

Estudos de hibridação utilizando sondas de *msp3-12* identificaram antígenos múltiplos de MSP3 resultado de um complexo similar a MSP2, devido à presença de família multigênica de genes parcialmente homólogos. O gene *msp3* codifica blocos de aminoácidos relacionados a produtos polimórficos da família multigênica MSP2, parcialmente responsáveis pela variação da MSP3 em portadores sãos, variando importantes proteínas de superfícies do *A. marginale*. Estudos com imunização em bovinos utilizando proteínas de membrana externa estimularam resposta de células mononucleares do sangue periférico, induzindo proteção parcial, sendo reconhecidos por linfócitos-T (BROWN et al., 1998a; ALLEMAN et al., 1997).

MSP2 e MSP3 apresentam pseudogenes capazes de recombinar no sítio de expressão funcional gerando novas variantes antigênicas, que permitiriam às duas famílias de genes agir sinergicamente na evasão da resposta imune do hospedeiro (BRAYTON et al.,

2001), também identificada em *A. ovis* (PALMER et al., 1998), mas insuficiente para gerar número de variantes necessário para infecção persistente. Um segundo nível de variação permite pequenos segmentos se recombinarem no sítio de expressão por conversão gênica (BRAYTON et al., 2002). Essa variação genética, durante a anaplasmosose persistente, pode explicar a ausência de reatividade do anticorpo monoclonal específico nos isolados de São Paulo e Minas Gerais, Pernambuco-Sertão e Pernambuco-Agreste (KANO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003).

As MSPs de *A. marginale* estão presentes em fase eritrocítica e podem ser estruturalmente conservadas durante o cultivo contínuo, são fontes valiosas de rickettsias para pesquisa desenvolvimento de reagente de diagnóstico e vacinas contra anaplasmosose. MSP 1, 2, 4, 5 do isolado Oklahoma se mostraram conservadas, mas há evidências de que ocorra variação estrutural em MSP3 entre o isolado cultivado e do estágio eritrocítico de *Anaplasma* (BLOUIN et al., 2000; BARBET et al., 1999).

No Brasil, os isolados Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul Pernambuco-Zona da Mata, Pernambuco-Agreste, Pernambuco-Sertão, Mato Grosso do Sul foram testados com anticorpos monoclonais específicos para o isolado Flórida de *A. marginale* sendo observado que a proteína MSP3 foi identificada apenas no isolado Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2003; KANO et al., 2002).

#### 1.2.4 MSP4

A proteína MSP4 (31 kDa) é codificada com única cópia gênica altamente conservada em isolados de diferentes regiões geográficas (Flórida, South Idaho, Missouri, Washington-O, Washington –C e Zimbabwe), estando presente na membrana externa e interna do *A. marginale*. O gene *msp4* apresenta identidade com o gene da proteína MAP-1 de *Cowdria ruminantium*, da proteína de 30 kDa de *E. canis* e p28 de *E. chaffeensis* (OHASHI et al., 1998; VLIET et al., 1994; OBERLE et al., 1993; PALMER, McGUIRE, 1984).

MSP4 tem apresentado imunidade protetora similar à MSP2, sugerindo que as MSPs apresentam seqüências com identidade altamente significativa responsáveis pela resposta imune protetora, antigenicamente polimórficas. A fração de membrana apresenta epitopos antigênicos, pois estimulou a resposta imune de bovinos e os protegeu frente a desafio virulento. MSP4 apresentou-se conservada nos isolados brasileiros estudados

(OLIVEIRA et al., 2003; KANO et al., 2002; PALMER et al., 1994; OBERLE; PALMER; BARBET, 1993).

### 1.2.5 MSP5

A proteína MSP5 (19 kDa) é conservada e apresenta uma única cópia gênica altamente conservada entre isolados de diferentes regiões geográficas. Apresenta-se na forma monomérica e dimérica, com pontes de dissulfeto intermoleculares, na membrana de *A. marginale*. A conservação do tamanho, a localização no corpúsculo inicial na membrana externa, a presença de MSP5 em todos os isolados de *Anaplasma* testados, incluindo *A. ovis*, sugerem que MSP5 é importante no ciclo de vida do *Anaplasma* (VIDOTTO et al., 1994; OBERLE; PALMER; BARBET, 1993; VISSER et al., 1992).

A proteína MSP5, utilizada na imunização de bovinos, induziu a produção de altos títulos de anticorpos, que não protegeram contra o desafio com *A. marginale* virulento, porém induziu imunidade contra a doença clínica. O epítipo da MSP5 é reconhecido pelo anticorpo monoclonal específico ANAF16C1, que requer regiões terminais amino e carboxil, indicando sua natureza conformacional nativa (MUNODZANA et al., 1998; PALMER; McELWAIN, 1995; VISSER et al., 1992).

O reconhecimento do epítipo da MSP5 pelo linfócito-B, apresentou-se conservado no anticorpo monoclonal ANAF16C1, sendo este utilizado no teste imunoenzimático de inibição competitivo (cELISA), mostrando-se capaz de detectar anticorpos contra *A. ovis* e *A. marginale*, inclusive em bovinos portadores sãos, demonstrando alta sensibilidade e especificidade. A performance do cELISA, utilizando MSP5 recombinante como antígeno foi avaliada analisando o status dos animais positivos e negativos verdadeiros selecionados por nested PCR (nPCR), teste capaz de detectar cerca de 30 eritrócitos infectados por mL, identificando baixos níveis de parasitemia em animais persistentemente infectados e pelo seqüenciamento do isolado de *A. marginale* demonstrou identidade maior que 95% em amostras amplificadas, no seqüenciamento de *msp5* e da hibridação. O nPCR juntamente com a hibridação identificaram os animais infectados e não infectados testados para o padronização do cELISA (TORIONI de ECHAIDE et al., 1998; KNOWLES et al., 1996; NDUNG'U et al., 1995; VISSER et al., 1992).

MSP5 mostrou-se conservada em todos os isolados de diferentes regiões estudados, como nos brasileiros estudados. Assim, estudos epidemiológicos e imunológicos revelaram que a proteína MSP5, em particular, apresenta características antigênicas que possibilitam seu emprego como antígeno nos ensaios de diagnóstico de anaplasmoose bovina, conferindo sensibilidade e especificidade aos testes (OLIVEIRA, et al., 2003; KANO et al., 2002; KNOWLES et al., 1996; VIDOTTO; MARANA, 1999).

### **1.2.6 Novos Antígenos Protetores**

Outras proteínas de membrana com a característica de antígenos foram relatadas, cujas frações são Ana 17, Ana 29, Ana 32, Ana 37 e Ana 43, com pouca variação na massa molecular e alto ponto isoelétrico, acima de 7.8 (RIDING et al., 2003).

### **1.2.7 Filamentos de Actina**

*A. marginale*, ao infectar eritrócitos, apresenta apêndices de F-actina na superfície citoplásmica de vacúolos contendo vários organismos, os quais tiveram as seqüências de aminoácidos e nucleotídeos mapeadas no genoma do isolado Saint Maries, e sua identificação confirmada pela expressão de proteína recombinante e sua reatividade através de anticorpo monoclonal específico para o apêndice. Influencia o ciclo de invasão, replicação e saída da célula hospedeira pode levar a nova invasão na interação parasito-hospedeiro (STICH et al, 2004).

## **1.3 ALGUNS ASPECTOS DA BIOLOGIA MOLECULAR NA CARACTERIZAÇÃO DA MSP5**

A busca de vacinas que promovam uma imunização eficiente e duradoura levou os pesquisadores a técnicas de biologia molecular e novas técnicas de cultivo da rickettsia para maior compreensão do processo imunológico. Metodologias bastante

diversificadas para obtenção de proteínas antigênicas do *A. marginale* têm sido utilizadas (BROWN et al, 2003; WAGHELA et al., 2000; KOCAN et al., 2001; VISSER et al., 1992; KNOWLES et al., 1996; STICH et al., 2004; PALMER; McELWAIN, 1995; OBERLE et al, 1988).

A biblioteca genômica do isolado da Flórida de *A. marginale* foi construída com o vetor de inserção  $\lambda$ ZAP (Stratagene Cloning Systems) (SAMBROOK; FRITSCHI; MANIATIS, 1989) clivado com *EcoRI*. A biblioteca lambda foi testada em *E. coli* Y1090 com anticorpo monoclonal ANAF19C1 em Imunoblotting, identificando clones contendo as proteínas recombinantes, sendo isolados, analisados e inseridos em plasmídios recombinantes. As bactérias transformadas foram induzidas com isopropil-1- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), avaliadas por Imunoblotting e seqüenciamento. O gene *msp5* (1.1 kb) foi obtido da subclonagem do plasmídio recombinante pAM104 de 2,3 kb em pBLUEscript. Célula competente de *E. coli* XL1-Blue transformadas com pBLUE/*msp5* expressou a proteína MSP5, reativa ao anticorpo monoclonal. A similaridade na reação antigênica entre MSP5 nativa dos isolados de *A. marginale* Mississipi, Washington-O, North Texas, Missouri, Florida, Washington-C, South Idaho, Virginia e Israel, *A. centrale*, *A. ovis* e a recombinante foi testada por adsorção com soro de bovino imune. Um teste de ELISA de competição foi padronizado e detectou a presença de anticorpos de soros bovinos com reatividade para epítopos de MSP5 reconhecidos por anticorpo monoclonal ANAF16C1 (VISSER et al., 1992).

MSP5 recombinante (rMSP5) foi empregada em cELISA com soros de caprinos detectando anticorpos contra *A. ovis* em animais com rickettsemia, portadores sãos e animais positivos do Kênia e dos Estados Unidos. A expressão do *msp5* do isolado Florida clonado em pBluescript através do plasmídio pAM104A foi obtida em *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, Calif.) transformada. A rMSP5 foi observada pela reatividade com o anticorpo monoclonal ANAF16C1, através de Imunoblotting. A adsorção das placas de ELISA foi com o lisado de bactérias com MSP5 titulado com ANAF16C1 (NDUNG'U et al., 1995; VISSER et al., 1992)

O cELISA com antígeno rMSP5 (19 kDa) foi utilizado na detecção de anticorpos contra *A. marginale* de carrapatos, estágios eritrocítico, bovinos portadores sãos, e Imunoblotting em material colhido de glândulas salivares de carrapato dissecadas, após alimentação em bovinos. O gene *msp5*, amplificado pela PCR, do clone pAM104A, foi clivado no sítio *XbaI* do vetor de expressão pMAL-c2, criando o plasmídio recombinante pMAL*msp5*, transformando *Epicurian coli* XL1-Blue competentes (Stratagene, La Jolla,

CALIF.). A colônia transformada contendo o plasmídeo na posição correta foi identificada pela clivagem do plasmídeo com *EcoRI*. A MSP5-ligada-a-maltose (rMSP5-MBP) fusionada com 67 kDa (43 kDa de MBP e 19 kDa da MSP5) expressada presente no sobrenadante obtido pela lise celular, foi purificada por afinidade pela resina de amilose. A rMSP5-MBP foi identificada pelo anticorpo monoclonal ANAF16C1-específico para MSP5 (KNOWLES et al., 1996).

O cELISA determinou a porcentagem de inibição, a partir da média das densidades ópticas dos soros de bovinos negativos testados, obtidas em leitor de ELISA, subtraída de três desvios padrão, representando 25% de inibição, quando o anticorpo monoclonal ANAF16C1 anti-rMSP5 marcado com peroxidase se liga diretamente a rMSP5 adsorvida. Foram considerados positivos os soros com 25% de inibição ou mais. A ligação do ANAF16C1 com o epitopo da rMSP5-MBP leva a alta especificidade, detectando animais inoculados intravenosamente com a rMSP5 e anticorpo anti-rMSP5 em glândula salivar de carrapatos infectados. Animais inoculados com  $10^3$  eritrócitos parasitados com rickettsemia detectável apresentaram inibição  $\geq 25\%$  pelo anticorpo monoclonal 17 a 27 dias após a inoculação, enquanto a rickettsemia com  $\geq 0,1\%$  de eritrócitos parasitados foi detectável a partir de 22 a 31 dias após a inoculação (KNOWLES et al., 1996).

O nPCR e cELISA, usando rMSP5-MBP, foram avaliados na detecção de bovinos infectados naturalmente com *A. marginale*, avaliando a sensibilidade e especificidade do teste cELISA. A seqüência de *mSP5* do isolado Florida foi utilizada no nPCR, usando kit comercial (PCR Máster Boehring Mannheim). Uma banda de 458 bp era esperada depois do PCR e outra de 345 bp para nPCR. O seqüenciamento foi analisado para avaliação do grau de identidade das amostras de *A. marginale* em bovinos naturalmente infectados, sendo randomizado o tamanho de 345 bp obtido pela PCR. A prova de hibridação empregou sonda de 294 bp com a seqüência para o nPCR 345 bp. Estes testes validaram os resultados do cELISA com rMSP5-MBP de *A. marginale*. O índice de parasitemia de  $10^{2.5}$  e  $10^7$  eritrócitos infectados por cinco a seis semanas foi avaliada para se verificar a detecção portadores são pelo cELISA (TORIONI DE ECHAIDE et al., 1998; KNOWLES et al., 1996; VISSER et al., 1992).

O cELISA empregando o substrato *o*-fenilenediamina di-hidroclorídrico (OPD–SIGMA P-6912) para 3,5,3',5' tetramethylbenzidine (TMB), e a concentração da proteína recombinante de 5,0  $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$  de rMSP5-MBP foi comparado com o teste de aglutinação do cartão apresentando alta sensibilidade e especificidade. (MOLLOY et al., 1999).

A rMSP5 do isolado Táchira da Venezuela de *A. marginale* foi utilizada em teste de ELISA indireto. Amplificado pela PCR a partir da seqüência de bases apresentada por Visser et al. (1992), o produto foi inserido no plasmídio pCRII (TA cloning kit Invitrogen®), obtendo o plasmídio pAR1902 que transformou a célula competente *E. coli* INVαF' (TA cloning kit Invitrogen®). A orientação do inserto relativa ao promotor  $P_{trc}$  (*trp-lac*) foi certificada após clivagem enzimática com *SspI* e *XhoI*. O fragmento do plasmídio foi clivado por *KpnI-XhoI* e inserido no vetor pTrcC (Xpress System; Invitrogen®) obtendo o plasmídio pAR1903, que transformou a *E. coli* JM109 competente (Promega, Madison, Wis), induzida por IPTG para expressão da rMSP5, proteína recombinante fusionada a seis moléculas de histidina (6xHis) na porção N-terminal., purificada sob condições desnaturantes em cromatografia por afinidade a metal imobilizado com resina Probond® e reconhecida pelo anticorpo monoclonal ANAF16C1 anti-MSP5. O ELISA indireto utilizou como tampão de adsorção Tampão Salina Fosfatada pH 7,2, tampão de bloqueio com leite desnatado a 5%, e 3,5,3',5' tetramethylbenzidine (TMB) como substrato, apresentando bons resultados. (REYNA-BELLO et al., 1998).

A clonagem e expressão do gene *msp5* do isolado brasileiro Pernambuco-Zona da Mata de *A. marginale* foi realizada pela extração do DNA com o kit Easy DNA (Invitrogen®), com adição de adenosina à extremidade 3' do produto de PCR pela enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®). O produto amplificado inserido ao vetor pTrcHis-TOPO (Invitrogen®), com extremidade ativada pela Topoisomerase I, transformou a *E. coli* TOPO (Invitrogen®) competente para expressão da rMSP5. MSP5 foi purificada por eletroeluição, resultando em uma proteína majoritária de cerca de 22 kDa, identificada pelo anticorpo monoclonal ANAF16C1 (ARAÚJO et al., 2002).

Outros vetores têm sido usados para a construção de plasmídios empregados em pesquisas relacionadas com a produção de proteína recombinante MSP5 de *A. marginale*, como pET101, pQE30, pRSETB.

O vetor pET direcional TOPO® (Invitrogen®) de expressão é de alta atividade e especificidade, conferida pelo bacteriófago T7 RNA polimerase, permite a regulação de genes heterólogos em *E. coli*. A topoisomerase I, do vírus *Vaccinia*, liga-se à fita dupla de DNA em sítios específicos e cliva o DNA em uma das fitas após 5'-CCCTT, e une a fita dupla de DNA usando TOPO® carregada com oligonucleotídeos ao final da fita simples 3', possibilitando ligar o produto da PCR com terminação CACC à terminação GTGG do vetor, que apresenta cauda 6xHis, permite purificação em resina ligada ao níquel. O plasmídio transforma a *E. coli* TOP10 competente, que não apresenta T7 RNA polimerase, permitindo a

caracterização da construção, propagação estável e manutenção do plasmídio. O plasmídio transforma a *E. coli* BL21 Star (DE3) competente para a expressão de genes regulados por T7, que apresenta  $\lambda$ DE3 lisogênico, com gene *lacI* codificando o lac repressor, T7 RNA polimerase está sob controle do promotor *lacUV5*, e pequena porção do gene do *lacZ*, sob a indução de IPTG *coli* (CHENG, SHUMAN, 2000; SHUMAN, 1991; STUDIER et al., 1990; ROSEMBERG et al., 1987; STUDIER; MOFFATT, 1986).

O vetor pQE (Qiagen®) de alto nível de expressão de proteínas em *E. coli*, apresenta o *lac* repressor carregado pelo plasmídio pREP4, cresce em meio seletivo contendo kanamicina, e é inibido por baixa concentração de IPTG. O vetor com promotor fago T5 e duas seqüências de *lac* operador, sítio de ligação ribossômico sintético para reconhecimento e ligação, sítio múltiplo de clonagem, código de parada apresenta o terminador transcricional 't' do fago lambda e região de replicação e o gene para  $\beta$ -lactamase do plasmídio pBR322. Possui cauda 6xHis e N-terminal permitindo purificação em resina ligada ao níquel, (JANKNECHT et al., 1991; BUJARD et al., 1987; SCHWARZ et al., 1987; SUTCLIFFE, 1979; FARABAUGH, 1978).

O vetor pRSET, com alto nível de expressão e purificação de proteína, proporciona clonagem em fase com peptídeo N-terminal, apresenta promotor T7, o sítio de T7 reverso permite o sequenciamento do inserto, o T7 de terminação permite transcrição de terminação eficiente, apresenta sítio de múltipla clonagem que torna eficiente a translação do gene de interesse, com sítio de iniciação ATG para fusão da proteína, apresenta cauda de histidina H-terminal que permite purificação em resina ligada ao níquel, a seqüência 10 do gene T7 proporciona estabilidade á proteína expressada. Permite seleção com ampicilina pela expressão do gene da resistência. *E. coli* TOP 10 transformada permite estabilizar o plasmídio evitando a toxicidade a *E. coli* BL21 Star (DE3), que vai expressar a proteína de interesse (AUSUBEL et al., 1998).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Produzir a proteína recombinante MSP5 a partir do isolado PR1 de *A. marginale* e utilizá-la no diagnóstico sorológico pelo teste imunoenzimático.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Clonar e produzir a proteína majoritária de superfície MSP5 recombinante a partir de plasmídeo recombinante pRSET<sub>B</sub> / *msp5*.
2. Padronizar um ELISA de competição.
3. Avaliar a sensibilidade e especificidade deste teste frente a soros de campo.

**3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO 1**

**Padronização e Avaliação de um Teste de ELISA competitivo para o diagnóstico da anaplasmoze bovina utilizando a Proteína Recombinante MSP5-PR1**

**Elizabete Regina Marangoni Marana<sup>1</sup>, Flora Satiko Kano<sup>1</sup>, Alexandre Camargo Ataliba<sup>1</sup>, Josy Campanhã Vicentini<sup>1</sup>, Rafael Sanches Spurio<sup>1</sup>, Marilda Carlos Vidotto<sup>2</sup>, Odilon Vidotto<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Veterinária de Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

<sup>2</sup> Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

\* Autor para correspondência: O. Vidotto, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, PR. Tel.: (43) 3371 4485. E-mail: vidotto@uel.br

## RESUMO

O isolado PR1 de *Anaplasma marginale* foi caracterizado antígenicamente e contribuiu para identificação de MSP5, conservada nos isolados *A. marginale* estudados. Foi utilizada a proteína MSP5 recombinante (rMSP5) do isolado PR1 de *Anaplasma marginale*, expressa pelo plasmídeo pRSET B/*msp5* em *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) One Shot (Invitrogen®), no desenvolvimento de um ELISA competitivo para diagnóstico sorológico de bovinos com anaplasmoze. O seqüenciamento demonstrou 98% de identidade com os isolados Florida e Saint Maries, 97% com os isolados Brasil-Pernambuco e Havana e 91% com *Anaplasma centrale*. A rMSP5-PR1 foi reconhecida pelo anticorpo monoclonal ANAF16C1 em Western Blotting. O cELISA-PR1 e a IFI foram comparados com o cELISA analisando 283 soros de bovinos, sendo 135 soros negativos da região de Santa Vitória do Palmar, RS, e 147 soros positivos de bovinos naturalmente infectados com *A. marginale* da região de Londrina, Norte do Paraná, apresentando 100,0% e 99,3% de especificidade, 100,0% e 98,0% de sensibilidade,  $k=0,993$  e  $k=0,978$ , respectivamente. Na comparação do cELISA-PR1 e IFI com cELISA, analisando 245 soros de bovinos naturalmente infectados com *A. marginale* da região de Londrina obteve-se prevalência de 77,55%, 81,63% e 76,73% respectivamente, com especificidade de 96,7% e 98,9%, sensibilidade de 98,9% e 96,3%,  $k=0,956$  e  $k=0,699$ , respectivamente. Concluímos, através dos resultados obtidos, que o cELISA-PR1 pode ter emprego similar ao cELISA em testes de diagnóstico contra *A. marginale* durante a infecção aguda, levantamentos sorológicos e identificação de animais portadores sãos.

**Palavras chave:** *A. marginale*. rMSP5. cELISA. IFI. Comparação. Prevalência. Sensibilidade, *Kappa*.

## ABSTRACT

A modified competitive ELISA test was developed for the serological diagnosis of cattle with anaplasmosis using recombinant MSP5 protein (rMSP5) from PR1 isolate of *Anaplasma marginale*, expressed by the plasmid pRSET B/*msp5* in *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) One Shot (Invitrogen®). The antigenic characterization of the PR1 isolate from *Anaplasma marginale* contributed to the identification of MSP5, preserved in all the isolates of *A. marginale* studied. The sequencing showed 98% identity with the isolates Florida and Saint Maries, 97% with isolates Brasil-Pernambuco and Havana; and 91% with *Anaplasma centrale*. The rMSP5-PR1 was recognized by the monoclonal antibody ANAF16C1 in Western Blotting. The cELISA-PR1 and IFI were compared with cELISA by analyzing 283 cattle sera, being 135 negative sera samples from Santa Vitória do Palmar region, RS, and 147 positive sera samples from cattle naturally infected with *A. marginale* from Londrina region, North of Paraná. These samples presented specificity of 100.0% and 99.3%, sensitivity of 100.0% and 98.0%,  $k=0.993$  e  $k=0.978$  respectively. In the comparison of cELISA-PR1 and IFI with cELISA, the analysis of 245 sera samples from cattle naturally infected with *A. marginale* in the region of Londrina showed prevalences of 77.55%, 81.63% and 76.73% respectively, with specificity of 96.7% and 98.9%, sensitivity of 98.9% and 96.3%,  $k=0.956$  and  $k=0.699$  respectively. It can be concluded, through the results obtained, that cELISA-PR1 can be used likewise cELISA in diagnostic tests for *A. marginale* during acute infection, serological surveys, and identification of persistently infected cattle.

**Key words:** *A. marginale*. rMSP5. cELISA. IFI. Prevalence. Specificity. Sensitivity. Kappa.

## 1. Introdução

*Anaplasma marginale* é uma bactéria hemotrófica da ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae (DUMLER et al., 2001), agente etiológico da anaplasmosse bovina, ocorrendo principalmente em regiões tropicais e subtropicais (KREIER; RISTIC, 1981). O carrapato *Boophilus microplus* é o vetor mais importante do *A. marginale* no Brasil e em outras regiões tropicais e subtropicais. Este causa perda de peso, aborto, redução da produção leiteira e mortalidade, animais recuperados usualmente permanecem infectados servindo como reservatório da doença a animais susceptíveis. A anaplasmosse acarreta grandes perdas econômicas na bovinocultura de carne e de leite com prejuízos da ordem de 500 milhões de dólares anualmente (GRISI et al., 2002; ERIKS; STILLER; PALMER, 1993; ALONSO et al. 1992; KESSLER et al., 1992; PALMER, 1989).

Vários testes sorológicos foram avaliados para a pesquisa de anticorpos contra *A. marginale* em estudos epidemiológicos, entre eles a Fixação de Complemento, Aglutinação pelo Látex, Imunofluorescência Indireta (IFI), Ensaio Imunoenzimático (ELISA), ELISA por competição (cELISA) (OIE, 2004; KNOWLES et al., 1996; NIELSEN et al., 1996; GOFF; WINWARD, 1983; ROSE et al. 1978; AMERAULT; ROSE; ROBY, 1972). Alguns estudos, em diferentes estados do Brasil, foram realizados para estabelecer a prevalência da anaplasmosse, que variou entre 12,3 a 100% (VIDOTTO et al., 1998; MADRUGA et al., 1994; OLIVEIRA et al., 1992).

*A. marginale* possui em sua membrana externa seis proteínas majoritárias de superfície (MSPs): MSP1a (105 kDa), MSP1b (100 kDa), MSP2 (36 kDa), MSP3 (86 kDa), MSP4 (31 kDa), MSP5 (19 kDa) (de la FUENTE, VAN DER BUSSCHER; KOCAN, 2001b; ALLEMAN et al., 1997; BARBET et al., 2001; OBERLE; PALMER; BARBET, 1993; VISSER et al., 1992). A MSP5 tem se mostrado conservada em todos os isolados estudados de *Anaplasma marginale*, *A. centrale* e *A. ovis*, devendo-se observar reação cruzada entre estas espécies. A proteína MSP5 apresenta características antigênicas, determinadas por epitopos de superfície imunodominante, reconhecidas pelo anticorpo monoclonal ANAF16C1, específico para MSP5, possibilitando sua utilização como antígeno no diagnóstico de anaplasmosse bovina e avaliando a distribuição desta proteína dentro da população bovina em várias regiões geográficas (REYNA-BELLO et al., 1998; KNOWLES et al., 1996; NDUNG'U et al., 1995; TEBELE et al., 1991).

O objetivo do presente trabalho foi a padronização e avaliação do teste imunoenzimático por competição (cELISA) modificado, baseado na proteína recombinante MSP5 (rMSP5-PR1) do isolado *A. marginale* PR1 da região de Londrina, Paraná.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Obtenção do DNA de *A. marginale* e amplificação do gene *msp5*:

A extração de DNA foi realizada a partir de sangue parasitado obtido de bezerro infectado pelo isolado PR-1 (KANO et al., 2002) de *Anaplasma marginale*, utilizando-se o kit Puregene Genta System<sup>®</sup>, segundo as recomendações do fabricante.

O gene que codifica a MSP5 foi amplificado com oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) *sense* 5'GAATTCATGAGAATTTTCAAGATTGTG3' (posições 121 a 138) e *anti-sense* 5'AGAATTAAGCATGTGACCGCTG 3' (posições 725–747), confeccionados a partir da seqüência do gene *msp5* (GenBank M93392). A amplificação de 100ng de DNA do isolado PR1 de *A. marginale* foi realizada com Taq DNA polimerase (Invitrogen<sup>™</sup>), conforme orientações do fabricante, utilizando 30 ciclos (94 °C por 1 min; 58 °C por 1 min; 72 °C por 1 min) no volume de 50µl em Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 9600 (Norwalk, CT). O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, utilizando padrões de 100 bp (100 bp DNA ladder-Life Technologies, MD, USA).

### 2.2. Clonagem e seqüenciamento do gene *msp5* no vetor pCR4-TOPO TA

O produto da PCR do gene *msp5* foi clonado no vetor de seqüenciamento pCR4-TOPO TA (Invitrogen<sup>®</sup>) e seqüenciado usando BigDye Terminator (Applied Biosystems, CA, USA) e os *primers*: *sense* e *anti-sense* do bacteriófago M13 e os *primers* 1 e 2 (VISSER et al., 1992). As seqüências foram submetidas ao Programa de Análise Phred/Phrap/Consed ([www.phrap.org](http://www.phrap.org)) (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON, 2004., GORDON; DESMARAIS; GREEN, 2001; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998) e em seguida foram submetidas aos programas BLASTn e BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), respectivamente segundo previamente descrito (ALTSCHUL et al., 1990, 1997), para checar a identidade da seqüência.

### 2.3. Clonagem do gene *msp5* no vetor pRSETe expressão da MSP5 recombinante

Os primers (5'GAATTCATGAGAATTTTCAAGATTGTG3') *sense*, tendo no início sítio de restrição para a enzima *BamH* I, e (5'AGAATTAAGCATGTGACCGCTG3') *anti-sense*, sem o código de parada, foram confeccionados a partir da seqüência do gene *msp5* seqüenciado do isolado PR1. A PCR de 100ng do DNA do isolado PR1 de *A. marginale* foi realizada com a enzima *Pfx* DNA polimerase Platinum<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>), utilizando 30 ciclos

(94 °C por 1 min; 55 °C por 1 min; 68 °C por 1 min) no volume de 50µl em Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 9600 (Norwalk, CT).

O gene *msp5* amplificado foi clivado com a enzima de restrição *BamHI* e purificado pela extração do DNA em gel de agarose 1% com kit Concert™ Rapid Gel Extration System (GIBCOBRL®) conforme instruções do fabricante. O vetor pRSET<sub>B</sub> (Invitrogen®) foi clivado com *BamHI* e *Pvu II* e utilizado na ligação com o fragmento *msp5/BamHI* com T4 DNA ligase (Invitrogen®). A transformação foi realizada em *E. coli* One Shot™ TOP 10 competente (Invitrogen®), segundo as instruções do fabricante. Os plasmídios recombinantes das colônias transformantes foram extraídos segundo Sambrook et al. (1989).

A clonagem foi confirmada pela técnica de PCR do plasmídeo recombinante (pRSET/*msp5*), utilizando os *primers* do gene *msp5* e do vetor pRSET<sub>B</sub>, e também pela utilização de clivagem com a enzima de restrição *BamHI*. O plasmídeo recombinante pRSET/*msp5* foi utilizado na transformação da bactéria *E. coli* BL21 Star (DE3) One Shot™ (Invitrogen®) competente para a expressão da proteína MSP5 recombinante (rMSP5-PR1). As células cresceram em meio Lauria Bertani (LB) contendo 100µg/mL de ampicilina a 37°C, em DO<sub>500</sub> a 0,8 e a expressão foi induzida pela adição de isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) na concentração de 1 mM. Uma alíquota da cultura após cada hora de indução foi retirada e centrifugada para obtenção do precipitado de bactérias e a expressão analisada em gel SDS-poliacrilamida 12%, segundo Laemmli (1970). Em seguida, uma alíquota da cultura foi centrifugada e as bactérias ressuspendidas com uma solução adequada para proteína solúvel ou insolúvel, as bactérias foram lisadas por sonicação e congelamento e a suspensão centrifugada. Adicionou-se tampão de amostra (0.025 M Tris-HCl, 2% SDS, 15% glicerol, 2.5% 2-mercaptoetanol, pH 6.8) ao sobrenadante e ao precipitado, submetida à eletroforese em SDS-poliacrilamida 12% e comparada com padrão de massa molecular para proteína pré-corado Bench Mark (Invitrogen™).

#### 2.4. Purificação da rMSP5-PR1

A proteína rMSP5-PR1 foi fusionada a cauda de poli-histidina (6xHis tag), facilitando sua purificação em coluna contendo níquel (Ni<sup>2+</sup>) ligado à resina. À cultura de *E. coli* BL21/pRSET/*msp5*, obtida em litros de meio de Lauria Bertani (LB) contendo 100µg/mL de ampicilina e IPTG 1mM, foi adicionado inibidores de proteases phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 1mM para 50 mL de cultura e α-pTosyl L-lysine chloromethyl Ketone (TCLK) 0,1mM para 50 mL de cultura. As bactérias foram lisadas utilizando-se três

repetições de três ciclos de 10 segundos de 50W com intensidade média e intervalo de 30 seg. de sonicação, congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C por três vezes. Após centrifugação, o sobrenadante, contendo a fração solúvel e o sedimento, contendo o extrato insolúvel ressuspendido em tampão de sonicação, foram estocados em freezer a -20°C até o uso.

A proteína rMSP5-PR1 foi purificada sob condições híbridas utilizando-se a resina NI-NTA Agarose (QIAGEN MOD 30210) segundo protocolo do fabricante (QIAGEN™). A concentração da proteína foi determinada em espectrofotômetro Cintra 5 em comprimento de onda de 595nm pelo método de Bradford (1976)

## **2.5. Caracterização antigênica da rMSP5-PR1 pela Técnica de Western-blotting**

A proteína rMSP5-PR1, as proteínas totais do isolado de *A. marginale* PR1 e rMSP5-MBP do isolado Flórida (TORIONI DE ECHAIDE et al., 1998) foram separadas em gel de poliacrilamida 12% e em seguida transferidas para membrana de nitrocelulose (Probind 45 membrane roll – Pharmacia Biotech®) com 30V (TOWBIN; GORDON, 1984) por 18 horas. A membrana foi bloqueada com PBS contendo 0.1% (v/v) de Tween 20 e 5% de leite em pó sob agitação por uma hora a temperatura ambiente. Após as lavagens, as membranas foram incubadas com o anticorpo monoclonal AnaF16C1-HRPO (1:12000) por uma hora sob agitação. A membrana foi revelada pelo método de quimioluminescência (ECL - Amershan Life®). Um marcador de massa molecular para proteína (Rainbow colored, Invitrogen Life Technologies) foi utilizado como padrão.

A antigenicidade de rMSP5-PR1 foi testada, através de Western blotting, utilizando-se soros de bovino selecionados pelo cELISA, sendo dois soros negativos (DO<sub>490</sub> 0,818 e 0,799, respectivamente), dois soros positivos naturalmente infectados para *A. marginale* (DO<sub>490</sub> 0,089 e 0,080, respectivamente), um soro de bovino inoculado com o isolado PR1 de *A. marginale* (DO<sub>490</sub> 0,079) e soro de coelho anti-rMSP5-PR1 imunizado com rMSP5-PR1 diluído 1:5000 incubados sob agitação por uma hora. Foram utilizados os conjugados anti-bovino IgG-Peroxidase (SIGMA A 5295) diluído 1:20000 e anti-rabbit IgG-Peroxidase (SIGMA A 6145) diluído 1:5000, e após as lavagens as membranas foram reveladas por quimioluminescência (ECL - Amershan Life®).

## 2.6. Amostras de soro

Foram utilizados 245 soros de animais de área endêmica da região Sul do Brasil, dos quais 128 soros eram de animais naturalmente infectados do município de Pelotas, RS e 117 soros do Estado do Paraná distribuídos da seguinte forma: 40 do município de Arapoti, 39 do município de Londrina e 38 do município de Umuarama.

Para avaliação do cELISA-PR1 foram selecionados 147 soros positivos que apresentaram  $DO_{490} < 0,490$  no cELISA (Teste-Ouro) dentre os 245 soros acima mencionados e 135 soros negativos de animais provenientes da região livre de anaplasnose, município de Santa Vitória do Palmar, RS, abaixo do Paralelo 32°S.

## 2.7. Teste de Imunofluorescência Indireta:

O teste de Imunofluorescência Indireto foi utilizado para detecção de anticorpos anti-*A. marginale* (IFI), conforme o descrito por Goff e Winward (1983) e modificado por Madruga et al. (1986). Os soros com título  $\geq 320$  foram considerados positivos.

## 2.8. Teste de ELISA de Competição

As amostras de soro foram testadas pela técnica de ELISA por competição (cELISA) descrita por Knowles et al. (1996). O teste utilizou proteína recombinante rMSP5 ligada a maltose (rMSP5-MBP) como antígeno e o anticorpo monoclonal ANAF16C1-HRPO ligado a enzima peroxidase. Os soros utilizados como controles negativo foram obtidos de animais negativos a *A. marginale* pelo teste sorológicos cELISA e IFI. Os soros controle e as amostras de soro foram adsorvidos (v/v) com 120  $\mu$ L de MBP (1,3mg/mL) diluído em Tampão de Conjugado, adicionado de 1% de SAB, e incubados por 30 minutos para neutralizar anticorpos contra esta proteína presente em *E. coli* presente na microbiota intestinal de bovinos. As placas foram adsorvidas com 1 $\mu$ g de rMSP5-MBP diluída em tampão de adsorção carbonato/bicarbonato pH 9,6 ( $Ca_2CO_3$  15mM,  $NaHCO_3$  35mM) e distribuídos em microplaca de poliestireno com 96 cavidades IMMULON 2 (Dynatech Laboratories) e incubada a 4 °C durante a noite. O bloqueio foi realizado com Tampão de Bloqueio pH 7,2 adicionado soro albumina bovina 1,0 %, diluído 1:2 em água destilada. Após quatro lavagens com PBST 0,2% pH 7,4, foram adicionados 100  $\mu$ L de soros padrão positivo, negativo e teste adsorvidos em cada cavidade em duplicata e incubados a temperatura ambiente por 30 minutos sob agitação. As placas foram lavadas quatro vezes e adicionados 100  $\mu$ L/cavidade de conjugado monoclonal produzido em camundongo anti-MSP5

ANAF16C1-HRPO foi utilizado na diluição de 1:12000, em Tampão de Bloqueio pH 7,2 2X diluído 1:2 PPBS e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente sob agitação. As placas foram lavadas quatro vezes, adicionados 100µL/cavidade cinco mg do substrato *o*-fenilenediamina di-hidroclorídrico 5 mg (OPD – SIGMA P-6912) diluído em 10 mL de tampão do substrato pH 7,4 com 4 µL de peróxido de hidrogênio por 10 minutos.

A porcentagem de inibição, representando um resultado positivo no cELISA, foi determinada a partir da densidade óptica (DO) a 490 nm em Leitor de ELISA Bio-Tek Instruments®, INC Modelo ELx 800). Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição baseado na fórmula:  $100 - [(DO_{490} \text{ média do soro teste} \times 100) / \text{média da } DO_{490} \text{ do controle negativo}]$  (TORIONI DE ECHAIDE et al., 1998).

## **2.9. Avaliação do ELISA de competição utilizando a Proteína Recombinante MSP5-PR1 (r MSP5-PR1)**

Na padronização do cELISA-PR1, a adsorção foi realizada com 2 µg de rMSP5-PR1 diluídas em tampão de adsorção carbonato/bicarbonato pH 9,6 (Ca<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15mM, NaHCO<sub>3</sub> 35mM) por cavidade, distribuídas em microplaca de poliestireno com 96 cavidades IMMULON 2 (Dynatech Laboratories) e incubada a 4 °C durante a noite. O bloqueio foi realizado com Tampão de Bloqueio pH 7,2 adicionado de leite desnatado 2,5%, diluído 1:2 em água destilada. Os soros controle positivo e negativo e os soros teste foram previamente adsorvidos sob agitação com lisado de *E. coli* BL21 Star (DE3) One Shot™ (Invitrogen®) na concentração de 0,22 µg/ml diluídos em volumes iguais (120µl) no Tampão de Conjugado, adicionado de 1% de leite desnatado, e incubados por 30 minutos, para neutralizar anticorpos contra proteínas presentes em *E. coli* da microbiota intestinal de bovinos. Após quatro lavagens com PBST 0,2% pH 7,4, foram adicionados 100 µL de soros padrão positivo, negativo e teste adsorvidos em cada cavidade em duplicata e incubados a temperatura ambiente por 30 minutos sob agitação. As placas foram lavadas quatro vezes e adicionados 100 µL/cavidade de conjugado monoclonal produzido em camundongo anti-MSP5 ANAF16C1-HRPO foi utilizado na diluição de 1:12000, em Tampão de Bloqueio pH 7,2 2X diluído 1:2 PPBS e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente sob agitação. As placas foram lavadas quatro vezes, adicionados 100µL/cavidade do substrato *o*-fenilenediamina di-hidroclorídrico 5 mg (OPD – SIGMA P-6912) diluído em 10 mL de tampão do substrato pH 7,4 com 4 µL de peróxido de hidrogênio por 10 minutos.

A determinação da porcentagem de inibição, representando um resultado positivo no cELISA, foi determinada a partir da densidade óptica (DO) a 490 nm em Leitor de ELISA Bio-Tek Instruments®, INC Modelo ELx 800) de 135 soros negativos da região livre de anaplasrose com DO média de 0,890, com um desvio padrão (DP) de  $\pm 0,018$ . Um valor de três DP abaixo da DO (0,647) representou 27% de inibição. Nenhum dos soros negativos inibiu a ligação com anticorpo monoclonal em valores  $\geq 27\%$ . Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição baseado na fórmula:  $100 - [(DO_{490} \text{ média do soro teste} \times 100) / \text{média da } DO_{490} \text{ do controle negativo}]$  (TORIONI DE ECHAIDE et al., 1998).

### 2.10. Análise estatística:

Os testes cELISA-PR1 e IFI foram avaliados utilizando cELISA (KNOWLES et al., 1996) como padrão ouro. A sensibilidade e especificidade, valor preditivo positivo e negativo, concordância *kappa* foram calculados utilizando o programa Epi Info 6.04 b (DEAN; DEAN; BURTON, 1992).

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Seqüenciamento do gene *msp5*

O seqüenciamento resultou em um fragmento de 630 pb. A seqüência completa do gene *msp5* foi adicionada no GenBank e o código de acesso é AY714547. O alinhamento e análise da seqüência nos programas BLASTn e BLASTx mostrou que o gene *msp5* PR-1 apresenta 98% de identidade com os isolados Flórida (M93392) e Saint Maries (CP 00030), 97% com os isolados de Havana (AY527217) e Brasil- Pernambuco (AY245428), e 91% com *A. centrale* (AY054384).

A seqüência do gene *msp5* do isolado PR1 de *A. marginale* apresentou altos índices de identidade com o isolado Florida e com outros isolados estudados, confirmando a conservação da MSP5 nos diferentes isolados de diferentes regiões (NDUNG'U et al., 1995; TEBELE et al., 1991; VISSER et al., 1992).

### 3.2. Construção do plasmídeo recombinante pRSET/*msp5*.

A clonagem do gene *msp5* de *A. marginale*-PR1 no vetor pRSET<sub>B</sub> foi confirmada através da PCR do plasmídeo recombinante e pela clivagem com enzima de restrição *BamHI*.

A Figura 1 mostra o produto de amplificação, fragmento de aproximadamente 0.6 Kb, do pRSET<sub>B</sub>/*msp5* utilizando os primers do gene *msp5* e a clivagem do pRSET<sub>B</sub>/*msp5* com

a enzima de restrição *Bam*HI. O produto final da clivagem foi um fragmento de aproximadamente 3,5 Kb, que contém o gene *msp5* (0,6 Kb) e o vetor de 2,9 Kb.

### 3.3. Expressão e Caracterização Antigênica da proteína rMSP5-PR1

A expressão da proteína rMSP5-PR1 foi realizada em *E. coli* BL21 Star (DE3) One Shot™ (Invitrogen®) após indução com IPTG por quatro horas, e a proteína recombinante mostrou-se insolúvel.

A BL21/pRSET-*msp5* apresentou uma banda induzida de 31 kDa em SDS-PAGE 12% (Figura 2A). Esta bactéria recombinante e a proteína rMSP5-PR1 purificada (eluída) apresentaram reatividade com o anticorpo monoclonal ANAF16C1-HRPO produzido contra a rMSP5 do isolado Flórida no Western blotting (Figura 2B), confirmando a conservação de epítomos da rMSP5-PR1 purificada sob condições híbridas.

Neste trabalho a rMSP5 apresentou massa molecular de 31 kDa devido à característica do vetor de expressão pRSET<sub>B</sub>, que codifica uma proteína recombinante fusionada a 6xHistidina e ao XPress, que aumentam a massa molecular da proteína fusionada, justificando os 31 kDa da rMSP5.

A reatividade da rMSP5-PR1 com o anticorpo monoclonal está de acordo com o resultado do seqüenciamento do gene *msp5* do isolado PR1, o qual mostra a similaridade entre os isolados Flórida e Saint Maries (98%), Havana e Brasil-PE (97%) e *A. centrale* (91%). Os dados obtidos também corroboram com os resultados de Visser et al. (1992), que demonstram a presença de um único gene conservado responsável pela MSP5, ao contrário das proteínas MSP1b, MSP2 e MSP3, as quais são codificadas por famílias multigenes (ALLEMAN et al., 1997; BARBET et al., 2001; BRAYTON et al., 2002; PALMER et al., 1994), e podem sofrer recombinação intragênica.

O anticorpo monoclonal anti-MSP5 ANAF16C1 produzido em camundongo que reage com a rMSP5-MBP utilizada no teste de cELISA (KNOWLES et al., 1996), também reagiu com a proteína MSP5 do corpúsculo inicial do isolado de *A. marginale* PR1 identificando uma banda de 19 kDa, correspondente a massa molecular da proteína nativa (Figura 2B).

Os soros de bovinos naturalmente e experimentalmente infectados com *A. marginale* e o soro de coelho imunizado com rMSP5-PR1 reconheceram os epítomos da rMSP5-PR1 pela técnica Western blotting (Figura 3), confirmando a reatividade desta proteína frente aos soros de animais já testados por cELISA (TORIONI DE ECHAIDE et al., 1998) e IFI (GOFF; WINWARD, 1983). Estes dados estão de acordo com os trabalhos de

Kano et al. (2002) e Oliveira et al. (2003) que demonstraram a conservação da MSP5 em isolados brasileiros através de Western blotting com anticorpos monoclonais.

### 3.4. Avaliação do cELISA-PR1

As 135 amostras de soro bovinos oriundos do município de Santa Vitória do Palmar, RS, área livre de carrapatos, apresentaram resultado negativo para os testes cELISA, cELISA-PR1 e IFI. No cELISA-PR1 o ponto discriminativo de 0,647 foi estabelecido com a densidade óptica média a 490 nm ( $DO_{490}$ ) 0,89, subtraída de três desvios padrão de  $\pm 0,081$ , representando 27% de inibição. Nenhum dos soros negativos apresentou inibição  $\geq 26\%$  pelo anticorpo monoclonal.

Os resultados da avaliação dos testes com 135 amostras de soros negativos e 148 amostras de soros positivos apresentados na Tabela 1 e Figura 4. Os testes cELISA-PR1 e IFI quando comparados com cELISA, como teste ouro, apresentaram, respectivamente, concordância percentual de 99,6% e 98,93%, especificidade de 100% e 98,0%, sensibilidade de 99,3% e 100,0%, valor preditivo positivo de 100,0% e 100,0% e negativo de 99,3% e 97,8% concordância dos testes, obtendo um desempenho de 99,6% e 98,93% apresentando  $k = 0,993$  e  $0,978$  quase perfeito. Os resultados divergentes foram apenas um (cELISA-PR1) e três soros (IFI).

Os 245 soros bovinos, provenientes de região endêmica, foram analisados pelo cELISA-PR1 e IFI e quando comparados com cELISA apresentaram, respectivamente, concordância percentual de 98,37% e 93,7%, especificidade 96,4% e 69,1%, sensibilidade de 98,9% e 96,3%, valor preditivo positivo de 98,9% e 91,5% e negativo de 96,4% e 84,5% coeficiente de concordância  $kappa$  de  $0,956^{QP}$  e  $0,699^S$  (Tabelas 2 e 3), com resultado divergente em quatro e vinte e quatro soros, respectivamente.

Estes resultados permitem concluir que o teste de cELISA-PR1 padronizado com rMSP5 do isolado PR1 de *A. marginale* apresenta performance equivalente ao cELISA com rMSP5-MBP do isolado de *A. marginale* Florida para diagnosticar anaplasose, podendo também ser utilizado em estudos epidemiológicos, programas de controle e animais com movimentação internacional.

Analisando a prevalência obtida com cELISA, cELISA-PR1 e IFI, analisando 245 soros de bovinos naturalmente infectados com *A. marginale* da região de Londrina, obteve-se prevalência de 76,73%, 77,55% e 81,63% respectivamente. Resultados que devem ser considerados observando-se os coeficientes de concordância  $kappa$  obtidos pelos testes, onde a prevalência dos cELISA e cELISA-PR1 são bastante próximas.

O trabalho realizado por Torioni de Echaide et al. (1998), comparando o cELISA, (KNOWLES et al., 1996) utilizou nPCR como padrão ouro, que foi capaz de detectar 30 eritrócitos infectados por mL de sangue bovino, permitindo detectar baixos níveis de parasitemia em animais portadores sãos.

O desempenho do cELISA-PR1 ao ser comparado com o cELISA demonstrou alta concordância, permitindo concluir que a rMSP5-PR1 utilizada na padronização apresenta propriedades similares às daquelas do isolado Florida, por apresentar uma identidade de 98% na análise de seqüenciamento, dando suporte para sua utilização em sistema de diagnóstico sorológico de cELISA. Estes dados sugerem seu emprego a exemplo da rMSP5-MBP, utilizada no diagnóstico de anaplasmoses em caprinos infectados com *Anaplasma ovis* (NDUNG'U et al., 1995), em bovinos infectados com *A. marginale*, onde apresentou especificidade de 96 a 100% (KNOWLES et al., 1996).

O cELISA (KNOWLES et al., 1996) tem demonstrado ser capaz de identificar animais soro-positivos e portadores sãos, ao apresentar 95% de identidade com nPCR. Os resultados obtidos com cELISA-PR1 permite inferir que este teste também teria a capacidade semelhante em detectar portadores sãos, porém estudos envolvendo nPCR, hibridação seriam necessários para confirmar tal hipótese, evidenciada pelo alto *kappa*, sensibilidade e especificidade apresentadas com o cELISA.

O emprego da IFI no diagnóstico da anaplasmoses tem sido feito em diversas regiões do mundo para avaliação de vacinação (MELÉNDEZ et al., 2003), determinar prevalência (DIAZ et al., 2003; TAMASAUKAS et al., 2000; ALFARO et al., 1998;) e no Brasil (MADRUGA et al., 2000; ARAÚJO et al., 1998; VIDOTTO et al., 1995a; MADRUGA et al., 1986), onde diferentes níveis de fluorescência, fluorescência inespecífica, (GOFF; JOHNSON; KUTTLER, 1985), baixa qualidade da amostra, fadiga do operador e resultados influenciados pela subjetividade do operador têm dificultado a sua padronização (BÖSE et al., 1995).

Estudos comparativos anteriores entre a IFI e o cELISA apresentaram  $k=0,57^M$  (moderado 0,41 a 0,60), sensibilidade de 77,7%, especificidade de 84,3% sugerindo que sejam observados os resultados da IFI com cautela (MARANA et al., em andamento), embora no presente trabalho foram obtidos melhores resultados ao se comparar a IFI com o cELISA, quando a IFI obteve  $k = 0,699$  (substancial 0,61 a 0,80) no estudo com soros de área endêmica, e  $k = 0,978$  ao se analisar soros positivos e negativos. A prevalência da região Sul do Brasil foi avaliada e os resultados apresentados pela IFI (81,63%) comparada ao cELISA (76,73%) mostraram-se superiores, fato que sugere observação cautelosa ao se analisar os

dados utilizando-se desta técnica, pois pesquisando soros de bovinos com anaplasnose, apresentou 96,3% de sensibilidade e 69,1% de especificidade, sugerindo resultados falso-positivos. Resultados que enfatizam o emprego de cELISA para a obtenção de resultados mais precisos, aqui sendo observado que o cELISA-PR1 apresentou  $k = 0,956$ , quando comparado ao cELISA.

O uso destes testes no diagnóstico sorológico da anaplasnose, com o auxílio da coloração de Giemsa (OIE, 2004) tem identificado o agente (FIGUEROA et al., 1993) em animais com quadro agudo e a PCR tem se mostrado eficiente na detecção do *A. marginale* presente em animais portadores sãos, reservatórios do agente (TORIONI de ECHAIDE et al., 1998), sendo um risco constante nos rebanhos de áreas de instabilidade enzoótica e nas áreas onde não há anaplasnose, como na avaliação da soroprevalência (DREHER et al., 2005).

O cELISA-PR1 testado no presente trabalho apresentou  $k = 0,993$ , especificidade de 100 % e sensibilidade de 99,3%, com uma concordância de 98,37%, ao se analisar soros de animais negativos e positivos. Estes resultados foram superiores aos obtidos por Molloy et al (1999) que verificaram 99,5% de especificidade, 98,0% de sensibilidade, e 91,5% de concordância em bovinos australianos. O cELISA-PR1, analisado soros de área endêmica, ao ser comparado com o cELISA, apresentou um  $k = 0,956$ , especificidade de 96,7% e sensibilidade de 98,9%, mostrando-se superior a outros testes comparados com cELISA, valores superiores aos obtidos ao analisar 757 soros coletados de animais de áreas endêmicas quando apresentaram concordância de 91,5% com  $k = 0,73$  (Tabela 1) .

Embora a OIE (2004) aponte que o cELISA apresente resultados mais precisos, a rMSP5 também tem sido utilizada em testes de ELISA indiretos. Reyna-Bello et al. (1998) utilizaram o isolado venezuelano Táchira de *A. marginale*, mas não apresentou resultados de sensibilidade e especificidade, pois não analisou o teste comparando-o frente a outro sistema de diagnóstico, como o IFI ou o cELISA. Barros et al. (2005) utilizaram a rMSP5 de isolado brasileiro em sistema de ELISA indireto analisando a anaplasnose no Estado da Bahia, no Brasil, mas comparado com ELISA indireto com antígeno bruto não apresentou diferença significativa nos resultados, apresentando ambos 98% de soropositividade, mas correlação de 0,98, concluindo que o sistema utilizando antígeno bruto possui um antígeno com menor complexidade utiliza uma execução em tempo menor, ao realizar a adsorção por 90 minutos a 37°C, enquanto outros sistemas, como cELISA, apresentam adsorção durante uma noite a 4°C. Mas ao comparar o ELISA indireto, adsorvido com antígeno cru, com o cELISA, que utiliza proteína recombinante, deve ser avaliada a presença de outros antígenos de eritrócitos, que possam interferir nos resultados, embora não tenham apresentado diferença estatística.

Torioni de Echaide et al. (2005) utilizaram rMSP5 em sistema de ELISA indireto para diagnosticar a presença de anticorpos anti-*A. marginale* no leite de vaca, comparando a performance do teste com PCR, cELISA e Teste de Aglutinação. O ELISA indireto apresentou 98% de especificidade frente ao PCR, o cELISA apresentou 97% e o Teste de Aglutinação 91%, para  $k = 0,919$  para o PCR,  $0,899$  para o cELISA e  $0,888$  para o teste de Aglutinação. Como o ELISA indireto apresentou um  $k = 0,899$  quando comparado com o cELISA, cELISA-PR1 também poderia ser utilizado na pesquisa de anticorpos contra *A. marginale* em leite de vacas, observando que os resultados obtidos neste trabalho foram superiores.

Knowles et al. (1996) analisando testes de diagnóstico sorológico utilizando anticorpo monoclonal ANAF16C1 específico para MSP5 obtiveram especificidade de 100% infectados com *A. marginale*. Torioni de Echaide et al. (1998) encontraram sensibilidade de 96% e especificidade de 95% para animais portadores sãos quando analisados frente ao nPCR. Estes dados permitem relacionar ao cELISA-PR1 para o pesquisa de portadores sãos.

O emprego da proteína recombinante MSP1a no ELISA indireto tem sido justificada por sua presença nos isolados estudados (ARAÚJO et al., 2005), mas apresenta como um marcador de caracterização filogeográfica no isolado de *A. marginale*, o que pode influenciar nos resultados dos testes de diagnóstico, pois apresenta diferentes números de repetições de seqüências de nucleotídeos (de la FUENTE et al., 2004), devendo ser analisado criteriosamente quanto a possíveis alterações no reconhecimento da proteína de diferentes isolados. A proteína recombinante MSP2 também tem sido estudada como antígeno em testes de ELISA (ARAÚJO et al., 2005), mas não se encontra conservada em todos os isolados estudados (KANO et al., 2002), o que pode resultar em diagnóstico incerto. A rMSP5 não apresenta o problema, é codificada por um único gene, apresenta-se conservada em todos os isolados estudados e é adequada para testes de diagnóstico (VISSER et al., 1992), justificando a emprego da rMSP5-PR1 em teste de diagnóstico.

## 5. Conclusão

Pode-se concluir, com bases nos resultados apresentados e comparação com os demais resultados da literatura, que o teste cELISA-PR1 apresentou uma performance compatível com o cELISA, com  $k = 0,98$ , superior àqueles alcançados em outros trabalhos, inclusive utilizando o ELISA indireto, podendo ser utilizado durante a infecção aguda, para diagnosticar animais persistentemente infectados, levantamentos sorológicos, em programas de controle, programas de transferência internacional de bovinos e vacinação. A IFI testada

obteve bons resultados, sugerindo sua utilização em diagnóstico epidemiológico e controle regional da anaplasiose.

A clonagem e produção da proteína recombinante MSP5 (rMSP5-PR1) do isolado *A. marginale* PR1 da região de Londrina, Paraná, foi obtida a partir de plasmídeo recombinante pRSET<sub>B</sub> / *msp5*. A proteína produzida foi empregada na padronização e avaliação do teste imunoenzimático por competição com rMSP5-PR1 (cELISA-PR1), apresentando um  $k = 0,993$  ao se analisar soros bovinos positivos e negativos, obtendo 100,0% de especificidade e 99,3% de sensibilidade. Ao se comparar empregando-se soros de área endêmica obteve  $k = 0,956$ , especificidade de 96,7% e sensibilidade de 98,9%.

### Referências

- ALFARO, C.; BENITEZ, M. T.; GARCIA, F.; VALLE, A. Epidemiologia de la anaplasmosis bovina en el estado Monagas. Asociación com factores extrínsecos e intrínsecos del hospedador. *Vet. Trop.*, v. 23, n. 1, p. 65-79, 1998.
- ALLEMAN, A. R.; PALMER, G. H.; McGUIRE, T. C.; McELWAIN, T. F.; PERRYMAN, L. E.; BARBET, A. F. *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 3 is encoded by a polymorphic, multigene family. *Infect. Immuni*, v. 65, n.1, p. 156-163. 1997.
- ALONSO, M.; ARELLANO-SOTA, C.; CERESER, V. H.; CORDOVES, C. O.; GUGLIEMONE, A. A.; KESSLER, R.; MANGOLD, A. J.; NARI, A.; PATARROYO, J. H.; SOLARI, M. A.; VEGA, C. A.; VIZCAINO, O.; CAMUS, E. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Eppiz.*, v. 11, p. 713-733. 1992.
- AMERAULT, T.E.; ROSE J.E.; ROBY T.O. Modified card agglutination test for bovine anaplasmosis: evaluation with serum and plasma from experimental and natural cases of anaplasmosis. *Proc. U.S. Anim. Health Assoc.*, v. 76, p. 736-744. 1972.
- ARAÚJO, F. R.; MELO, V. S. P.; RAMOS, C. A. N.; MADRUGA, C. R.; SOARES, C. O.; KESSLER, R. H.; ALMEIDA, N. F.; ARAÚJO, G. S.; ALVES, L. C.; TORRES Jr., R. A. A.; FRAGOSO, S. P.; ARAUCO, P. R. C., BACANELLI, G.; OLIVEIRA, M. B.; SANTOS, L. R. Development of enzyme-linked immunosorbent assays base don recombinant MSP1a and MSP2 of *Anaplasma marginale*. *Mem. Inst Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 7, p. 765-769. 2005.
- ARAÚJO, F. R., MADRUGA, C. R., LEAL, C. R. B., SCHENK, M. A. M., KESSLER, R. H., MARQUES, A. P. C., LEMAIRE, D. C. Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody and rapid conglutination tests in detecting antibodies against *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.*, n. 74, p. 101-108, 1998.
- ARAÚJO, F.R.; LEAL, C.R.B.; MADRUGA, C.R.; MIGUITA, M.; CARVALHO, E.L.L. Levantamento sorológico para *Anaplasma marginale* em duas microrregiões do estado da Bahia. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 4, n. 2, supl. 2, p. 188, 1995. Resumo.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, v. 215, p. 403-410. 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L. SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.*, v. 25, p. 3389-3402. 1997. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),
- BARBET, A. F., YI, J.; LUNDGREN, A. M.; MCEWEN, B. R.; BLOUIN, E. F., KOCAN, K. M. Antigenic variation of *Anaplasma marginale*: Major Surface Protein 2 diversity during transmission between ticks and cattle. *Infect. Immun.*, v. 69, n. 5, p. 3057-3066. 2001.
- BARROS, S. L.; MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; MENK, C. F.; ALMEIDA, M. A. O. de; 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 state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 6, p. 513-517. 2005.
- BÖSE, R.; JORGENSEN, W.K.; DALGLIESH, R.J.; FRIEDHOFF, K.T.; de VOS, A.J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet. Parasitol.*, n. 57, p. 61-74, 1995.
- BOWLES, P. M.; MOLLOY, J. B.; SINGH, S.; MABIKACHECHE, L G. Evaluation of a commercial available ELISA kit for detection of antibodies to *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* in cattle in Australia and Zimbabwe. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v. 67, p. 83-87. 2000.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, n. 12, p. 248-254, 1976.
- BRAYTON, K. A.; PALMER, G. H.; LUNDGREN, A.; YI, J.; BARBET, A. F. Antigenic variation of *Anaplasma marginale msp2* occurs by combinatorial gene conversion. *Mol. Microbiol.*, v. 43, n. 5, p. 1151-1159. 2002.
- DEAN, A. G., DEAN, I. A., BURTON, A.H. *EPI INFO version 6.04*: a world processing data base and statistic program for epidemiology on microcomputers. Atlanta, Georgia, USA: Center for Disease Control, 1992, 302 p. Disponível em <http://www.cdc.gov>.
- de la FUENTE, J.; PASSOS, L. M. F., VAN DEN BUSSCHE, R. A.; RIBEIRO, M. F. B.; FACURY-FILHO, E. J. ; KOCAN, K. M. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 121, p. 307-316. 2004.
- de la FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHE, R.A.; KOCAN, K.M. Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). *Vet. Parasitol.*, v. 97, p. 65-76. 2001b.
- DIAZ, D.; VALERA, Z.; ANDRADE, D.; PARRA, O.; ESCALONA, F.; RAMIREZ, R. Prevalencia de *Anaplasma marginale* em bovinos del sector le Piñata, Municipio La Cañada de Urdaneta, Estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica, FCV-LUZ*, v. 13, n. 3, p. 193-198. 2003.
- DREHER, U. M.; HOFMANN-LEHMANN, R.; MELI, M. L.; REGULA, G.; CAGIENARD, A. Y.; STÄRK, K. D. C.; DOHERR, M. G.; FILLI, F.; HÄSSIG, M.; BRAUN, U.; KOCAN, K. M.; LUTZ, H. Seroprevalence of anaplasmosis among cattle in Switzerland in 1998 and 2003: No evidence of an emerging disease. *Vet. Microbiol.*, v. 107, p. 71-79. 2005.
- DUMLER, J. S., BARBET, A. F., BEKKER, C. P. J., DASCH, G. A., PALMER, G. H., RAY, S. C., RIKIHISA, Y., RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of

*Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Intl. J. Syst. and Evol. Microbiol.*, n. 51, p. 2145-2165. 2001.

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

EWING B, GREEN P: Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, v. 8, p. 186-194, 1998. Disponível em: [www.phrap.org](http://www.phrap.org).

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, v. 8, p. 175-185, 1998. Disponível em: [www.phrap.org](http://www.phrap.org).

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

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

GOFF, W. I.; WINWARD, I. D. A modified indirect fluorescent test for the diagnosis of *Anaplasma marginale* infection in cattle: comparison with complement fixation and card agglutination. *Proc. Int. Symp. World Assoc. Vet. Lab. Diag.*, v. 3, p. 665-672. 1983.

GORDON, D. "Viewing and Editing Assembled Sequences Using Consed", in *Current Protocols in Bioinformatics*, A. D. Baxevanis and D. B. Davison, eds, New York: John Wiley & Co., 2004, v. 11, n. 2, p.1-11.2.43. Disponível em: [www.phrap.org](http://www.phrap.org).

GORDON D, DESMARAIS C, GREEN P: Automated finishing with Autofinish. *Genome Res.*, v. 11, p. 614-625, 2001. Disponível em: [www.phrap.org](http://www.phrap.org).

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.*, v. 8, p. 195-202, 1998. Disponível em: [www.phrap.org](http://www.phrap.org).

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

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

KESSLER, R. H.; SCHENK M. A. M.; MADRUGA, C. R.; SACCO, A. M. S.; MIGUITA, M.. Tristeza parasitária dos bovinos (TPB) p. 1-30. IN: FURLONG, J.; CHARLES, T. P. Doenças parasitárias dos bovinos de Leite. Coronel Pacheco: *EMBRAPA-CNPGL*, 1992

KNOWLES, D.P., TORIONI DE ECHAIDE, S., PALMER G.H., McGUIRE T.C., STILLER D., McELWAIN T.F., Antibody against *Anaplasma marginale* MSP-5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *J. Clin. Microbiol.*, v. 34, p. 2225-2230, 1996.

KREIER, J. P.; RISTIC, M. The biology of hemotrophic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, v. 35, p. 325-38, 1981.

- MADRUGA, C. R., KESSLER R. P., SCHENK, M. A. M. A agglutination test for rapid detection of antibodies against *Babesia bigemina*. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 20, n. 4, p. 161-166, out/dez. 2000.
- MADRUGA, C.R.; HONER, M.R.; ANDREOTTI, R.; ARAÚJO, F.R.; SANTARÉM, V. Prevalência de *Anaplasma marginale* em três regiões do estado da Paraíba. In: Congresso Internacional de Medicina Veterinária em Língua Portuguesa, 6, 1994. Salvador, BA. *Anais...* Salvador, 1994, p. 350-352.
- MADRUGA, C.R.; KESSLER, R.H.; SACCO, A.M.S.; JESUS, E.F. de & MIGUITA, C.T. Produção de antígenos e análise preliminar do teste de Imunofluorescência Indireta para diagnóstico de anticorpos contra *Anaplasma marginale*. EMBRAPA/CNPQC, 1986 (Pesquisa em andamento n° 31).
- MARANA, E.R.M.; ALFIERI, A. A.; ANDRADE, G. M.; GARCIA, J. L.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O. Comparação dos Testes Sorológicos de Imunofluorescência Indireta, Conglutinação Rápida, ELISA indireto e ELISA de Competição para detecção de anticorpos contra *Anaplasma marginale* em soros de diferentes áreas enzoóticas. Em andamento.
- MELÉNDEZ, R. D.; BENÍTEZ, M. T.; NICCITA, G.; MORENO, J., PUZZAR, S.; MORALES, J. Humoral immune response and hematologic evaluation with *Anaplasma centrale*. *Vet. Microbiol.*, v. 94, p. 335-339. 2003.
- MOLLOY, J. B.; BOWLES, P. M.; KNOWLES, D. P.; McELWAIN, T. F.; BOCK, R. E.; KINGSTON, T. G.; BLIGHT, G. W.; DALGLIESH, R. J. Comparison of a competitive inhibition ELISA and the card agglutination test for detection of antibodies to *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* in cattle. *Aust. Vet. J.*, v. 77, n. 4, p. 245-249. Apr. 1999.
- NIELSEN, K.; SMITH, P.; GALL, D.; de ESHAIDE, S.T.; WAGNER, G.; DAJER, A. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Anaplasma marginale* in bovine sera. *Vet. Parasitol.*, v. 67, p. 133-142. 1996.
- NDUNG'U, L. W., AGUIRRE, C., RURANGIRWA, F. R., McELWAIN, T. F., McGUIRE, T. C., KNOWLES, D. P., PALMER, G. H. Detection of *Anaplasma ovis* infection in goats by major surface protein 5 competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, n. 3, p. 675-679. Mar. 1995.
- OBERLE, S.M., PALMER G.H., BARBET A.F. Expression and immune recognition of the conserved MSP-4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.*, v. 61, p. 5245-5251. 1993.
- O.I.E. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Bovine Anaplasmosis. In: McElwain, T.F. (ed) Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 5<sup>th</sup> ed. Paris, OIE, 2004 Part 2, Sec 2.3, Cap. 2.3.7. Disponível em: <http://www.oie.int/hs2/report.asp?> acesso em 18.09.2004.
- OLIVEIRA, J. B.; MADRUGA, C. R.; SCHENK, M. A. M.; KESSLER, R. H.; MIGUITA, M.; ARAÚJO, F. R. Antigenic characterization of Brazilian isolates of *Anaplasma marginale*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 3, p. 395-400. 2003.
- OLIVEIRA, A.A.; PEDREIRA, P.A.S.; ALMEIDA, M.P.R.S de; De OLIVEIRA, A.A.; De ALMEIDA, M.P.R.S. Doenças de bezerros. II. Epidemiologia da anaplasmosose no estado de Sergipe. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.*, v. 44, n. 5, p. 377-386. 1992.
- PALMER, G. H.; EID, G.; BARBET, A. F.; McGUIRE, T. C.; McELWAIN, T. F. The immunoprotective *Anaplasma marginale* major surface protein 2 is encoded by a polymorphic multigene family. *Infect. Immun.*, v. 62, n. 9, p. 3808-3816, 1994.

- PALMER, G.H. *Anaplasma* vaccines. In: I.G. WRIGHT (Ed.) Veterinary Protozoan and Hemoparasite Vaccines. Boca Raton: CRC Press, 1989. p 1-29.
- REYNA-BELLO, A.; CLOECKAERT, A.; VIZCAÍNO, N.; GONZATTI, M. I.; ASO, P. M.; DUBRAY, G.; ZYGMUNT, M. S. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in Venezuela. *Clin. Diagnost. Lab. Immunol.*, v. 5, n. 2, p. 259-262. Mar. 1998.
- ROSE, J.E.; AMERAULT, T.E.; ROBY, T.O.; MARTIN, W.H. Serum levels of conglutinin, complement, and immunoconglutinin in cattle infected with *Anaplasma marginale*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 39, n. 5, p. 791-793, 1978.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2<sup>a</sup> ed. New York: *Cold Spring*. 1989. 3 v.
- TAMASAUKAS, R.; AGUIRRE, A.; RON, J.; ROA, N.; COBO, M. Tetralogia hemoparasitaria en algunas fincas bovinas del Municipio Santa Rita, Estado Guárico, Venezuela. *Ver. Fac. Cs. Vets.*, v. 41, n. 4, p. 101-108. 2000.
- TEBELE, N.; PALMER, G.H. Crossprotective immunity between the Florida and a Zimbabwe stock of *Anaplasma marginale*. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*; v. 23, p.197-202. 1991.
- TORIONI DE ECHAIDE S.; BONO, M. F.; LUGARESI, C.; AGUIRRE, N.; MANGOLD, A.; MORETTA, R.; FARBER, M.; MONDILLO, C. Detection of antibodies against *Anaplasma marginale* in milk using a recombinant MSP5 indirect ELISA. *Vet. Microbiol.*, v. 106, p. 286-292, 2005.
- TORIONI DE ECHAIDE S.; KNOWLES D.P.; McGUIRE T.C.; PALMER G.H.; SUAREZ C.E.; McELWAIN T.F. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and competitive enzyme linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein-5. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, p. 777-782. 1998.
- TOWBIN, H.; GORDON, H. Immunoblotting and dot immunoblotting: current status and Outlook. *J. Immunol. Methods.*, v. 72, p. 313-340. 1984.
- VIDOTTO, M.C.; VIDOTTO, O.; ANDRADE, G.M.; PALMER, G.H.; McELWAIN, T. KWOLE, D.C. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* on cattle in Parana State, Brasil, by MSP5 competitive inhibition ELISA. *Ann.N. Y. Acad. Sci.*, v. 849, p. 424-426. 1998.
- VIDOTTO, O; YAMAMURA, M.H.; ANDRADE, G.M.; BARBOSA, C. da S.; FREIRE, R.L.; VIDOTTO, M.C. Ocorrência da *Babesia bigemina*, *B. bovis*, e *Anaplasma marginale* em rebanhos de bovinos leiteiros da região de Londrina, PR. *Rev. Bras. Parasitol., Vet.* v. 4, n. 2, supl. 2, p. 184, 1995a. Resumo.
- VISSER, F.S. McGUIRE T.C. PALMER G.H., DAVIS W.C., SHKAP V., PIPANP E., KNOWLES D.P. The *Anaplasma marginale* MSP-5 gene encodes a 19 kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infection & Immunity.* v. 60, p. 5139-5144. 1992.

Tabela 1. Resultados do cELISA-PR1 e IFI com soros de bovinos positivos naturalmente infectados e de área livre de infecção com *A. marginale* frente ao cELISA.

		<b>cELISA</b>		
		positivo	negativo	<b>Total</b>
<b>cELISA-PR1</b>	positivo	147	0	<b>147</b>
	negativo	1	135	<b>136</b>
<b>IFI</b>	positivo	145	0	<b>145</b>
	negativo	3	135	<b>138</b>
<b>Total</b>		<b>148</b>	<b>135</b>	<b>283</b>

Tabela 2. Resultados do cELISA-PR1 e IFI com soros de bovinos naturalmente infectados com *A. marginale* da região Londrina, Norte do Paraná.

		<b>cELISA</b>		
		positivo	negativo	<b>Total</b>
<b>cELISA-PR1</b>	positivo	188	2	190
	negativo	2	53	55
<b>IFI</b>	positivo	183	17	200
	negativo	7	38	45
<b>Total</b>		190	55	245

Tabela 3. Validação do cELISA-PR1 e IFI com os resultados da sorologia de bovinos comparados com o cELISA, como teste ouro.

cELISA	cELISA-PR1	IFI
Concordância	98,37%	93,7%
Sensibilidade	98,9%	96,3%
Especificidade	96,4%	69,1%
Valor Preditivo Positivo	98,9%	91,5%
Valor Preditivo Negativo	96,4%	84,5%
kappa	0,956 <sup>QP</sup>	0,699 <sup>S</sup>

kappa ( $k$ ) – coeficiente *kappa* (<0,0 a 1,0); P = pobre: 0,0 – 0,20; R = razoável: 0,21 – 0,40; M = moderado: 0,41 – 0,60; S = substancial: 0,61 – 0,80; QP = quase perfeito: 0,81 – 1,00.

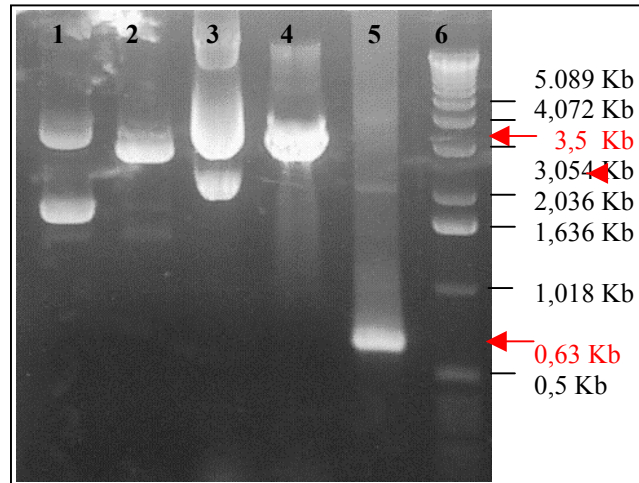


Figura 1. Plasmídio recombinante pRSET/*msp5* visualizado em gel de agarose 1% após clivagem com a enzima de restrição *Bam*HI. 1: pRSET<sub>B</sub> (vetor) sem clivar; 2: vetor clivado com *Bam*HI; 3: pRSET<sub>B</sub>/*msp5* não clivado; 4: pRSET<sub>B</sub>/*msp5* clivado com *Bam*HI; 5: PCR de pRSET<sub>B</sub>/*msp*; 6: Padrão de massa molecular 1Kb (GIBCO BRL®).

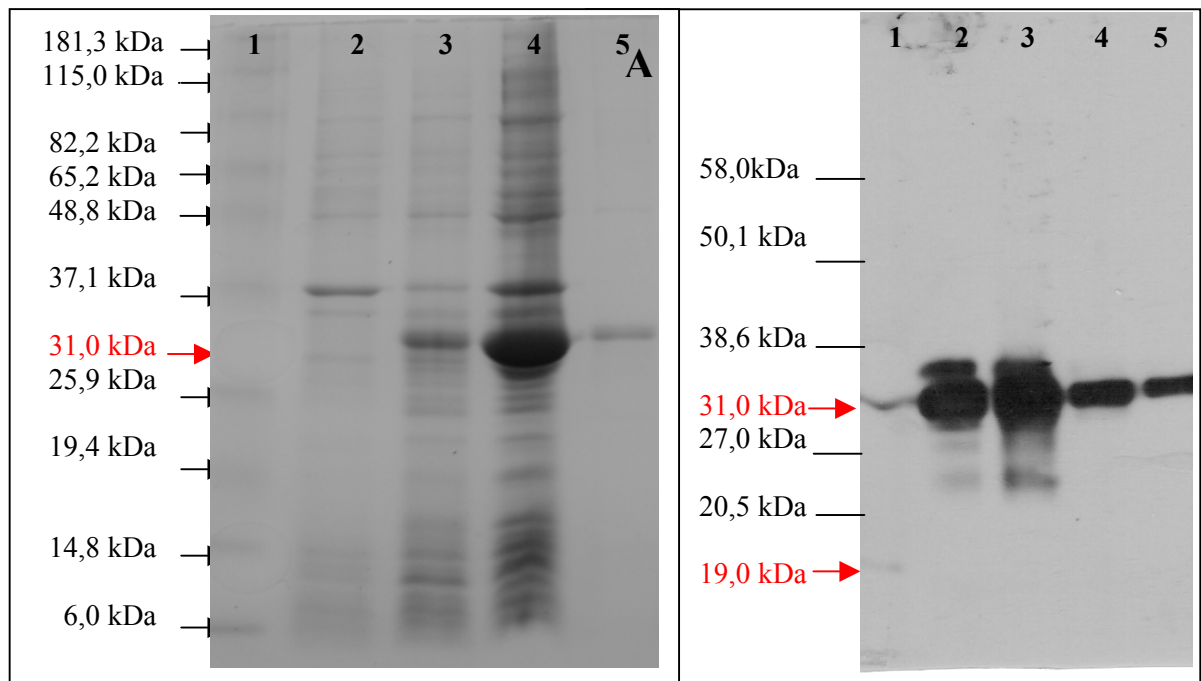


Figura 2. Proteína rMSP5-PR1 de *A. marginale* purificada sob condições híbridas em coluna de Resina de Níquel. A- SDS-PAGE 12% corado com Coomassie blue, coluna 1: padrão de massa molecular (Proteína Bench Mark - INVITROGEN®); coluna 2: lisado da *E. coli* BL21 Star DE3; coluna 3: *E. coli* BL21/ pRSET<sub>B</sub>-*msp5* sem indução de IPTG; coluna 4: *E. coli* BL21/ pRSET<sub>B</sub>-*msp5* com indução de IPTG; coluna 5: rMSP5-PR1 eluída. B-Western blotting, a rMSP5-PR1 foi reconhecida pelo anticorpo monoclonal ANAF16C1-HRPO: coluna 1: corpúsculo inicial da cepa Florida (19kDa); coluna 2: *E. coli* BL21/pRSET<sub>B</sub>-*msp5* sem indução de IPTG; coluna 3: *E. coli* BL21/pRSET<sub>B</sub>-*msp5* com indução de IPTG; coluna 4: lisado de *E. coli* BL21/ pRSET-*msp5*; coluna 5: rMSP5-PR1 purificada (31 kDa).

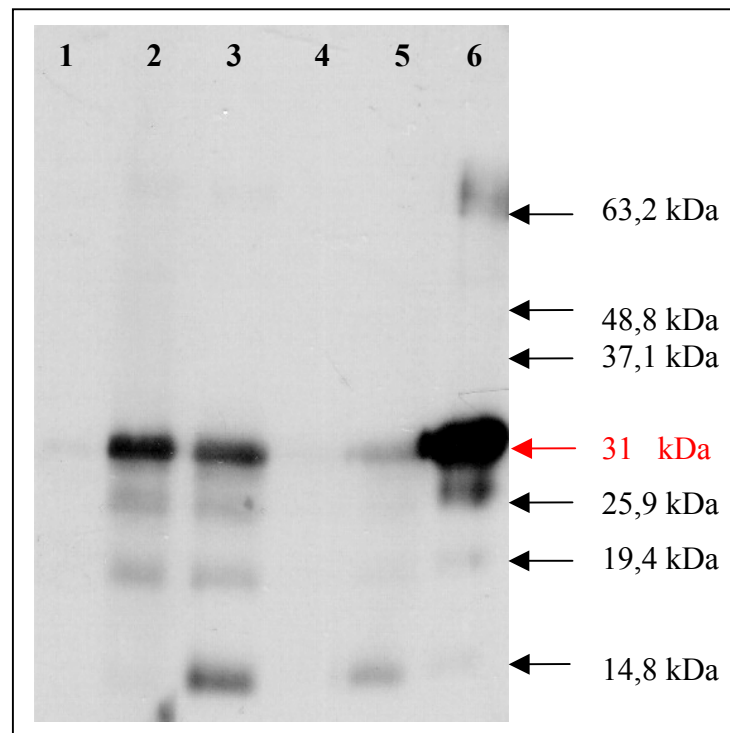


Figura 3. Western blotting da rMSP5-PR1 com anticorpos policlonais de bovinos naturalmente e experimentalmente infectados e de coelho inoculado com rMSP5-PR1. Colunas 1 e 4: soro bovino negativo para *A. marginale*; coluna 2: soro bovino inoculado experimentalmente com o isolado de *A. marginale* PR1; colunas 3 e 5: soro bovino positivo para *A. marginale* naturalmente infectado; coluna 6: soro de coelho experimentalmente inoculado com rMSP5r-PR1 de *A. marginale*.

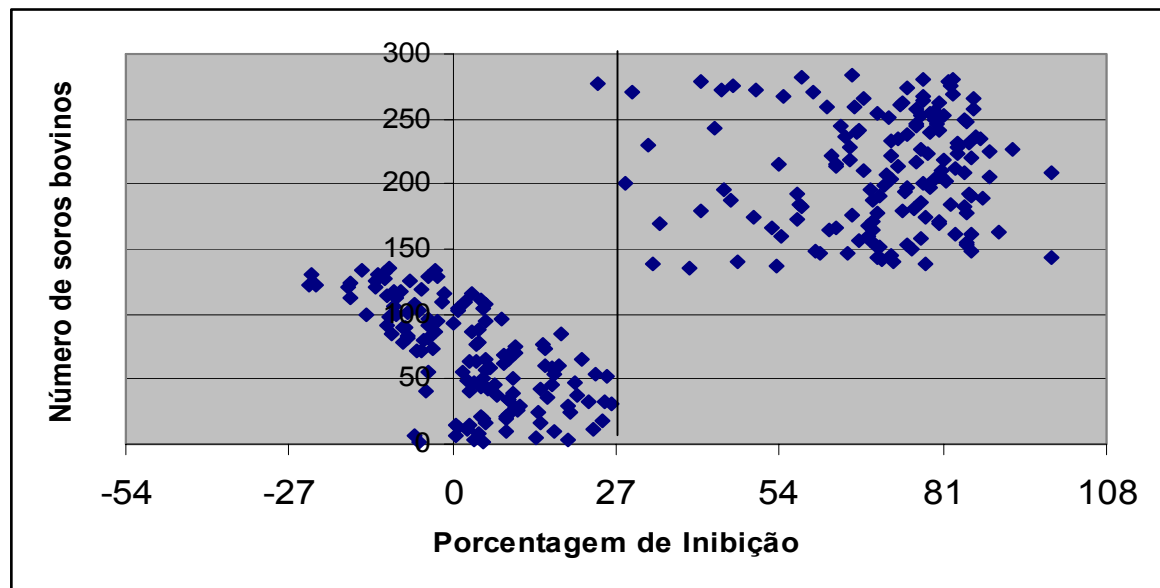


Figura 4. Percentagem de inibição observada pelo cELISA-PR1 ao serem avaliados 135 soros bovinos negativos, oriundos de Santa Vitória do Palmar, RS, com percentagem de inibição menor que 27%, e 148 soros de bovinos positivos naturalmente infectados por *A. marginale* identificados pelo cELISA, com percentagem de inibição maior ou igual a 27%, identificando apenas um soro com valor inferior a 27% de inibição.

**4 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO 2**

**Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos da região Centro-Sul do Estado do Paraná, Brasil por um teste Imunoenzimático competitivo utilizando proteína recombinante MSP5-PR1**

**Elizabete Regina Marangoni Marana<sup>1</sup>, Juliana Alves Dias<sup>1</sup>, Josy Campanhã Vicentini<sup>1</sup>,  
Roberta Lemos Freire<sup>1</sup>, Odilon Vidotto<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

\* Autor para correspondência: Tel.: (43) 3371 4485. E-mail: vidotto@uel.br

## RESUMO

Foi determinada a prevalência de *Anaplasma marginale* em 223 soros de bovinos com idade maior ou igual a dois anos, das Regionais da SEAB-PR de Ponta Grossa, Guarapuava e Laranjeiras do Sul, Região Centro-Sul do Estado do Paraná. O teste imunoenzimático de competição PR1 (cELISA-PR1) foi utilizado para determinar a presença ou ausência de anticorpos anti-*Anaplasma*. Do total de soros bovinos examinados, 130 (58,74%) mostraram-se positivos ao teste cELISA-PR1, uma percentagem significativa dos animais, sendo uma região de instabilidade enzoótica, estando susceptível a infecção pelo *A. marginale* e desenvolver anaplasnose. As características de tipo de exploração da propriedade, sistema de criação, manejo e forma de comercialização dos animais foram avaliadas. A análise estatística não demonstrou haver diferença significativa entre as variáveis estudadas e a positividade nos animais.

**Palavras-chave:** *Anaplasma marginale*. cELISA. Soroprevalência. Bovino. Paraná.

## ABSTRACT

*Anaplasma marginale* prevalence was determined in 223 sera samples in 2-year old or older cattle, from the Center-South Region in the State of Paraná: Ponta Grossa, Guarapuava and Laranjeiras do Sul regions; through survey of antibodies IgG class against *Anaplasma marginale* through immune-enzymatic assays by cELISA-PR1 competition. From all the cattle sera examined, 130 (58,74%) reacted to cELISA-PR1 test, a significant percentage of animals, being this a region of enzootic instability, susceptible to infection by *A. marginale* and development of anaplasmosis. The kind of exploration in the property, the breeding and handling system, the presence of other animals (ovine/caprino, horses, wild animals), and means of commercialization of animals were analyzed. The statistical analysis showed that there were no significant differences among the analyzed variables.

**Keywords:** *Anaplasma marginale*. cELISA. Seroprevalence. Cattle. Paraná.

## 1. Introdução

A anaplasmoze bovina é uma doença causada pelo *Anaplasma marginale* (ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae) (DUMLER et al., 2001), esta afeta principalmente regiões tropicais e subtropicais (KREIER; RISTIC, 1981) causando anemia, icterícia, perda de peso, aborto e mortes. Isto acarreta perdas econômicas na bovinocultura de carne e de leite (PALMER, 1989) podendo alcançar 500 milhões de dólares anualmente (GRISI et al., 2002).

Vários estudos de diagnóstico sorológico têm sido realizados buscando detectar a presença da anaplasmoze bovina em diferentes regiões do mundo, vários testes foram empregados no diagnóstico e várias comparações foram realizadas entre eles, como Fixação de Complemento (FC) (RODGERS et al., 1994), Teste Aglutinação do Cartão (TAC) (PEREZ et al, 1994), Imunofluorescência Indireta (IFI) (FRAGADA; CORDOVÉS; PUENTES, 1991) e ELISA (NIELSEN et al., 1996), TAC e IFI (KNOWLES et al, 1982), FC, TAC e IFI (BUNDY; HYLTON; WAGNER, 1983), IFI e ELISA (JONGEJAN et al, 1988), cELISA (KNOWLES et al., 1996), cELISA e TAC (MOLLOY et al., 1999).

No Brasil, os estudos para estabelecer a prevalência da anaplasmoze bovinos em diferentes estados constataram que a infecção está disseminada pelo país, o que evidencia a necessidade de desenvolvimento de melhores métodos de diagnóstico e medidas de controle para a doença. Estes levantamentos utilizaram o Teste de Conglutinação Rápida (TCR) onde encontraram 97,6% de positividade nos animais da Bahia (ARAÚJO et al., 1995), em esfregaço sangüíneo (ES) encontraram 12,3% em Sergipe (OLIVEIRA et al., 1992), IFI com 98,% em Campina Grande, na Paraíba (MADRUGA et al., 1994), ELISA detectou 96,9% de bovinos positivos em região de estabilidade enzoótica do Estado da Bahia (MADRUGA et al., 2000) e cELISA que detectou 76,10% de animais com anaplasmoze na região de Umuarama, Paraná (YOSHIHRARA et al., 2003) e 77,55% na região de Londrina, Paraná (MARANA et al, em andamento)

O cELISA utiliza como antígeno a proteína recombinante de 19 kDa do *A. marginale* (MSP5), e o anticorpo monoclonal ANAF16C1 como conjugado (KNOWLES et al., 1996). Isolados de *A. marginale* de diferentes regiões do Brasil foram analisados por Western Blotting e a MSP5 se mostrou conservada em todos (KANO et al., 2002). Estudos realizados em rebanhos de propriedades da região de Londrina identificou 92,94% de animais soropositivos, sugerindo que a região de Londrina é uma área de estabilidade enzoótica (ANDRADE et al., 2001). Estudos realizados em rebanhos de gado de corte da região de Umuarama, Estado do Paraná, observaram (YOSHIHARA et al., 2003) que 76,10% dos animais mostraram-se reagentes ao teste cELISA, sugerindo que esta região apresenta-se

como área de instabilidade enzoótica, pois 23,90% dos animais podem desenvolver anaplasnose.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a prevalência da anaplasnose bovina na Região Centro-Sul do Paraná utilizando o teste de ELISA competitivo com rMSP5-PR1 (cELISA-PR1).

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Região estudada e Amostragem**

O delineamento amostral foi elaborado pelo Departamento de Defesa Animal – MAPA em colaboração com o Setor de Epidemiologia da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná (SEAB), e foi realizado em duas etapas. Primeiro uma seleção aleatória de um número pré-estabelecido de propriedades, que representam as unidades primárias de amostragem. Dentro das unidades primárias, com a finalidade de terminar o estado sanitário do rebanho, foi amostrado de forma aleatória um número pré-estabelecido de animais (unidades secundárias). Os soros bovinos foram colhidos e armazenados no Laboratório de Microbiologia (Tabela 1) (Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UEL). Foram colhidos 1970 soros bovinos das Regionais da SEAB de Ponta Grossa, Guarapuava e Laranjeiras do Sul, na região Centro-Sul do Estado do Paraná, (Figura 1), dos quais foram amostrados 223 soros bovinos sorteados sistematicamente. O tamanho da amostra foi calculado adotando-se uma prevalência de 80%, precisão de 5% e nível de significância de 5%.

### **2.2. Questionário**

Para a obtenção dos dados epidemiológicos utilizou-se um questionário preenchido no ato da coleta de cada amostra de sangue; para levantar informações sobre o ambiente de produção, produtos e sanidade da propriedade (Anexo1).

### **2.3. ELISA de competição com o antígeno proteína recombinante rMSP5-PR1**

Foi empregada a proteína rMSP-PR1 como antígeno segundo Knowles et al. (1996) com modificações. A concentração da proteína utilizada foi 2 µg/100µL/cavidade. Os soros controle e testes foram adsorvidos com lisado de *E. coli* BL21 Star (DE3) One Shot™ na concentração de 0,22 µg/ml em tampão de conjugado (Salina tamponada de Fosfato de Potássio 0,5M pH 7,2 - PPBS - com 1% de leite desnatado) em volumes iguais (120µl) e

incubados por 30 minutos. O conjugado monoclonal ANAF16C1-HRPO anti-MSP5 produzido em camundongo foi adicionado na diluição de 1:12.000, em tampão de conjugado pH 7,2 com 5% de leite desnatado e incubado por 10 minutos em temperatura ambiente sob agitação e adicionados 100µL/cavidade do substrato *o*-fenilenediamina di-hidroclorídrico (OPD – SIGMA P-6912) com peróxido de hidrogênio.

A determinação da porcentagem de inibição, representando um resultado positivo no cELISA, foi obtida a partir de 135 soros negativos da região livre de anaplasrose, Santa Vitória do Palmar, RS, abaixo do Paralelo 32°S, sendo determinada a partir da densidade óptica (DO) a 490 nm em leitor de ELISA Bio-Tek Instruments®, INC Modelo ELx 800) com DO média de 0,890, com um desvio padrão (DP) de  $\pm 0,018$ . Um valor de três DP abaixo da DO (0,647) representou 27% de inibição (MARANA, 2006). Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição baseado na fórmula:  $100 - [(DO_{490} \text{ média do soro teste} \times 100) / \text{média da } DO_{490} \text{ do controle negativo}]$  (TORIONI DE ECHAIDE et al., 1998).

#### **2.4. Análise estatística:**

Foram tabulados os dados das DOs dos soros-teste obtidos no cELISA em leitor de ELISA, e calculadas as médias e submetidos à análise estatística pelo teste de Qui-Quadrado e *Odds Ratio*, mediante o programa Epi Info versão 6.04 (DEAN et al., 1994). Adotou-se 95% de nível de confiança. A análise de perfil de estabilidade e instabilidade enzoótica foi efetuada segundo Mahoney e Ross (1972).

### **3. Resultados e discussão**

Os 223 soros analisados (Tabela 1) apresentaram 131 soros positivos, resultando numa prevalência de 130 (58,74%). Este valor foi menor que os 92,94% de Andrade et al. (2001), 87,5% Vidotto et al. (1998) encontrados na região de Londrina, no Norte do Estado do Paraná e 76,10% por Yoshihara et al. (2003) na região de Umuarama, no Noroeste do Estado do Paraná utilizando o cELISA.

*A. marginale* possui a MSP5, a qual encontra-se altamente conservada nos isolados de *A. marginale*, *A. centrale* e *A. ovis* de várias regiões geográficas (VISSER et al., 1992). Kano et al. (2002) observaram sua presença nos isolados Flórida, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul. O cELISA-PR1 utilizou como antígeno a rMSP5-PR1 do isolado PR1 de *A. marginale*, com ponto discriminativo com 27% de inibição, assim os 58,74% dos bovinos da região Centro-Sul do Estado do Paraná estudados foram

soropositivos apresentando porcentagem de inibição  $\geq 27,11\%$ . Estes resultados demonstraram uma prevalência menor quando comparados à região norte e noroeste do Estado do Paraná, provavelmente devido a diferenças de temperatura e umidade entre essas regiões, que poderiam interferir no desenvolvimento do vetor *Boophilus microplus*, sugerindo região de instabilidade enzoótica de acordo com o critério estabelecido por Mahoney e Ross (1972).

Diferentes autores, estudando o comportamento da anaplasnose bovina, encontraram variações na taxa de prevalência, como de 1,17 a 2,49% na Suíça (DREHER et al, 2005), 0,89% nas regiões áridas e montanhosas da Arábia Saudita (EL-METENAWY, 2000), 31 a 37% nas regiões do semi-árido de Idaho (MAAS et al., 1986), oscilando entre 6% a 32% em diferentes regiões bolivianas (MAS et al, 2000), alcançando 80 a 99% nas regiões tropicais (PATARROYO; VIAS; GRANADO, 1978; KNOWLES et al., 1982; PAYNE; OSORIO, 1990; COSSIO-BAYÚGAR et al., 1997). Os 58,74% de prevalência, encontrados, mostraram que, no ambiente subtropical da região centro-sul do Estado do Paraná, a prevalência da anaplasnose bovina apresentou oscilação, mostrando valores mais baixos quando comparados àqueles de regiões tropicais do Estado.

No Brasil, estudos com soros bovinos do Norte Fluminense observaram que a prevalência da anaplasnose bovino variou entre 88,57-92,94%, com diferença significativa entre os municípios de área de instabilidade enzoótica, (SOUZA et al., 2000). Na região de estabilidade enzoótica semi-árida do Estado da Bahia, em quatro municípios estudados foi encontrado 94,8% e 97% de prevalência utilizando dois sistemas de ELISA (BARROS et al., 2005). A região Norte do Paraná apresentou 67,38% dos bovinos positivos analisados pela IFI (VIDOTTO et al., 1995) e 87,5% de bovinos positivos pelo cELISA (VIDOTTO et al., 1998). A taxa de soroprevalência de 58,74% encontrada mostrou-se inferior àquelas encontradas em outras regiões do Brasil, demonstrando que à medida que se dirige ao sul do país as condições climáticas vão se alterando e a prevalência da anaplasnose diminui. Observou-se que em áreas de instabilidade enzoótica a atenção quanto da presença da anaplasnose nos rebanhos deve ser aumentada, pois a possibilidade de aumento nos custos de produção podem aumentar por gastos com medicamentos, veterinários e perda de animais acometidos de anaplasnose.

Os resultados obtidos através da aplicação de questionário epidemiológico foram analisados associados com o estudo das variáveis apresentadas nas Tabelas 2 e 3, observando-se que não apresentaram resultados significativos no teste de Qui quadrado, com  $P = 0,01$  e

intervalo de confiança de 95%, quanto às diferentes características dos rebanhos, do sistema de manejo.

A raça dos animais não apresentou influência nos resultados, embora se tenha observado que os animais mestiços apresentassem um pequeno aumento na soropositividade (Tabela 2). Por outro lado, Vidotto et al. (1998) analisaram animais de raça leiteira (*Bos taurus*) e animais cruzados (*Bos taurus/Bos indicus*) e encontraram taxa de soropositividade de 87,56%; Andrade et al. (2001) examinaram somente raças leiteiras (*Bos taurus*) obtendo 92,94% de soropositivos e Yoshihara et al. (2003) encontraram um valor menor (76,88%) estudando bovinos de corte da raça Nelore (*Bos indicus*). Fatores que devem ter influenciado estas diferenças são as raças e variações climáticas entre as regiões Norte e Central que podem interferir na maior ou menor população de vetores.

O sistema de comercialização do gado, a utilização de piquetes comuns por diferentes rebanhos, aluguel de pasto, piquetes de parição, presença ou a ausência de animais silvestres, como cervídeos, capivara e outros animais nas propriedades, também não apresentaram diferença significativa no teste do Qui Quadrado (Tabelas 2 e 3).

#### **4. Conclusão**

Assim, com a prevalência de 58,74%, avaliada através do cELISA-PR1, em 223 soros bovinos, esta região apresentou-se como área de instabilidade enzoótica sendo necessária a observação quanto a infestação de carrapatos e seu controle, atenção quanto a manifestação de sinais clínicos, com animais parcialmente imunizados contra *A. marginale* e susceptíveis à surtos de anaplasmose. As características de tipo de exploração da propriedade, sistema de criação, manejo e forma de comercialização dos animais foram avaliadas. A análise estatística não demonstrou haver diferença significativa entre as variáveis estudadas e a positividade nos animais.

## Referências

- ANDRADE, G. M.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C.; YOSHIHARA, E.; KANO, F. S.; AMARAL, C. H. S. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos leiteiros e estudo sobre a dinâmica da infecção natural em bezerros holandeses no Sul do Brasil. *Semina, Ci Agrárias*, Londrina, v. 22, n. 2, p. 155-159. 2001.
- ARAÚJO, F.R.; LEAL, C.R.B.; MADRUGA, C.R.; MIGUITA, M.; CARVALHO, E.L.L. Levantamento sorológico para *Anaplasma marginale* em duas microrregiões do estado da Bahia. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 4, n. 2, supl. 2, p. 188, 1995. Resumo.
- BARROS, S. L.; MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; MENK, C. F.; ALMEIDA, M. A. O. de; 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 state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 6, p. 513-517. 2005.
- BUNDY, D.A.P.; HYLTON, G.A.; WAGNER, G.G. Bovine haemoparasitic diseases in Jamaica. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, v. 15, p. 47-48, 1983.
- COSSÍO-BAYÚGAR, R.; RODRIGUEZ, S. D.; GARCIA-ORTIZ, M. A.; GARCIA-GARCIA, D.; ABOYTES-TORRES, R. Bovine anaplasmosis prevalence in Northern Vera Cruz State, Mexico. *Prev. Vet. Med.*, v. 32, p. 165-170, 1997.
- DEAN, A. G.; DEAN, J. A.; COULOMBIER, D.; BRENDEL, K. A.; SMITH, D. C.; BURTON, A. H.; DOCKER, SULIVAN, K.; FAGAN, R. F.; ARNER, T. G. *Epi Info, Version 6: a word processing, database, and statistic program for epidemiology on microcomputers. Center for Diseases Control and Prevention. Atlanta, Georgia, 1994.* Disponível em <http://www.cdc.gov>. Acesso: 15 oct.2005.
- DREHER, U. M.; HOFMANN-LEHMANN, R.; MELI, M. L.; REGULA, G.; CAGIENARD, A. Y.; STÄRK, K. D. C.; DOHERR, M. G.; FILLI, F.; HÄSSIG, M.; BRAUN, U.; KOCAN, K. M.; LUTZ, H. Seroprevalence of anaplasmosis among cattle in Switzerland in 1998 and 2003: No evidence of an emerging disease. *Vet. Microbiol.*, v. 107, p. 71-79. 2005.
- DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettiaceae 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*. *Intl. J. Syst. and Evol. Microbiol.*, n. 51, p. 2145-2165, 2001.
- EL-METENAWY, T. M. Prevalence of blood parasites among cattle at the central area of Arabia Saudita. *Vet. Parasitol.*, v. 87, p. 231-236. 2000.
- FRAGADA, M.; CORDOVES, C.O.; PUENTES, T. Circulación de anticuerpos de hemoparásitos en ganado (*Bos taurus*) de alto valor genético en la República de Cuba. *Rev. Cub. Cienc. Vet.*, v. 22, n. 3, p. 249-255, 1991.
- GRISI, L.; MASSARD, C. L.; BORJA, G. E. M.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Veterinária*. v. 21, p. 8-10. 2002.
- IBGE. Paranacidade 2005. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/>  
[http://www.paranacidade.org.br/municipios/select\\_municipios.php](http://www.paranacidade.org.br/municipios/select_municipios.php)  
<http://www.ipardes.gov.br/>. Acesso em: 12 dez 2005.

- JONGEJAN, F.; PERRY, B. D.; MOORHOUSE, P. D. S.; MUSISI, F. L.; PEGRAM, R. G.; SNACKEN, M. Epidemiology of bovine babesiosis and anaplasmosis in Zambia. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, v. 20, p. 234-242. 1988.
- KANO, S. F.; VIDOTTO, O.; PACHECO, R. C.; VIDOTTO, M. C. Antigenic characterizations of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. *Vet. Microbiol.*, n. 87, p. 131-138. 2002.
- KNOWLES, D. P.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; PALMER, G. H.; STILLER, D.; McELWAIN, T. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *Infect. Immun.*, v. 34, n. 9, p. 2225-2230, Sept. 1996.
- KNOWLES, R.T.; MONTROSE, M.; CRAIG, T.M.; WAGNER, G.G.; LONG, R.F. Clinical and serological evidence of bovine babesiosis and anaplasmosis in St. Lúcia, *Vet. Parasitol.*, v. 10, p. 307-311, 1982.
- KREIER, J. P.; RISTIC, M. The biology of hemotrophic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, v. 35, p. 325-38, 1981.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680, 1970.
- MAS, J. J. H.; WIDDOWSON, M. -A.; CUÉLLER A. M.; RIBERA, H.; WALKER, A. R. Risk of babesiosis and anaplasmosis in different ecological zones of Santa Cruz *Vet. Parasitol.*, v. 93, p. 29-38. 2000.
- MAAS, J.; LINCOLN, S.D.; COAN, M.E., KUTLLER, K.L.; ZAUGG, J.L.; STILLER, D. Epidemiologic aspects of bovine anaplasmosis in semiarid range conditions of south central Idaho. *Am. J. Vet. Res.*, v. 47, 528-533. 1986.
- 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*. *Pes. Vet. Bras.*, v. 20, n. 3, p. 109-112. 2000.
- MADRUGA, C.R.; HONER, M.R.; ANDREOTTI, R.; ARAÚJO, F.R.; SANTARÉM, V. Prevalência de *Anaplasma marginale* em três regiões do estado da Paraíba. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA EM LÍNGUA PORTUGUESA, 6, 1994, Salvador, BA. *Anais...* Salvador, 1994, p. 350-352. Resumo.
- MAHONEY, D.F.; ROSS, D. R. Epizootiological factors in control of bovine babesiosis. *Aust. Vet. J.*, v. 48, . 292-298. 1972.
- MARANA, E. R. M. Padronização e Avaliação de um Teste de ELISA competitivo modificado para o diagnóstico da anaplasmoze bovina, baseado na Proteína Recombinante MSP5-PR1. 2006. Tese. (Doutorado em Ciências Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- MOLLOY, J. B.; BOWLES, P. M.; KNOWLES, D. P.; McELWAIN, T. F.; BOCK, R. E.; KINGSTON, T. G.; BLIGHT, G. W.; DALGLIESH, R. J. Comparison of a competitive inhibition ELISA and the card agglutination test for detection of antibodies to *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* in cattle. *Aust. Vet. J.*, v. 77, n. 4, p. 245-249, Apr. 1999.
- NIELSEN, K.; SMITH, P.; GALL, D.; ECHAIDE, S.T.; WAGNER, G.; DAJER, A. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Anaplasma marginale* in bovine sera. *Vet. Parasitol.* v. 67, p. 133-142, 1996.

- OLIVEIRA, A.A. de; PEDREIRA, P.A.S.; ALMEIDA, M.P.R.S de; OLIVEIRA, A.A.; ALMEIDA, M.P.R.S. Doenças de bezerros. II. Epidemiologia da anaplasrose no estado de Sergipe. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 44, n. 5, p. 377-386. 1992.
- PALMER, G.H. *Anaplasma vaccines*. In: I.G. WRIGHT (Ed.) Veterinary Protozoan and Hemoparasite Vaccines. Boca Raton: CRC Press, 1989. p 1-29.
- PATTARROYO, J.H.; VILLA, O.; DIAZ GRANADOS, H. Epidemiology of cattle anaplasmosis in Colombia. I. Prevalence and distribution of agglutinating antibodies. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, v. 10, p. 171-174. 1978.
- PAYNE, R. C.; OSÓRIO, O. Tick-borne diseases of cattle in Paraguay. I. Seropidemiological studies on anaplasmosis and babesiosis. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, v. 22, n. 1, p. 53-60, 1990.
- PEREZ, E.; HERRERO, M.V.; JIMENEZ, C.; CARPENTER, T.E.; BUENING, G.B. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Costa Rica. *Prev. Vet. Med.*, v. 20, n. 1-2, p. 23-31. 1994.
- RODGERS, S.J.; WELSH, R.D.; STEBBINS, M.E. Seroprevalence of bovine anaplasmosis in Oklahoma from 1977 to 1991. *J. Vet. Diag. Invest.*, v. 6, n. 2, p. 200-208. 1994.
- 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. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 20, n. 3, p. 97-101. 2000.
- TORIONI DE ECHAIDE S.; KNOWLES D.P., McGUIRE T.C., PALMER G.H., SUAREZ C.E. McELWAIN T.F. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and competitive enzyme linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein-5. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, p. 777-782. 1998.
- VIDOTTO, M. C., VIDOTTO, O., ANDRADE, G., M., PALMER, G. H., McELWAIN T. F., KNOWLES, D. P. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in cattle in Paraná State, Brazil, by MSP-5 competitive ELISA. *Ann.N. Y. Acad. Sci.* p. 424-426. 1998.
- VIDOTTO, O; YAMAMURA, M.H.; ANDRADE, G.M.; BARBOSA, C. da S.; FREIRE, R.L.; VIDOTTO, M.C. Ocorrência da *Babesia bigemina*, *B. bovis*, e *Anaplasma marginale* em rebanhos de bovinos leiteiros da região de Londrina, PR. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 4, n. 2, supl. 2, p. 184, 1995. Resumo.
- VISSER, E.S.; McGUIRE, T.C.; PALMER, G.H.; DAVIS, W.C.; SHKAP, V.; PIPANO, E.; KNOWLES, D.P. The *Anaplasma marginale* msp5 gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infect. Immun.*, v. 60, n. 12, p. 5139-5144, 1992.
- YOSHIHARA, E.; VIDOTTO, O.; YAMAMURA, M. H.; MARANA, E. R. M.; PACHECO, R.; SILVEIRA, A. P. Studies of natural infection with *Anaplasma marginale* in Umuarama municipality, Parana State, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol.*, v. 12, n. 1, p. 21-26. 2003.

Tabela 1. Número de propriedades, números total de bovinos maiores de 24 meses no circuito 4\* de produtores do Estado do Paraná (2001<sup>a</sup>), das Regionais de Ponta Grossa, Guarapuava e Laranjeiras do Sul, número de animais e propriedades amostradas pela SEAB-PR.

<b>Amostragem</b>					
<b>Tipo de exploração das propriedades</b>			<b>Total</b>		
Corte (n)	Leite (n)	Mista (n)	Propriedades amostradas (n)	Animais amostrados (n)	Amostragem de animais por sorteio sistemático (n)
69	112	117	298	1970	223

<sup>a</sup> Fonte Paraná, 2001.

\* Possui propriedades que não informaram o tipo de exploração.

Tabela 2. Resultados sorológicos de bovinos da região Centro-Sul do Paraná, 2005 obtidos pelo eELISA-PR1 contra rMSP5-PR1 de *Anaplasma marginale* associados com características de exploração submetidos à análise estatística pelos testes de Qui-Quadrado e Odds Ratio.

Variáveis	Amostras		Qui-quadrado ( $\chi^2$ )	Valor de P	OR (IC95%)
	Positivas/Total (%)				
<u>Tipo de exploração :</u>					
corte	40/74 (54,05)		1,07	0,59	NC
leite	48/77 (62,34)				
mista	40/69 (57,97)				
<u>Tipo de Criação</u>					
confinado	1/1 (100)		0,74	0,69	NC
semi-confinado	21/35 (60)				
extensivo	109/187 (58,29)				
<u>Nº de ordenha</u>					
1 x ao dia	55/103(53,40)		4,95	0,08	NC
2-3x ao dia	41/58 (70,70)				
não ordenha	33/60 (55,00)				
<u>Tipo de ordenha</u>					
manual	80/135 (59,26)		3,02	0,39	NC
mecânica ao pé	15/23 (65,22)				
mecânica em sala de ordenha	5/6 (83,33)				
não ordenha	29/56 (51,79)				
<u>Inseminação (IA)</u>					
monta natural	8/15 (53,33)		0,90	0,825	NC
IA e monta natural	16/25 (64,00)				
usa só IA	103/175/ (58,87)				
<u>Raça</u>					
zebu	29/50 (58,00)		7,38	0,117	NC
européu de leite	33/57 (57,89)				
européu corte	10/27 (37,04)				
mestiço	50/80 (62,50)				
outras raças	5/6 (83,33)				
<u>Compra de animais</u>					
sim	81/138 (58,70)		0,00	0,985	0,97
não	50/84 (59,52)				
<u>De onde</u>					
exposição	2/2 (100)		2,17	0,539	NC
leilão/feira	2/5 (40,00)				
comerciante de gado	9/15 (60,00)				
de outras propriedades	66/110 (60,00)				
<u>Venda de animais</u>					
sim	36/53 (67,92)		0,163	1,95	1,67
não	95/170 (55,88)				
<u>Para onde</u>					
exposição	2/2 (100)		3,02	0,389	NC
leilão/feira	2/5 (40,00)				
comerciante de gado	9/15 (60,00)				
de outras propriedades	66/110 (60,00)				

P= probabilidade; NC = Não Calculado

Tabela 3. Resultados sorológicos de *A. marginale* nos bovinos da região Centro-Sul do Paraná (2005), associando a presença ou ausência de outras espécies animais na propriedade, sistema de piquete para pastagem à análise estatística pelo teste de Qui-Quadrado e Odds Ratio.

Variáveis		Soros bovinos Positivos/Total (%)	Qui-quadrado ( $\chi^2$ )	Valor de P	OR (IC95%)
<b>Outros animais:</b>	<b>sim</b>	127/216 (58,80)	0,09	0,762	1,07 (0,18 < OR < 5,91)
	<b>não</b>	4/7 (57,14)			
Ovinos/caprinos:	presença	32/57 (56,14)	0,09	0,759	0,87 (0,45 < OR < 1,67)
	ausência	99/166 (59,51)			
Eqüídeos:	presença	99/171 (57,74)	1,81	0,404	0,73 (0,35 < OR < 1,49)
	ausência	33/52 (63,46)			
Suínos:	presença	87/ 149 (58,39)	0,00	0,993	0,96 (0,52 < OR < 1,76)
	ausência	44/72 (58,33)			
Aves:	presença	121/203 (59,61)	0,35	0,552	1,48 (0,53 < OR < 4,08)
	ausência	10/20 (50,00)			
Cão / gato:	presença	123/210 (58,57)	0,01	0,936	0,88 (0,24 < OR < 3,14)
	ausência	8/13 (61,54)			
Animais silvestres:	presença	63/105 (60,00)	0,02	0,901	1,07 (0,60 < OR < 1,92)
	ausência	67/115 (58,26)			
Cervídeos:	presença	43/74 (58,11)	0,03	0,854	0,99 (0,41 < OR < 2,42)
	ausência	22/32 (58,33)			
Capivara:	presença	21/37	0,00	0,991	0,92 (0,38 < OR < 2,23)
	ausência	44/75			
Outros animais	presença	30/51 (58,82)	0,00	0,971	1,09 (0,48 < OR < 2,52)
	ausência	34/60 (56,67)			
Aluga Pasto	sim	32/51 (62,74)	0,31	0,575	1,27 (0,63 < OR < 2,55)
	não	97/170 (57,06)			
Pasto em comum:	sim	29/47 (61,70)	0,05	0,830	1,14 (0,46 < OR < 2,34)
	não	102/174 (58,62)			
Piquete de parição:	sim	41/70 (58,57)	0,01	0,912	0,99 (0,53 < OR < 1,84)
	não	90/153 (58,82)			
Veterinário:	sim	35/65 (53,84)	0,56	0,455	0,77 (0,41 < OR < 1,44)
	não	92/153 (60,13)			
Tipo:	cooperativa	10/17 (58,82)	0,00	0,975	1,20 (0,34 < OR < 4,33)
	particular	25/46 (54,35)			

**Paraná**

(divisão por municípios)

■ Curitiba

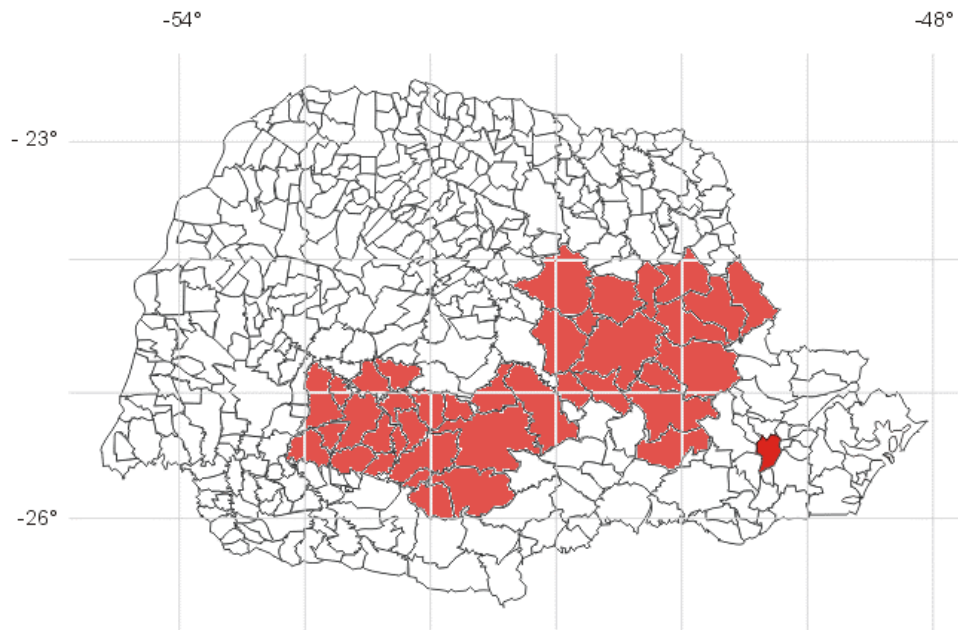


Figura 1. Mapa do Estado do Paraná, demonstrando o circuito produtor e núcleos regionais de Ponta Grossa, Guarapuava e Laranjeiras do Sul - Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SEAB-PR).

## REFERÊNCIAS

- ALDERINK, F. J.; DIETRICH, R. Anaplasmosis in Texas: epidemiological and economic data from a questionnaire survey. In: HIDALGO, R. J.; JONES, E. W. (Ed.). *Proceedings of the Seventh National Anaplasmosis Conference*. Mississippi State University Press, Starkville, MS. 1981 p. 27–44.
- ALLEMAN, A. R.; PALMER, G. H.; McGUIRE, T. C.; McELWAIN, T. F.; PERRYMAN, L. E.; BARBET, A. F. *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 3 is encoded by a polymorphic, multigene family. *Infect. Immuni*, v. 65, n.1, p. 156-163. 1997.
- ALLEMAN, A. R.; BARBET, A. F. Evaluation of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen. *J. Clin. Microbiol.* v. 34, n. 2, p. 270-276. 1996.
- ANDRADE, G. M.; MACHADO, R. Z.; VIDOTTO, M. C.; VIDOTTO, O. Immunization of bovines using a DNA vaccine (pcDNA3.1/MSP1b) prepared from the Jaboticabal strain of *Anaplasma marginale*. *Ann.N. Y. Acad. Sci.*, v. 1026, p. 257-266, 2004.
- ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; UMAKI, A. C. S.; SANTOS, L. R.; FRAGOSO, S. P.; SOARES, C. O. Clonagem e expressão do gene *msp5* de um isolado brasileiro de *Anaplasma marginale*. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 2002. (Circular Técnica, n. 29).
- AUSUBEL, F. M.; BRENDT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. *Current protocols in molecular biology*.. John Wiley & Sons, 1998.
- BARBET, A. F.; YI, J.; LUNDGREN, A. M.; MCEWEN, B. R.; BLOUIN, E. F., KOCAN, K. M. Antigenic variation of *Anaplasma marginale*I: Major Surface Protein 2 diversity during transmission between ticks and cattle. *Infect. Immun.* v. 69, n. 5, p. 3057-3066. 2001.
- BARBET, A. F.; BLENTLINGER, R.; YI, J.; LUNDGREN, A. M.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture, tick salivary glands, and cattle. *Infect. Immun.* v. 67, p. 102-107. 1999.
- BARBET A. F.; ALLRED, D. R. The *msp1β* multigene family of *Anaplasma marginale*: nucleotide sequence analysis of an expressed copy. *Infect. Immun.* v. 59, n. 3, p. 971-976, Mar. 1991.

BARBET, A. F.; PALMER, G. H.; MYLER, P. J.; MCGUIRE, T. C. Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for polypeptide Am105L. *Infect. Immun.* v. 55, p. 2428-2435. 1987.

BIBERSTEIN, E. L. Anaplasmatataceae. *Vet. Microbiol.* v. 66, n. 4, p. 304-307. 1999.

BLOUIN, E. F.; BARBET, A. F.; YI, F.; KOCAN, K. M.; SALIKI, J. T. Establishment and characterization of an Oklahoma isolate of *Anaplasma marginale* in cultured *Ixodes scapularis* cells. *Vet. Parasitol.* v. 87, p. 301-313. 2000.

BOWIE, M. V.; de la FUENTE, J.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; BARBET, A. F.; Conservation of major surface protein 1 genes of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale* during cycling transmission between ticks and cattle. *Gene.* v. 282, p. 95-102. 2002.

BRAYTON, K. A.; PALMER, G. H., LUNDGREN, A.; YI, J.; BARBET, A. F. Antigenic variation of *Anaplasma marginale msp2* occurs by combinatorial gene conversion. *Mol. Microbiol.* v. 43, n. 5, p. 1151-1159. 2002.

BRAYTON, K. A.; KNOWLES, D. P.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H. Efficient use of a small genome to generate antigenic diversity in tick-borne ehrlichial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v. 98, n. 7, p. 4130-4135, 2001.

BROWN, W. C.; BRAYTON, K. A.; STYER, C. M.; PALMER, G. H. The hypervariable region of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 2 (MSP2) contains multiple immunodominant CD4<sup>+</sup> T lymphocyte epitopes that elicit variant-specific proliferative and IFN- $\gamma$  responses in MSP2 vaccinates. *J. Immunol.* v. 170, p. 3790-3798. 2003.

BROWN, W. C.; PALMER, G. H.; LEWIN, H. A.; MCGUIRE, T. C. CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1 (MSP1), a heteromeric complex of MSP1a and MSP1b, preferentially recognize the carboxyl terminus that is conserved among strains. *Infect. Immun.* v. 60, n. 11, p. 6853-6862. 2001a.

BROWN, W. C.; MCGUIRE, T. C.; ZHU, D.; LEWIN, H. A.; SOSNOW, J.; PALMER, G. H. Highly conserved regions of the immunodominant Major Surface Protein 2 of the Genogroup II Ehrlichial Pathogen *Anaplasma marginale* are rich in naturally derived CD4<sup>+</sup> T lymphocyte epitopes that elicit strong recall responses. *J. Immunol.* v. 166, p. 1114-1124. 2001b.

BROWN, W. C.; KHKAP, V.; ZHU, D.; McGUIRE, T. C.; TUO, W.; McELWAIN, T. F.; PALMER, G. H. CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infect. Immun.* v. 66, n. 11, p. 5406-5413. 1998a.

BROWN, W. C.; ZHU, D.; KHKAP, V.; McGUIRE, T. C.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M.; PALMER, G. H. The repertoire of *Anaplasma marginale* antigens recognized by CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte clones from protectively immunized cattle is diverse and includes Major Surface Protein 2 (MSP-2) and MSP-3. *Infect. Immun.* v. 66, n. 11, p. 5414-5422. 1998b.

BUJARD, H.; GENTZ, R.; LANZER, M.; STÜBER, D.; MÜLLER, M.; IBRAHIMI, I.; HÄUPTLE, M. T.; DOBBERSTEIN, B. A T5 promoter based transcription-translaction system for the analysis of proteins in vivo. *Meth. Enzymol.* v. 155, p. 416-433. 1987.

CAMACHO-NUEZ, M.; MUÑOZ, M. L.; SUAREZ, C. E.; McGUIRE, T. C.; BROWN, W. C., PALMER, G. H. Expression of polymorphic *mspβ* genes during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia. *Infect. Immun.* v. 68, n. 4, p. 1946-1952. 2000.

CHENG, C.; SHUMAN, S. DNA strand transfer catalyzed by Vaccinia topoisomerase: ligation od DNAs containing a 3`mononucleotide overhang. *Nuc. Ac. Res.* v. 28, n. 9. p. 1893-1898. 2000

de la FUENTE, J.; PASSOS, L. M. F., Van Den BUSSCHE, R. A.; RIBEIRO, M. F. B.; FACURY-FILHO, E. J. ; KOCAN, K. M. Genetic diversity and molecular phygeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.* v. 121, p. 307-316. 2004.

de la FUENTE, GARCIA-GARCIA, J. C., BLOUIN, E. F., KOCAN, K. M. Characterization of the functional domain of major surface proteins 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells. *Vet Microbiol.* v. 91, p. 265-283. 2003.

de la FUENTE, J.; KOCAN, K. M.; GARCIA-GARCIA, J. C.; BLOUIN, E. F.; CLAYPOOL, P. L.; SALIKI, J. T. Vaccination of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture and bovine erythrocytes followed by challenge-exposure with infected ticks. *Vet. Microbiol.* n. 89, p. 239-251, 2002.

de la FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and ticks cells. *Internl. J. Parasitol*, v. 31, p. 145-153. 2001a.

de la FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHE, R.A.; KOCAN, K.M. Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). *Vet. Parasitol.*, v. 97, p. 65-76. 2001b.

de la FUENTE, J.; KOCAN, K. M. Expression of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 2 variants in persistently infected ticks. *Infect. Immun.*, v. 69, n. 8, p. 5151-5156. 2001c.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettiaceae 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*. *Intl. J. Syst. and Evol. Microbiol.*, n. 51, p. 2145-2165, 2001.

EID, G.; FRENCH, D. M.; LUNDGREN, A. M.; BARBET, A. F.; McELWAIN, T. F.; PALMER, G. H. Expression of major surface protein 2 antigenic variants during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia. *Infect. Immun.*, v. 64, n. 3, p. 836-841, 1996.

ERICKS, I. S., STILLER, D., PALMER, G. H. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, n. 8, n. 2091-2096, Aug. 1993.

ERICKS, I. S.; PALMER, G. H.; McGUIRE, T. C.; ALLRED, D. R.; BARBET, A. F. Detection and quantitation of *Anaplasma marginale* in carrier cattle by using nucleic acid probe. *J. Clin. Microbiol.*, v. 27, n. 2, n. 279-284, 1989.

FARABAUGH, P. J. Sequence of the *lacI* gene. *Nature*. v. 274, p. 765-769. 1978.

FERREIRA, A. M.; SUZART, S.; VIDOTTO, O.; KNOWLES, D. P.; VIDOTTO, M.; C. Use of repetitive DNA elements to define genetic relationships among *Anaplasma marginale* isolates. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.197, p.139-143. 2001.

FRENCH, D. M.; BROWN, W. C.; PALMER, G. H. Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. *Infect. Immun.*, v. 67, n. 11, p. 5834-5840, 1999.

FRENCH, D. M.; McELWAIN, T. F.; McGUIRE, T. C.; PALMER, G. H. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. *Infect. Immun.*, v. 66, n. 3, p. 1200-1207, 1998.

GUGLIELMONE, A. Epidemiologia y Prevencion de los Hemoparasitos (*Babesia* y *Anaplasma*) en la Argentina. In: NARI, A.; FIEL, C. *Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos*. Editorial Hemisferio Sur, 1994. Cap. 23, p. 460-479.

JANKNECHT, R.; MARTYNOFF, G.; LOU, J.; HIPSKIND, R. A.; NORDHEIM, A.; STUNNENBERG, H. G. Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *PNAS.*, v. 88, p. 8972-8976. 1991.

KANO, S. F.; VIDOTTO, O.; PACHECO, R. C.; VIDOTTO, M. C. Antigenic characterizations of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. *Vet. Microbiol.*, n. 87, p. 131-138, 2002.

KNOWLES, D. P.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; PALMER, G. H.; STILLER, D.; McELWAIN, T. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *Infect. Immun.*, v. 34, n. 9, p. 2225-2230, Sep. 1996.

KOCAN, K. M.; HALBUR, T.; BLOUIN, E. F.; ONET, V.; de la FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; SALIKI, J. T. Immunization of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture. *Vet. Parasitol.*, v. 102, p. 151-161. 2001.

KOCAN, K. M. Targeting ticks for control of selected hemoparasitic diseases of cattle. *Vet. Parasitol.*, v. 57, p. 121-151. 1995.

KREIER, J. P.; RISTIC, M. The biology of hemotrophic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, v. 35, p. 325-38. 1981.

KUTTLER, K. L.; ZAUGG, J. L.; JOHNSON, L. W. Serologic and clinical responses of preimmunized, vaccinated and previously infected cattle to challenge exposure by two different *Anaplasma marginale*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 45, p. 2233. 1984.

LEW, A. E.; BOCK, R. E.; MINCHIN, C. M.; MASAKA, S. A. *msp1* polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. *Vet. Microbiol.*, v. 86, p. 325-335. 2002.

LÖRH, C.V.; RURANGIRWA, F. R.; McELWAIN, T. F.; STILLER, D., PALMER, G. H. Specific expression of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 2 salivary gland variants occurs in the midgut and is an early event during tick transmission. *Infect. Immun.*, v. 70, n. 1, p. 114-120. 2002a.

- LÖRH, C. V.; BRAYTON, K. A.; SHKAP, V.; MOLAD, T.; BARBET, A. F.; BROWN, W. C.; PALMER, G. H. Expression of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 2 Operon-Associated proteins during mammalian and arthropod infection. *Infect. Immun.*, v. 70, n. 11, p. 6005-6012. 2002b.
- McGAREY, D. J.; BARBET, A. F.; PALMER, G. H.; McGUIRE, T. C.; ALLRED, D. R. Putative adhesions of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b. *Infect. Immun.*, v. 62, n. 14, p. 4594-4601, Oct. 1994a.
- McGAREY, D. J.; ALLRED, D. R. Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. *Infect. Immun.*, v. 62, n. 10, p. 4587-4593. Oct. 1994.
- McGUIRE, T. C.; DAVIS, W. C.; BRASSFIELD, A. L.; McELWAIN, T. F.; PALMER, G. H. Identification of *Anaplasma marginale* long-term carrier cattle by detection of serum antibody to isolated MSP-3. *J. Clin. Microbiol.*, v. 29, n. 4, p. 788-793. 1991.
- MOLLOY, J. B.; BOWLES, P. M.; KNOWLES, D. P.; McELWAIN, T. F.; BOCK, R. E.; KINGSTON, T. G.; BLIGHT, G. W.; DALGLIESH, R. J. Comparison of a competitive inhibition ELISA and the card agglutination test for detection of antibodies to *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* in cattle. *Aust. Vet. J.*, v. 77, n. 4, p. 245-249, Apr. 1999.
- MUNODZANA, D.; McELWAIN, T. F.; KNOWLES, D. P.; PALMER, G. H. Conformation dependence *Anaplasma marginale* major surface protein 5 surface-exposed B-cell epitopes. *Infect. Immun.*, v. 66, n. 6, p. 2619-2624, Jun. 1998.
- NDUNG'U, L. W.; AGUIRRE, C.; RURANGIRWA, F. R.; McELWAIN, T. F.; McGUIRE, T. C.; KNOWLES, D. P.; PALMER, G. H. Detection of *Anaplasma ovis* infection in goats by major surface protein 5 competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, n. 3, p. 675-679, Mar. 1995.
- OBERLE, S. M.; PALMER, G. H.; BARBET, A. F. Expression and immune recognition of the conserved MSP4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.*, v. 61, n. 12, p. 5245-5251. 1993.
- OBERLE, S. M.; PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; McGUIRE, T. C. Molecular size variations in an immunoprotective protein complex among isolates of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.*, v. 56, n. 6, p. 1567-1573, June, 1988.

OHASHI, N.; UNVER, A.; ZHI, N.; RIKIHISA Y. Cloning and characterization of multigenes encoding the immunodominant 30-kilodalton major outer membrane proteins of *Ehrlichia canis* and application of the recombinant protein for serodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, p. 2671-2680. 1998.

O.I.E. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Bovine Anaplasmosis. In: McElwain, T.F. (ed) Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 5<sup>th</sup> ed. Paris, França, online 2004 Part 2, Sec 2.3, Cap. 2.3.7. Disponível em: <http://www.oie.int/hs2/report.asp?> acesso em 18.09.2004.

OLIVEIRA, J. B.; MADRUGA, C. R.; SCHENK, M. A. M.; KESSLER, R. H.; MIGUITA, M.; ARAÚJO, F. R. Antigenic characterization of Brazilian isolates of *Anaplasma marginale*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 3, p. 395-400. 2003.

PALMER, G. H.; ABBOTT, J. R.; FRENCH, D. M.; McELWAIN, T. F. Persistence of *Anaplasma ovis* infection and conservation of the *msp-2* and *msp3* multigene families within the genus *Anaplasma*. *Infect. Immun.* v. 66, n. 12, p. 6035-6039. 1998.

PALMER, G. H.; McELWAIN, T. F. Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Vet. Parasitol.*, n. 57, p. 233-253, 1995.

PALMER, G. H.; EID, G.; BARBET, A. F.; McGUIRE, T. C.; McELWAIN, T. F. The immunoprotective *Anaplasma marginale* major surface protein 2 is encoded by a polymorphic multigene family. *Infect. Immun.*, v. 62, n. 9, p. 3808-3816, 1994.

PALMER, G.H. Anaplasma Vaccines. In: WRIGHT, I.G. *Veterinary protozoan and hemoparasite vaccines*. Boca Raton: Editora, 1989, p. 1-29.

PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; CANTOR, G. H.; McGUIRE, T. C. Immunization of cattle with the MSP-1 surface protein complex induces protection against a structurally variant *Anaplasma marginale* isolate. *Infect. Immun.*, v. 57, n. 11, p. 3666-3669, Nov. 1989.

PALMER, G. H.; OBERLE, S. M.; BARBET, A. F.; GOFF, W. L.; DAVIS, W. C.; McGUIRE, T. C. Immunization of cattle with a 36-Kilodalton surface major protein induces protection against homologous and heterologous *Anaplasma marginale* challenge. *Infect. Immun.*, v. 56, n. 6, p. 1526-1531. 1988a.

PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; MUSOKE, A. J.; KATENDE, J. M.; RURANGIRWA, F.; SHKAP, V.; PIPANO, E.; DAVIS, W. C.; McGUIRE, T. C. Recognition of conserved Surface Protein epitopes on *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale* isolates from Israel, Kenya and United States. *Intl. J. Parasitol.*, v. 18, n. 1, p. 33-38. 1988b.

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. *J. Clin. Microbiol.*, v. 23, n. 6, p. 1078-1083. 1986.

PALMER, G. H.; KOCAN, K. M.; BARRON, S. J.; HAIR, J. A.; BARBET, A. F.; DAVIS, W. C.; McGUIRE, T. C. Presence of common antigens, including major surface protein epitopes, between the cattle (intraerythrocytic) and tick stages of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.*, v. 50, n. 3, p. 881-886, Dec. 1985.

PALMER, G. H.; McGUIRE, T. C. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *J. Immunol.*, v. 133, n. 2, p. 1010-1015. 1984.

REYNA-BELLO, A.; CLOECKAERT, A.; VIZCAÍNO, N.; GONZATTI, M. I.; ASO, P. M.; DUBRAY, G.; ZYGMUNT, M. S. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in Venezuela. *Clin. Diagnost. Lab. Immunol.*, v. 5, n. 2, p. 259-262, Mar. 1998.

RIBEIRO, M. F. B.; PASSOS, L. M. F. Ultrastructural alterations on *Anaplasma marginale* caused by dimethyl sulfoxide. *Arq. Bras. de Med. Vet. e Zoot.*, n. 48, v. 6, p. 657-664, 1996.

RIDING, G.; HOPE, M.; WALTISBUHL, D.; WILLADSEN, P. Identification of novel protective antigens from *Anaplasma marginale*. *Vaccine*, v. 21, p. 1875-1883. 2003.

RISTIC, M. Anaplasmosis. In: RISTIC, M.; McINTYRE, I. *Diseases of cattle in the Tropics*. Martinus Nijhoff Publishers (Ed). p. 327-344. 1981.

ROSEMBERG, A. H.; LADE, B. N.; CHUI, D. LIN, S.; DUNN, J. J.; STUDIER, F. W. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*, v. 56, p. 125-135. 1987.

RURANGIRWA, F. R.; STILLER, D.; FRENCH, D. M.; PALMER, G. H. Restriction of major surface protein 2 (MSP2) variants during tick transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 96, p. 3171-3176, Mar. 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2<sup>a</sup> ed. Cold Spring USA, 3 v. 1989.

SCHWARZ, E.; SCHERRER, G.; HOBOM, G.; KÖSSEL, H. Nucleotide sequence of cro, cII and of the 0 gene in phage lambda DNA. *Nature*, v. 272, p. 410-41. 1987.

SHUMAN, S. Site-specific interaction of Vaccinia Virus Topoisomerase I com duplex DNA. *J. Biol. Chem.*, v. 206. n. 17, p. 11372-11379. 1991.

SHKAP, V.; MOLAD, T.; BRAYTON, K. A.; BROWN, W. C.; PALMER, G. H. Expression of Major Surface Protein 2 Variants with conserved T-cell epitopes in *Anaplasma centrale* vaccinates. *Infect. Immun.*, v. 70, n. 2, p. 642-648. 2002.

SHKAP, V.; PIPANO, E.; McGUIRE, T. C.; PALMER, G. H. Identification of immunodominant polypeptides common between *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale*. *Vet. Immunol Immunopathol.*, v. 29, p. 31-40, 1991.

STICH, R. W.; OLAH, G. A.; BRAYTON, K. A.; BROWN, W. C.; FECHHEIMER, M.; GREEN-CHURCH, K.; JITTAPALAPONG, S.; KOCAN, K. M.; McGUIRE, T. C.; RURANGIRWA, F. B.; PALMER, G. H. Identification of a novel *Anaplasma marginale* appendage-associated protein that localizes with actin filaments during intraerythrocyts infection. *Infect. Immun.*, v. 72, n. 12, p. 7257-7264. 2004.

STUDIER, J. W.; MOAFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, v. 189. p. 113-130. 1986.

STUDIER, J. W.; ROSEMBERG, A. H.; DUNN, J. J.; DUBENDORFF, J. W. Use of T7 RNA polimerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzimol.*, v 185. p. 60-89. 1990.

SUTCLIFFE, F.C. Complete nucleotide sequence of the *E. coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, v. 43, p. 77-90. 1979.

TEBELE, N.; McGUIRE; T. C., PALMER, G. H. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infect. Immun.*, v. 59, n. 9, p. 3199-3204, Sept. 1991a.

TEBELE, N.; PALMER, G. H. Crossprotective immunity between the Florida and a Zimbabwe stock of *Anaplasma marginale*. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, v. 23, p. 197-202. 1991b.

THEILER, A. Gall-sickness of South Africa (anaplasmosis of cattle). *J. Com. Pathol. Ther.*, v. 23, p. 98-115, 1910.

- TORIONI DE ECHAIDE, S.; KNOWLES, D. P.; MCGUIRRE, T. F.; 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. *Infect. Immun.*, v. 36, n. 3, p. 777-782, Mar. 1998.
- TUO, W.; PALMER, G. H.; MCGUIRE, T. C.; ZHU, D.; BROWN, W. C. Interleukin-12 as an adjuvant promotes immunoglobulin G and type 1 cytokine recall responses to major surface protein 2 of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.*, v. 68, n. 1, p. 270-280, Jan. 2000.
- VISSER, E.S.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H.; DAVIS, W.C.; SHKAP, V.; PIPANO, E.; KNOWLES, D.P. The *Anaplasma marginale* msp5 gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infect. Immun.*, v. 60, n. 12, p. 5139-5144, 1992.
- VIDOTTO, M. C.; KANO, S. F.; GREGORI, F.; VIDOTTO, O. Phylogenetic study of *Anaplasma marginale* isolates from Paraná State, Brazil, based on *msp1a* and *msp4* sequences. *J. Vet. Medicine*. 2006. (no prelo).
- VIDOTTO, M. C.; MCGUIRE, T. C.; McELWAIN, T. F.; PALMER, G. H.; KNOWLES Jr, D. P. Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.*, v. 62, n. 7, p. 2940-2946, July, 1994.
- VIDOTTO, O.; MARANA, E.R.M. Anaplasmosse bovina: aspectos epidemiológicos, clínicos e controle. *Semina: Ci. Agr.*, Londrina, v. 20, n. 1, p. 98-106, mar. 1999.
- VIDOTTO, O.; ANDRADE, G. M.; BARBOSA, C. S.; FREIRE, R. L.; ROCHA, M. A.; SILVA, S. S. Frequência de anticorpos contra *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale* em rebanhos de bovinos leiteiros da região de Londrina, Paraná. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v. 49, n. 5, p. 655-659, 1997.
- VLIET, A. H., van; JONGEJAN, F.; KLEEF, M. van; ZEIJST B. A. van der. Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the gene encoding the immunodominant 32-kilodalton protein of *Cowdria ruminantium*. *Infect Immun.* v. 62, p. 1451-1456. 1994.
- WAGHELA, S. D.; MELENDY, D.; CRUZ, D.; WAGNER, G. G. Antigenic analysis of *Anaplasma marginale* grown in bovine erythrocytes co-cultures with bovine endothelial cells. *Vet. Parasitol.*, v. 94, p. 133-139. 2000.

## **ANEXOS**

**Anexo 1**

**BRUCELOSE BOVINA E BUBALINA****Estudo soroepidemiológico**

1- Identificação:										02- Data da visita e colheita / /									
Município: _____ UF _____										03- Código do rebanho no estudo (8 dígitos)									
Proprietário _____										04 - Coordenadas									
Propriedade: _____										Lat ____° ____' Lon ____° ____'									
Código de cadastro no serviço de defesa _____										Altitude _____									
05- Tipo da Exploração: <input type="checkbox"/> corte <input type="checkbox"/> leite <input type="checkbox"/>																			
06- Tipo de Criação: <input type="checkbox"/> confinado <input type="checkbox"/> semi-confinado <input type="checkbox"/> extensivo																			
07- N° de Ordenhas por dia: <input type="checkbox"/> 1 ordenha <input type="checkbox"/> 2 ou 3 ordenhas <input type="checkbox"/> não ordenha																			
08- Tipo de Ordenha: <input type="checkbox"/> manual <input type="checkbox"/> mecânica ao pé <input type="checkbox"/> mecânica em sala de ordenha <input type="checkbox"/> não ordenha																			
09- Produção de leite: a) n° de vacas em lactação: _____ b) Produção diária de leite na fazenda: _____ litros																			
10- Usa inseminação artificial? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> usa inseminação artificial e touro <input type="checkbox"/> usa só inseminação artificial																			
11- Raça predominante - Bovinos: <input type="checkbox"/> zebu <input type="checkbox"/> europeu de leite <input type="checkbox"/> europeu de carne <input type="checkbox"/> mestiço <input type="checkbox"/> outras raças - Bubalinos: <input type="checkbox"/> murrh <input type="checkbox"/> mediterrâneo <input type="checkbox"/> carabao <input type="checkbox"/> jaffarabadi <input type="checkbox"/> outras raças																			
12(a)- Bovinos existentes									12(b)- Bubalinos existentes										
Machos Castrados		Machos inteiros (meses)				Fêmeas (meses)				Machos Castrados		Machos inteiros (meses)				Fêmeas (meses)			
Total		0-6	6-2	12-24	>24	0-6	6-2	12-24	>24	Total		0-6	6-2	12-24	>24	0-6	6-2	12-24	>24
13- Outras espécies na propriedade: <input type="checkbox"/> ovinos/caprinos <input type="checkbox"/> equídeos <input type="checkbox"/> suínos <input type="checkbox"/> aves <input type="checkbox"/> cão <input type="checkbox"/> gato																			
14- Espécies silvestres em vida livre na propriedade: <input type="checkbox"/> não tem <input type="checkbox"/> cervídeos <input type="checkbox"/> capivaras <input type="checkbox"/> outras .....																			
15- Alguma vaca/búfala abortou nos últimos doze meses? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não sabe																			
16- O que faz com feto abortado e placentas? <input type="checkbox"/> enterra/joga em fossa/queima <input type="checkbox"/> alimenta porco/cão <input type="checkbox"/> não faz nada																			
17- faz diagnóstico de brucelose? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim Regularidade dos testes: <input type="checkbox"/> uma vez por ano <input type="checkbox"/> duas vezes por ano <input type="checkbox"/> quando compra animais <input type="checkbox"/> quando há casos na fazenda <input type="checkbox"/> quando exigido para trânsito/eventos/crédito																			
18- Compra fêmeas ou machos com finalidade de reprodução? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim Onde/de quem? <input type="checkbox"/> em exposição <input type="checkbox"/> em leilão/feira <input type="checkbox"/> comerciante de gado <input type="checkbox"/> diretamente de outras fazendas																			
19- Vende fêmeas ou machos para reprodução? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim																			
20- Vacina contra brucelose? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim, apenas fêmeas até 8 meses de idade <input type="checkbox"/> sim, fêmeas em qualquer idade																			
21- Local de abate das fêmeas e machos adultos no fim da vida reprodutiva: <input type="checkbox"/> na própria fazenda <input type="checkbox"/> em estabelecimento sem inspeção veterinária <input type="checkbox"/> em estabelecimento de abate com inspeção veterinária <input type="checkbox"/> não abate																			
22- Aluga pastos em algo época do ano? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim																			
23- Tem pastos em comum com outras propriedades? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim																			
24- Existem na propriedade áreas alagadiças às quais o gado tem acesso? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim																			
25- Tem piquete separado para fêmeas na fase de parto e/ou pós-parto? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim																			
26- A quem entrega leite? <input type="checkbox"/> cooperativa <input type="checkbox"/> laticínio <input type="checkbox"/> direto ao consumidor <input type="checkbox"/> não entrega																			
27 Resfriamento do leite: <input type="checkbox"/> não faz <input type="checkbox"/> faz Como: <input type="checkbox"/> em resfriador ou tanque de expansão próprio <input type="checkbox"/> em resfriador ou tanque de expansão coletivo																			
28_ a entrega do leite é feita a granel? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim																			
29- Produz queijo e/ou manteiga na propriedade? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim Finalidade: <input type="checkbox"/> p/ consumo próprio <input type="checkbox"/> p/venda																			
30 Consome leite cru? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim																			
31- Tem assistência? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim De que tipo? <input type="checkbox"/> veterinário da cooperativa <input type="checkbox"/> veterinário particular																			

Nome do Veterinário \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

**Anexo 2**

## 1. Extração de DNA do isolado regional PR1 de *A. marginale* de sangue bovino.

### Método Purogene® Genta System

01. Descongele o sangue armazenado à – 20°C em banho-maria a 37°C.
02. Adicione 1 mL de reagente RBC em tubo de 1,5mL.
03. Acrescente 300mL do sangue e incube 10 minutos à temperatura ambiente.
04. Centrifugue por 2 min. a 13000 rpm em microcentrífuga
05. Remova o sobrenadante com cuidado, deixando um volume residual de 10 a 20 µL.
06. Adicione ao sedimento 300 µL de solução de lise celular, 6µL de proteinase K (10 mg/mL para uma concentração final de 200µL/mL) homogeneíze em seguida.
07. Incube por uma hora a 37°C.
08. Resfrie as amostras no gelo.
09. Adicione 200µL de solução de precipitação de proteínas e homogeneíze.
10. Centrifugue a 13000 rpm por três minutos para formação de pellet escuro.
11. Pipete 300µL de isopropanol 100% em tubo novo estéril e adicione o sobrenadante obtido.
12. Misture as amostras, invertendo-as delicadamente até a homogeneização completa.
13. Centrifugue a 13000 rpm por três minutos.
14. Despreze o sobrenadante e drene o tubo com papel absorvente.
15. Adicione 300 µL de etanol 70%, misture, centrifugue a 13000 rpm por dois minutos. Despreze o etanol e drene os tubos.
16. Deixe secar.
17. Adicione 100 µL de solução de hidratação.
18. Refrigere durante a noite.
19. Quantificada em gel de agarose a 1%
20. Estoque as amostras a – 20°C até o uso.

## 2. Amplificação da amostra de *A. marginale* da cepa regional PRL1 pela PCR:

Amplificação do gene *msp5* com Platinum Pfx DNA polimerase (Invitrogen®)

- |                                  |          |   |
|----------------------------------|----------|---|
| 1. Tampão Pfx 10x .....          | 2,5 µL   |   |
| 2. Mix 10 mM dNTP .....          | 0,5 µL   |   |
| 3. 50 mM MgSO <sub>4</sub> ..... | 0,75 µL  |   |
| 4. Iniciador 1 .....             | 1,0 µL   | 5'AGA ATT TTC AAG ATT GTG 3' (posições 121 a 138), com sítio de restrição para a enzima <i>Bam</i> HI |
| 5. Iniciador 2 ....              | 1,0 µL   | 5'AGA ATT AAG CAT GTG ACC GCT G 3' (posições de 725 a 747) sem o código de parada.                    |
| 6. DNA template .....            | 1,0 µL   |   |
| 7. Pfx Polimerase .....          | 0,5 µL   |   |
| 8. Água Ultrapura .....          | 16,75 µL |   |

### Agar de Agarose

Programa de 30 ciclos em Termociclador

- |            |    |            |    |
|------------|----|------------|----|
| 94°C ..... | 5' | 68°C ..... | 1' |
| 94°C ..... | 1' | 58°C ..... | 1' |
| 68°C ..... | 7' | 4°C .....  | ∞  |

**Gel de agarose 1% (Método segundo Sambrook et al., 1989).**

1. Pese 0.5 g de ágar de agarose em erlenmeyer previamente tarado
2. Adicione 50 mL o tampão TE e funda o ágar
3. Adicione 25 µL de brometo de etídeo 0,1% quando estiver a 50-60°C.
4. Coloque o ágar em recipiente previamente preparado para a solidificação.
5. Identifique a concentração de agarose utilizada.

**Solução para coloração do gel de agarose com brometo de etídeo 0,5mg/mL**

Brometo de etídeo [1 mg/mL] .....50 µL  
 Água destilada ..... 100 mL

**Solução de brometo de etídeo 1%**  
 - brometo de etídeo ..... 0,1 g  
 - Água destilada ..... 10 mL  
 Deixe escuro por 15 minutos

**Solução de uso: brometo de etídeo 0,1% concentração de 1mg/mL (1:10)**

- solução de brometo de etídeo 1% 1 mL  
 - água destilada ..... 10 mL

**Modo de Preparar Gel de Agarose 1%**

1. Dilua o Brometo de Etídeo em água ultrapura, deposite a solução em recipiente para submergir e manusear o gel, mantenha a solução ao abrigo da luz.
2. Deposite o gel na solução de brometo de etídeo por 10 a 15 minutos. Não é necessário corar em gel recém preparado.

**Corrida em Ágar de Agarose 1%**

1. Deposite as amostras nas canaletas do gel de acordo com seqüência pré determinada:.

1. controle λ (50 ng / 10 µL) .....10 µL  
 2. DNA da amostra .....5 µL + Ficoll..... 1 µL  
 3. DNA da amostra .....10 µL + Ficoll.....2 µL

2. Regule a fonte para 100 V e 50 mA,

3. Deixe correr até o final do gel, sem deixar o corante indicador cair na solução de corrida.

## Protocolo Kit Concert™ Extraction System (GIBCO BRL)

1. Aqueça Água Ultrapura a 65-70°C.
2. Mantenha em microtubo a 50 °C em Banho Maria.
3. Corte o gel na região da banda de DNA, utilizando UV de ondas longas na câmara escura.
4. Mantenha o gel por tempo  $\leq 2$  horas em microtubo de prolipropileno de 1-5 mL e adicione 30  $\mu$ L de tampão de solubilização de gel L1 para cada 10 mg de gel.
5. Solubilize o gel por incubação a 50°C por pelo menos 15 minutos.
6. Coloque o gel dissolvido em tubo de 2 mL para lavagem, centrifugar a  $\geq 12000$  rpm por um minutos e descarte o sobrenadante.
7. Adicione 500 $\mu$ L de tampão de solubilização (L1), incube a temperatura ambiente por um minuto, centrifugue  $\geq 12000$  rpm por um minuto e descartar o sobrenadante.
8. Adicione 700 $\mu$ L de tampão de lavagem (L2) (200 $\mu$ L de L2 mais 500  $\mu$ L de etanol 100%), incube por cinco minutos em temperatura ambiente e centrifugue  $\geq 12000$  rpm por um minuto e descarte o sobrenadante. Centrifugue  $\geq 12000$  rpm por um minuto novamente e descarte o sobrenadante.
9. Elua o DNA em tubo com filtro dentro de outro microtubo limpo. Adicione 25  $\mu$ L de água ultrapura quente diretamente dentro do tubo, incube por um minuto em temperatura ambiente e centrifugue a  $\geq 12000$  rpm por dois minutos.
10. Separe o produto amplificado resultante em 2% TBE (89 mM Tris–borato, 2mM EDTA, pH 8) em gel de agarose utilizando padrões de 100 bp como padrão (100 bp DNA ladder-Life Technologies, MD, USA). Os géis foram visualizados com brometo de etídeo em luz UV e fotografados.

### 1. TEB [5x] Solução Estoque

Tris Base .....	54,00 g .....	27,00 g .....
Ácido bórico .....	27,50 g .....	13,74 g .....
EDTA .....	2,65 g .....	2,23 g .....
Água Ultrapura q.s.p..	1000 mL .....	500 mL .....

### TEB [1X]

### 2. Corante para corrida eletroforética [5x] com Ficoll

Ficoll .....	1,25 g (armazenada a vácuo à temperatura ambiente)
Azul de bromofenol (AB) .....	0,0125 g
TEB [5x] q.s.p. ....	10 mL

Concentração final de: Ficoll 2,5% e Azul de bromofenol (AB) 0,025 %

1. Prepare em pequenas quantidades
2. Aliquote em microtubos de 1,5 mL com o volume de 1000  $\mu$ L.
3. Identifique e date.

### 3. Corante com Ficoll para produtos de PCR

1. Ficoll ..... 1,5 g
2. Xylenecyanol ..... 0,0125 g
3. Água destilada q.s.p. .... 10 mL
4. Aliquote em microtubos de 1,5 mL com o volume de 1000  $\mu$ L, identifique e date.

### 4. Preparação de $\lambda$ DNA em diluição para uso – 50 $\mu$ g / 10 $\mu$ L

Utilizado para quantificação de DNA produto de PCR e de Extração de Plasmídeo

- \* Padrão  $\lambda$  solução estoque (freezer) 500 $\mu$ g  $\mu$ g/mL (0,504 $\mu$ g/ $\mu$ L) ..... 5  $\mu$ L
- \* TE (Tris-HCl 10 mM + EDTA 1 mM pH 8,0) ou água ultrapura ..... 395  $\mu$ L
- \* Ficoll com Xylenecyanol [5x] PCR xxy 1,57 ..... 100  $\mu$ L
- ou Ficoll com azul de bromofenol [5x] ..... 100  $\mu$ L

Prepare estoque de 500  $\mu$ L para 50 reações e use 10  $\mu$ L por reação.

### 5. Preparação de $\lambda$ DNA/Hind

Utilizado para se observar a posição das bandas frente ao padrão de Peso Molecular.

- A utilização do padrão com concentração 2 vezes maior é para verificar a presença de uma banda de 0,37 Kb após a clivagem do DNA com a enzima de restrição Eco RV.
- Para a evidenciação de bandas com Pesos Moleculares maiores usa-se uma concentração menor, duas vezes mais diluída, observando-se o Peso Molecular da banda do DNA estudado.

Padrão $\lambda$ Hind Solução estoque 500 $\mu$ g diluída para 250 $\mu$ g .....	20 $\mu$ L	10 $\mu$ L
Ficoll [5x] .....	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
Água Ultrapura .....	60 $\mu$ L	70 $\mu$ L
Volume total .....	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L

### 4. Preparação do Vetor

1. Clive o gene *msp5* (5  $\mu$ L) foi clivado com a enzima de restrição *BamHI* (1 $\mu$ L), para a obtenção de extremidade coesiva (5'G↓GATCC3' e 3'GTC↑G5') em seu início, em 20  $\mu$ L de reação em Banho Maria a 37°C por três horas.
2. Clive o vetor pRSET<sub>B</sub> com a endonuclease de restrição *BamH I* (5'G↓GATCC3' e 3'GTC↑G5') em extremidade coesiva na posição 193, linearizando em banda única de 2.9 Kb com o peso molecular visualizado em gel de agarose 1%.
3. Clive novamente o vetor pRSET<sub>B</sub> com a endonuclease de restrição *Pvu II*, em extremidade abrupta em 5' (5'CAG↓CTG3' e 3'GTC↑GAC5') na posição 215 do vetor.
4. Quantifique em gel de agarose 1% para posterior ligação com o gene de interesse.

## 5. Clonagem do plasmídio pRSET B/*msp5*

### 5.1. A ligação do plasmídio pRSET<sub>B</sub>/*msp5*

1. Pipete 2 µL de Tampão de reação ligase 5X
2. Adicione 0,05 µmol do vetor de DNA pRSET<sub>B</sub>/*Bam*HI/*Pvu*II
3. Adicione 0,15 µmol do inserto *msp5/Bam*HI .
4. Adicione uma unidade de T4 DNA Ligase ( Invitrogen®).
5. Pipete água Ultrapura autoclavada q.s.p. 10 µL
6. Incube durante a noite a 16°C.

### 6. Transformação da receptora competente *E. coli* One Shot™ TOP 10 (Invitrogen®) com o plasmídio pRSET<sub>B</sub> (Invitrogen®) com DNA do gene *msp5* de *A. marginale* da cepa regional PR1:

01. Acerte o banho Maria para 42°C.
02. Prepare as placas com agar LB com ampicilina a 50 µg/mL
03. Aqueça o meio SOC (-80°C) à temperatura ambiente
04. Retire a bactéria *E. coli* One Shot® TOP 10 quimicamente competente do freezer -80°C e descongele em gelo picado e agite gentilmente.
05. Adicione cinco µL da solução contendo DNA da amostra com 5 ηg da amostra e misture gentilmente.
06. Incube no gelo por 30 minutos.
07. Aqueça 30 segundos a 42°C, sem agitação.
08. Transfira os microtubos para o gelo.
09. Retire o meio SOC do freezer -20°C e descongele a temperatura ambiente. Adicione 250 µL do meio SOC aos microtubos incubados no gelo.
10. Tampe firmemente os microtubos, prenda-os verticalmente para uma maior aeração e incube a 37°C por uma hora com agitação horizontal de 200 rpm.
11. Inocule o volume da reação de transformação da *E. coli* One Shot TOP 10 em 10 mL de caldo LB com 100 µg/mL de ampicilina.
12. Incube 18 horas a 37°C com agitação de 200 rpm.
13. Agite o tubo horizontalmente a 200 rpm (Shaker - BOD) à 37°C por 30 minutos.
14. Semeie 100 e 200 µL de cada microtubo de transformação nas placas de Petri com ágar LB utilizando alça de Drigalski, para obtenção de colônias isoladas. Incube por 18 horas a 37°C.
15. Selecione cinco colônias isoladas da placa com ágar LB com para análise na sequência do experimento.
16. Repique cada colônia em tubo com três mL de caldo LB com 100 µg/mL de ampicilina. Incube à 37°C sob agitação por 18 horas.
09. Deposite 500 µL da cultura em microtubo e centrifugue a 14000 rpm por 1 minuto.
10. Despreze o sobrenadante.
11. Adicione 100 µL de água ultrapura ao pellet e ressuspenda-o.
12. Ferva por 10 minutos e centrifugue a 14000 rpm por 1 minuto.
13. Retire 75 µL para verificação dos clones através da PCR.

#### Caldo Lauria Bertani (LB)

Triptona .....	10 g
Extrato de levedura .....	5 g
Na Cl .....	5 g
Água Destilada q.s.p. ....	1000 mL

Acerte o pH da solução para pH 7,0 e autoclave por 15 minutos.

- Para meio sólido adicionar ágar a 1,5% e para meio-sólido adicionar ágar a 0,7%

## 7. EXTRAÇÃO DE PLASMÍDIO POR LISE ALCALINA (MINI PREP) (SAMBROOK et al., 1986)

01. Inocule a bactéria em 3 mL de caldo LB com ampicilina 100µg/mL por 18 a 24 horas a 37°C.
02. Passe 1,5 mL da cultura para o microtubo, centrifugue a 14000 rpm por 1 minuto.
03. Despreze o sobrenadante vertendo o microtubo, deixando o pellet com a bactéria a mais seca possível.
04. Adicione 100 µL da **solução I** gelada (para lavar), ressuspensa o pellet no Vortex, incube no gelo à - 20°C por 5 minutos.
05. Adicione 200 µL da **solução II** (para estourar e precipitar o material genético em pH 13), misture várias vezes por inversão e incube no gelo por 5 minutos.
06. Adicione 150 µL da **solução III** (precipita todo o material genético e refaz o ext do plasmídeo pequeno), misture várias vezes por inversão.  
\* Trate cada microtubo com 1µL com RNase (10 mg/mL) e incube no gelo por 5 minutos.
07. Centrifugue a solução por 5 minutos a 13000 rpm à temperatura ambiente.
08. Transfira cuidadosamente o sobrenadante para microtubo novo.
09. Adicione 450 µL de isopropanol. Misture por inversão. Incube a temperatura ambiente por 5 a 10 minutos.
10. Sedimente o DNA à temperatura ambiente a 14000 rpm por 15 minutos.
11. Despreze o sobrenadante, invertendo o microtubo para secar na ventilação do fluxo laminar por 5 minutos.
11. Adicione 25 µL de TE Tris-HCl 10mM – EDTA 0,1 mM pH 8,0 ou água ultrapura.
12. Proceda a corrida em gel de agarose 1%: 5 µL da amostra + 5µL de água + 2µL de Ficoll.

### Reagente e Soluções para MIMIPREP

#### Solução I – 125 mL

50 mM glicose .....	1,126 g
25 mM Tris-HCl pH 8,0 .....	0,378 g
10 mM EDTA .....	0,465 g
Água Ultrapura q.s.p. ....	125 mL

#### Glicose

1 M .....	180,16 g	1000 mL
50 mM .....	9,008 g	1000 mL
50 mM .....	1,126 g	125 mL

#### Solução II

NaOH 0,2 N .....	1 g
Triton-X 100 para sol. 1% .....	1,25 mL
Água ultrapura q.s.p.....	125 mL

#### Solução III

Acetato de Potássio 5 M .....	60,0 mL
Ac. Acético Glacial pH 4,8 (fita)..	11,5 mL
Água destilada .....	22,5 mL

#### EDTA 10 mM

1 M .....	372,24 g	1000 mL
10 mM .....	3,7224 g	1000 mL
10 mM .....	0,4653 g	125 mL

#### Hidróxido de Sódio (NaOH)

1 N .....	40 g	1000 mL
0,2 N .....	8 g	1000 mL
0,2 N .....	1 g	125 mL

#### Acetato de Potássio 5 M

1 M .....	98,2 g	1000 mL
5 M .....	491,0 g	1000 mL
5 M .....	29,46 g	60 mL

- \* Ac. Acético é para acertar o pH 4,8
- \* Completar para 125 mL com Ácido Acético?

- A Solução II deve ser invertida várias vezes até aparecer flocos.
- Quando abaixa o pH os materiais genéticos grandes não se refazem, mas os plasmídios pequenos conseguem refazer a sua estrutura original condensada.
- Na Solução III fica todo o material genético, menos o plasmídio pequeno, que fica no sobrenadante. O isopropanol precipita o plasmídio pequeno.

## 8. Transformação da receptora competente *E. coli* BL Star (DE 3) One Shot™ com o plasmídio pRSET B (Invitrogen®) com DNA do gene *msp5* de *A. marginale* do isolado regional PRL1:

### 8.1. Transformação:

01. Retire a *E. coli* a BL 21 Star (DE 3) One Shot do freezer – 80°C e descongele no gelo para proceder à transformação.
02. Adicione ao microtubo com *E. coli* a BL 21 Star (DE 3) One Shot um volume de 1 a 5 µL com 10 ng do DNA da amostra, misture delicadamente com a pipeta com movimentos circulares (sem pipetar para cima e para baixo).
03. Incube no gelo por 30 minutos.
04. Aqueça 30 segundos a 42°C, sem agitação
05. Transfira os microtubos para o gelo.
06. Retire o meio SOC do freezer – 20°C e descongele a temperatura ambiente. Adicione 250 µL do meio SOC aos microtubos incubados no gelo.
07. Tampe firmemente os microtubos, prenda-os verticalmente para uma maior aeração e incube a 37°C por 30 minutos com agitação horizontal de 200 rpm.
08. Inocule o volume da reação de transformação da *E. coli* BL 21 Star (DE 3) One Shot em 10 mL de caldo LB com 100 µg/mL de ampicilina (200 µL de ampicilina na concentração estoque de 5 mg/mL).
09. Incube 18 horas a 37°C com agitação de 200 rpm.
10. Teste as proteínas após a lise celular analisando quanto à solubilidade (no sobrenadante) e insolubilidade (no sedimento), itens **01** e **02**.

### 8.2. Expressão (piloto)

01. Inocule 500 µL da cultura, incubada durante a noite, em erlenmeyer contendo 10 mL de caldo LB com 100 µg/mL de ampicilina.
02. Incube por 2 horas sob agitação a 200 rpm a 37°C.  
Verifique a DO<sub>600</sub> ⇒ 0,5 – 0,8 (mid log).
03. Divida a cultura em culturas de cinco mL, **A** cultura induzida por IPTG\* e **B** cultura não induzida. Adicione IPTG na concentração final de 0,5 a 1,0 mM, na cultura **A**.
04. Remova 500 µL de cada cultura, centrifugue a velocidade máxima (13000 rpm) por 30 segundos.
05. Congele o pellet de células a – 20°C. Este é o tempo do ponto 0 das amostras.
06. Continue a incubar as culturas a 37°C com agitação. Tome alíquotas 500 µL de cada cultura, induzida e não induzida, de uma em uma hora, por 4 a 6 horas e proceda conforme o descrito nos passos 4 e 5.

### 8.3. Preparação das amostras para proteínas solúveis

**Obs.:** Antes de iniciar:

01. Prepare o gel de poliacrilamida, o SDS-PAGE, para analisar a presença de proteínas solúveis nas amostras.
02. Ressuspenda o sedimento das amostras induzidas e não induzidas por IPTG coletadas em 80µL em tampão da amostra SDS-PAGE [1x].
03. Ferva por 5 minutos e centrifugue brevemente.
04. Aplique 5 – 10 µL de cada amostra em gel SDS-PAGE para a corrida eletroforética. Estoque o restante a – 20°C.

### 8.4. Preparação das amostras para proteínas solúveis / insolúveis.

01. Descongele o pellet obtido e ressuspenda-o em 500 µL de tampão de lise.
02. Congele a amostra em gelo seco ou nitrogênio líquido e descongele a 42°C. Repita 2 a 3 vezes.  
**Nota:** Para facilitar a lise, pode ser necessário adicionar lisozima ou sonicar as células.
03. Centrifugue a 13000 rpm em microcentrífuga por 1 minuto a 4°C para a obtenção de pellets de proteínas insolúveis. Transfira o sobrenadante para microtubo resfriado.

### Reagentes e Soluções utilizados para preparação do Gel de Poliacrilamida – SDS-PAGE

#### Acrilamida 30% (Maniatis)

Acrilamida ..... 29 g  
 Bis acrilamida ..... 1 g  
 Água ultrapura ..... 100 mL

Misturar a bis acrilamida em 40 mL de água e agitar por pelo menos 1 hora.

Acrescentar a acrilamida com mais 50 mL de água, agitando até dissolver. Checar o pH 7,0 e o volume acertar para 100 mL .

Estocar em geladeira em frascos escuros.

Usar filtro 0,45µm (Nalgene Filter) para esterilizar a solução

#### Solução corante para proteínas

Ácido acético	35,0 mL	17,50 mL	7,2 mL
Metanol	250,0 mL	125,00 mL	72,0 mL
Brilhante R-250	1,25 g	0,625mg	0,36 mg
Água ultrapura q.s.p.	500,00mL	250,00mL	144,0 mL
			(69,8 mL)

\* A solução deve ser homogeneizada e filtrada.

\* Pode ser reutilizada.

#### Solução descorante para proteínas

Água ultrapura	50 %	600 mL
Metanol	40%	400 mL
Ácido acético	10 %	100 mL

\* A solução pode ser reutilizada após filtração em carvão ativado.

**Reagentes e Soluções utilizados para preparação do  
Gel de Poliacrilamida – SDS-PAGE**

**Gel separador (Slab gel)**

	15%	15 %	12 %	12 %	8 %
Água Ultrapura	3,78 mL	7,56 mL	10,30 mL	2,75 mL	14,20 mL
Tris/SDS pH 8,8	4,00 mL	8,00 mL	7,60 mL	2,03 mL	7,50 mL
Acrilamida 30%	8,00 mL	16,00 mL	12,00 mL	3,20 mL	8,00 mL
Persulfato de amônia	160 µL	320 µL	300,00 µL	80,00 µL	300,00 µL
TEMED	6,4 µL	12,8 µL	12,00 µL	3,20 µL	18,00 µL
	16,00 mL	≅32,00 mL	30,00 mL	8,00 µL	30,00 µL

**Tris / SDS 1,5 M pH 8,8**

Tris base (PM 121,14)	18,171 g
SDS	0,4 g
Água ultrapura	60,00 mL
Ajuste o pH para 8,8 com HCl 10N, deixar over night o conferir o pH no outro dia. Se estável completar o volume	
Água ultrapura q.s.p.	100,00 mL

\* Guardar em frascos plásticos para manter o pH

**Tris / SDS 0,5 M pH 6,8**

Tris base (PM 121,14)	6,055 g
SDS	0,4 g
Água ultrapura	60,00 mL
Ajuste o pH para 6,8 com HCl 10N, deixar over night, e conferir o pH no outro dia. Se estável, completar o volume.	
Água ultrapura q.s.p.	100,00 mL

\* Guardar em frascos plásticos para manter o pH

**Gel Concentrador (Stacking gel) 5,2%**

Água ultrapura	2,80 mL	1,68 mL	5,6 mL
Tris/SDS pH 6,8	1,25 mL	0,75 mL	2,5 mL
Acrilamida 30%	0,90 mL	0,54 mL	1,8 mL
Persulfato de amônia	25,00 µL	15,00 µL	50,00 µL
TEMED	2,50 µL	1,50 µL	5,00 µL
	5,00 mL	1,87 mL	10,00 mL

**Tris-HCl 1,5 M pH 8,8**

Tris base (PM 121,14)	18,171 g
Água ultrapura	50,00 mL
Ajuste o pH para 8,8 com HCl 10N	
Água ultrapura q.s.p.	100,00 mL

\* Guardar em frascos plásticos para manter o pH

**Tampão de glicina 1X (tampão de corrida) pH 8,8**

Tris base	3,0 g (25,0 mM)
Glicina	14,4 g (19,2 mM)
SDS	1,0 g (0,1 %)
Água ultrapura q.s.p.	1,0 L

Acerte o pH com NaOH 10 N

**Tris-HCl 1,0 M pH 6,8**

Tris base (PM 121,14)	12,114 g
Água ultrapura	60,00 mL
Ajuste o pH para 6,8 com HCl 10N	
Água ultrapura q.s.p.	100,00 mL

\* Guardar em frascos plásticos para manter o pH

**Tampão da Amostra SDS-PAGE 1 X [ ]**

Solução Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 .....	1,25 mL
Glicerol (100%) .....	1,00 mL
$\beta$ Mercaptoetanol .....	0,2 mL
Azul Bromofenol .....	0,01 g
SDS.....	0,2 g
Água Ultrapura estéril q.s.p .....	10 mL

**Tampão da Amostra SDS-PAGE 3 X [ ]**

Solução Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 .....	3,75 mL
Glicerol (100%) .....	3,00 mL
$\beta$ Mercaptoetanol .....	0,6 mL
Azul Bromofenol .....	0,03 g
SDS.....	0,6 g
Água Ultrapura estéril q.s.p .....	10 mL

**Tampão da Amostra SDS-PAGE 5 X [ ]**

Solução Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 .....	1,0 mL
Glicerol (100%) .....	1,6 mL
$\beta$ Mercaptoetanol .....	0,4 mL
Azul Bromofenol (Sol 0,5%) .....	0,4 mL
SDS 10% .....	1,6 mL
Solução azul bromofenol 0,5% (0,05g em 10 mL de água ultrapura) .....	0,4 mL
Água Ultrapura estéril .....	3,0mL

**SDS 10%**

Dodecil Sulfato de Sódio .....	10 g
Água deionizada q.s.p. ....	100 mL

Aquecer a 68°C para dissolução

Ajustar o volume para 100 mL

Estocar a Temperatura ambiente.

**Tampão da Amostra SDS-PAGE 2 X [ ]**

Solução Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 ....	2,50 mL
Glicerol (100%) .....	2,00 mL
$\beta$ Mercaptoetanol .....	0,4 mL
Azul Bromofenol .....	0,02 g
SDS.....	0,4 g
Água Ultrapura estéril q.s.p .....	10 mL

**Tampão da Amostra SDS-PAGE 4 X [ ]**

Solução Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 .....	5 mL
Glicerol (100%) .....	4,00 mL
$\beta$ Mercaptoetanol .....	0,8 mL
Azul Bromofenol .....	0,04 g
SDS.....	0,8 g
Água Ultrapura estéril q.s.p .....	10 mL

**Tampão da Amostra SDS-PAGE 3 X [ ]**

Solução Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 .....	0,5 mL
Glicerol (100%) .....	1,5 mL
$\beta$ Mercaptoetanol .....	0,2 mL
Azul Bromofenol (0,513 mL).....	0,0004 g
SDS.....	0,2 g
Água Ultrapura estéril q.s.p .....	1,0 mL

**\* comparar com a cor de um preparado anterior**

**Acrilamida 30% (Maniatis)**

Acrilamida .....	29 g
Bis acrilamida .....	1 g
Água ultrapura .....	100 mL

Misturar a bis acrilamida em 40 mL de água e agitar por pelo menos 1 hora.

Acrescentar a acrilamida com mais 50 mL de água, agitando até dissolver. Checar o pH 7,0 e o volume acertar para 100 mL .

Estocar em geladeira em frascos escuros.

Usar filtro 0,45 $\mu$ m (Nalgene Filter) para esterilizar a solução

## Coloração de gel SDS-PAGE por Nitrato de Prata

### 1. Solução fixadora

- Álcool etílico absoluto ..... 30 mL
- Ácido acético glacial ..... 1,5 mL
- Água bidestilada q.s.p ..... 300 mL
- Preparo na hora do uso

- a) Incubar sob agitação por 30 minutos (gel + solução)
- b) Desprezar a solução fixadora na pia, segurando o gel pressionando suavemente sobre o fundo do recipiente e tocando a menor área do gel possível, cuidando para não deixá-lo cair.

### 2. Solução de Prata

- a) Nitrato de Prata ..... 0,55 g  
Água destilada ..... 300 mL
- b) Adicionar na cuba com o gel e agitar por **30 minutos exatos**.
- c) Desprezar a solução de prata.

### 3. Lavar com água destilada por 2 vezes, agitando bem.

### 4. Solução de Revelação ou Coloração

#### a) Solução de Hidróxido de Sódio

- Hidróxido de Sódio ..... 9 g
- Água destilada ..... 100 mL  
Deixar descansar sobre a mesa, pois dissolve sozinho.
- Depois de dissolvido adicionar formaldeído ..... 25 mL
- Água bidestilada q.s.p. .... 300 mL

#### b) Borohidreto ..... 0,006 g

Usar a solução preparada para dissolvê-lo em Becker pequeno (20 – 50 mL) só após a segunda lavagem do gel com água destilada.

- c) Mantenha o gel na solução de revelação sob agitação até o aparecimento de bandas  $\pm$  10 minutos.

### 5. Solução de Parada

- Ácido acético glacial P.A. .... 15 mL
  - Água bidestilada q.s.p. .... 300 mL
- Mantenha o gel sob agitação por 10-15 minutos

### 6. Solução de Conservação

- Álcool etílico absoluto ..... 30 mL
- Água bidestilada ..... 300 mL
- Mantenha o gel por tempo indeterminado.

### Produção de lisado celular para Proteína Insolúvel ( vetor pQE)

\* Realizar previamente o teste de esterilidade nos meios utilizados sem adição da ampicilina.

01. Inocule 60  $\mu$ L ou 200  $\mu$ L da cultura em 3 mL ou 10 mL de caldo LB com 100 mg / mL de ampicilina (60 ou 200  $\mu$ L da solução a 5 mg / mL) respectivamente. Incube a 37°C sob agitação a 200 rpm por 18 horas para se obter culturas com bactérias na fase log.
02. Inocule 5 mL da cultura em 100 mL de caldo LB (erlenmeyer) com 100 mg/mL de ampicilina (1000  $\mu$ L da solução a 5 mg / mL). Incube a 37°C sob agitação a 200 rpm por 2 horas.
04. Verifique a  $DO_{600} \Rightarrow 0,5 - 0,8$  (mid log).
  - a. Colete 1 mL da cultura imediatamente antes da indução (controle não induzido), pelete as células e ressuspensa em 50  $\mu$ L de Tampão da Amostra SDS PAGE [1X] . Congele antes do uso. Adicione, quando em cultura induzida, IPTG na concentração final de 1,0 M (100  $\mu$ L da solução 1M/ $\mu$ L ou 10  $\mu$ L da solução 10 mM/ $\mu$ L), em cultura induzida. Incube a 37°C sob agitação a 200 rpm por mais 4 a 6 horas.
05. Colete uma segunda alíquota de 0,5 mL da cultura (controle induzido), pellet as células e ressuspensa com 100  $\mu$ L de Tampão da Amostra SDS PAGE [1X] e congele até o uso.
06. Divida a cultura em duas alíquotas de 50 mL. Concentre as células centrifugando a 4000 x g por 10 minutos (rotor SS 34 da Centrifuga Sorvall)
06. Ressuspensa o pellet de 50 mL de cultura em 5 mL de tampão de sonicação (50 mM fosfato de sódio, 300 mM de NaCl, pH 7,8).

Adicione 1% de NT-40 e os Inibidores de Proteinase:

  - PMSF – phenylmethylnilfonyl fluoride - 227  $\mu$ L da solução estoque 1mM para cada 50 mL de cultura
  - TLCK -  $\alpha$ -pTosyl L-lysine chloromethyl Ketone - 100 $\mu$ L da solução estoque 0,1mM para cada 50 mL de cultura
07. Incube o tubo por 15 minutos no gelo.
08. Sonique rapidamente para lisar as células (evite formação de espuma, pois desnatura as proteínas) na intensidade média (25/50) 2 ou 3 vezes por 10 segundos com intervalos de 30 segundos, mantendo a suspensão no gelo.
09. Congele o lisado em nitrogênio líquido (ou gelo seco de metanol).descongele em banho frio.
10. Descongele rapidamente o lisado em banho-maria a 37°C.
11. Repita mais 3 ciclos de congelamento-descongelamento-sonicação.
12. Centrifugue a 10000 x g por 20 minutos. Colete o sobrenadante (extrato A, proteína solúvel) removendo os debris insolúveis.
13. Ressuspensa o pellet de 50 mL de cultura em 5 ml de tampão de sonicação. Esta é a suspensão da proteína insolúvel (extrato B).
15. Estoque o lisado no gelo ou freezer a - 20°C até o uso.

## Preparo dos Tampões

### Buffer A

6 M GuHCl  
0,1 M Na-Fosfato  
0,01 M Tris-HCl pH 8,0

0,1 M Na-Fosfato  
 $1 \text{ M} \cdot V_1 = 0,1 \cdot 25 \text{ mL}$   
 $V_1 = 2,5 \text{ mL}$  de Na fosfato 1M

### Sol. Estoque de PMSF (44mM) PM 174,2 phenylmethylnilfonyl fluoride

174,2 g ..... 1 M ....1000mL  
174,2 g .....1000 mM ....1000mL

PMSF 1mM para cada 100 mL de cultura

$C_1V_1 = C_2V_2$   
 $44 \text{ mM} \times V_1 = 1 \text{ mM} \times 100 \text{ mL}$  de suspensão  
 $V_1 = 2,27 \text{ mL}$  de solução a 44mM

76,6 mg ..... 10 ml Isopropanol  
X ..... 2,27 mL de isopropanol  
X ..... 17,41 mg de PMSF

### Tampão de Sonicação pH 7,8

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (PM 268,07) ..... 50 mM  
NaCl (PM 58.45) ..... 300 mM

### Buffer B

8 M Uréia  
0,1 M Na-Fosfato  
0,01 M Tris-HCl pH 8,0

8 M Uréia PM 60,06  
1M ..... 60,06 ..... 1000 mL  
1M ..... 6,006 ..... 100 mL  
8M ..... X  
 $X = 48,05 \text{ g}$  .....100 mL  
24,024 g ..... 50 mL  
12,012 g ..... 25 mL

### Sol. Estoque de TLCK (10mM) PM 369,3 $\alpha$ -pTosyl L-lysine chloromethyl Ketone

369,3 g ..... 1 M ....1000mL  
3,693 g ..... 10 mM ....1000mL  
0,003693 g ... 10 mM .... 10 mL

diluído em água ultrapura

TCLK 0,1mM para cada 100 mL de suspensão

$C_1V_1 = C_2V_2$   
 $10 \text{ mM} \times V_1 = 0,1 \text{ mM} \times 100 \text{ mL}$   
 $V_1 = 10 / 10 = 1 \text{ mL}$  sol a 10 mM

### $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (PM 268,07) ..... 50 mM

268,07 g ..... 1 M .....1000 mL  
268,07 g ..... 1000 mM ..... 1000 mL  
268,07 g .... 50 mM ..... 300 ml  
x ..... 50 mM ..... 300 mL  
 $x = 4,02 \text{ g}$

### NaCl (PM 58.45) ..... 300 mM

58.45 g ..... 1 M .....1000 mL  
58,45 g ..... 1000 mM ..... 1000 mL  
17,535 g .... 300 mM ..... 1000 ml  
5,26 g .... 300 mM ..... 300 mL

## 5. Purificação sob Condições Híbridas Qiagen (modificado)

Para proteínas insolúveis, este procedimento pode restaurar a atividade protéica após a lise celular e ligação sob condições desnaturantes. Este procedimento não viável para todas as proteínas, e poderia ser testado usando a proteína que está sendo preparada.

- **Confira o pH dos tampões antes de usá-los.**
- **Tampões desnaturantes contêm uréia, podendo tornarem-se mais básicos com o tempo.**
- **Utilize tampões desnaturantes e colunas e lisado celular preparado sob condições desnaturantes.**

01. Adicione 8 mL do lisado a uma Coluna de Purificação Preparada.
02. Agite delicadamente por 15 - 30 minutos a temperatura ambiente para a ligação da solução do lisado com a resina em suspensão (Use agitador que faça rotação – de hematologia).
03. Deixe a resina se depositar por gravidade ou por centrifugação à baixa velocidade (800 x g) e aspire cuidadosamente o sobrenadante.  
\* Guarde o sobrenadante a + 4°C para análise em SDS-PAGE.
04. Lave com 4 mL de Tampão de Ligação Desnaturante para ressuspensão da resina e agite delicadamente por 2 minutos .  
\* Deixe a resina se depositar por gravidade ou por centrifugação à baixa velocidade (800 x g) e aspire cuidadosamente o sobrenadante.  
\* Guarde o sobrenadante a + 4°C para análise em SDS-PAGE.  
\* Repita este passo mais 1 vez.
05. Lave com 4 mL de Tampão de Lavagem Desnaturante (pH 6,0) para ressuspensão da resina e agite delicadamente por 2 minutos .  
\* Deixe a resina se depositar por gravidade ou por centrifugação à baixa velocidade (800 x g) e aspire cuidadosamente o sobrenadante.  
\* Guarde o sobrenadante a + 4°C para análise em SDS-PAGE  
\* Repita este passo mais 1 vez.
06. Lave com 8 mL de Tampão de Lavagem Nativo para ressuspensão da resina e agite delicadamente por 2 minutos .  
\* Deixe a resina se depositar por gravidade ou por centrifugação à baixa velocidade (800 x g) e aspire cuidadosamente o sobrenadante.  
\* Guarde o sobrenadante a + 4°C para análise em SDS-PAGE  
\* Repita este passo mais 3 vez, para um total de 4 lavagens nativas.
07. Fixe a Coluna de Purificação em posição vertical e remova a tampa da porção inferior da Coluna.  
\* Elua a proteína com 8 -12 mL de Tampão de Eluição Nativo.  
\* Colete frações de 1 mL para análise em SDS-PAGE

### Reagentes para Purificação Híbrida

#### Tampão A (lise Qiagen) 1 litro

Fosfato Dibásico de Sódio 100 mM.. 13,8g  
 Tris-HCl 10 mM ..... 0,12g  
 GuHCl 6M ..... 573,0g  
 Água Ultrapura qsp ..... 1000mL  
 pH 8,0 ajustado com NaOH 10 N

#### Tampão B de ligação Desnaturante Qiagen

Fosfato Dibásico de Sódio 100 mM.. 13,8g  
 Tris-HCl 10 mM ..... 0,12g  
 Uréia 8M ..... 480,5g  
 Água Ultrapura qsp ..... 1000mL  
 pH 8,0 ajustado com NaOH 10 N

#### Tampão C de ligação Desnaturante Qiagen

Fosfato Dibásico de Sódio 100 mM.. 13,8g  
 Tris-HCl 10 mM ..... 0,12g  
 Uréia 8M ..... 480,5g  
 Água Ultrapura qsp ..... 1000mL  
 pH 6,3 ajustado com HCl

#### Tampão de Lavagem Nativo (Probond)

Imidazol 3M ..... 335 µL  
 Sarcosil 3% ..... 3,2mL  
 NaCl 2.5 M ..... 3,74g  
 Tampão de Purificação 1X q.s.p. . 32 mL  
 pH 8,0 ajustado com NaOH 10 N  
 completar o volume após ajustar o pH

#### Tampão de Purificação 1X

Tampão de Purificação 5X ..... 2,4 mL  
 Água Ultrapura q.s.p. .... 12 mL

#### Tampão de Eluição Nativo (Probond)

Imidazol 3M ..... 1,072 mL  
 Tampão de Purificação 1X q.s.p. ... 12 mL  
 pH 8,0 ajustado com NaOH 10 N  
 completar o volume após ajustar o pH

#### Tampão de Purificação 5X

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 250mM ..... 8,87g  
 Na Cl 2,5 M ..... 36,525g  
 Água Ultrapura q.s.p. .... 250 mL

#### NaCl 500mM (Probond)

Na Cl 500mM .....29,22g ... 0,117g  
 Tampão A (de lise) qsp .1000 mL .. 4 mL  
 pH 7,8 ajustado com NaOH 10 N

#### Tampão B de ligação Desnaturante Qiagen

Na Cl 500mM .....29,22g ... 0,117g  
 Tampão B q.s.p. ....1000 mL .. 12 mL  
 pH 7,8 ajustado com NaOH 10 N

#### Tampão C de ligação Desnaturante Qiagen

Na Cl 500mM .....29,22g ... 0,117g  
 Na Cl 2,5 M .....146,1g .... 1,169g  
 Tampão C q.s.p. ....1000 mL .. 8 mL  
 Sarcosil 3% ..... 0,8 mL  
 pH 6,0 ajustado com NaOH ou HCl

#### Tampão de Purificação 1X

Tampão de Purificação 5X ..... 6,4 mL  
 Água Ultrapura q.s.p. .... 32 mL

4 lavagens de 8 mL

## 10. Identificação da r MSP5-PR1 pela Técnica de Western-blotting

01. Monte o sanduíche, para a transferência de proteínas pela técnica de Western Blotting, em uma cuba contendo o tampão de transferência para evitar que a formação de bolhas interfira no processo de transferência.
02. Coloque o gel de modo que forme um sanduíche:
  - a. a primeira metade do suporte da cuba de transferência,
  - b. a esponja embebida no tampão de transferência,
  - c. o papel de filtro embebido no tampão de transferência, com as mesmas medidas do gel,
  - d. o gel que contém as proteínas a serem transferidas,
  - e. o papel de nitrocelulose embebido uniformemente pelo tampão de transferência,
  - f. papel de filtro,
  - g. esponja embebidos com tampão de transferência e
  - h. a outra metade do suporte da cuba de transferência.
03. Fixe o sanduíche e coloque-o corretamente no encaixe da cuba cheia com tampão de transferência, de modo que o papel de nitrocelulose fique voltado para o pólo positivo (vermelho), que receberá a corrente elétrica vinda do pólo negativo (preto).
04. Transfira *overnight* com 30 V e 15 mA ou por 2 horas a 70 V e 35 mA a 0°C ou em refrigerador.
05. a. Desmonte o sanduíche.
  - b. Retire da membrana de nitrocelulose e marque a posição do padrão de peso das proteínas, para não trocar a face que recebeu a transferência.
  - c. Faça o bloqueio da membrana de nitrocelulose com PBS com Tween 20 a 0,1% e leite desnatado a 5% por uma hora a temperatura ambiente sob agitação (leite em pó desnatado Molico, guardado em alíquotas a - 20° C para que não apresente grumos ao ser reidratado e interfira na reação causando um bloqueio irregular na membrana).
  - d. Core o gel para checar a transferência.
06. a. Dilua o anticorpo em PBS com Tween 20 a 0,1% e leite desnatado a 5%, sendo 1:500 ou diluição padronizada para anticorpo policlonal dependendo do anticorpo,  
**ou** 2 µg/mL de anticorpo monoclonal, 1:12000 para anticorpo monoclonal de camundongo anti-MSP5 marcado com peroxidase.
  06. b. corte membrana de nitrocelulose a ser testada inoculada com a proteína ser testada em número de tiras igual ao número de soros a serem testados na diluição adequada PBS com Tween 20 a 0,1% e leite desnatado a 5%,  
\* Incubar a membrana com o anticorpo por uma hora a temperatura ambiente sob agitação.
07. Lave a membrana por 5 minutos por 4 vezes com PBS-Tween 20 0,1% sem leite.
08. Incube a membrana com o anticorpo secundário, anti-IgG marcado com peroxidase diluído 1:2000 em PBS com Tween 20 a 0,1% e leite desnatado a 5% por uma hora a temperatura ambiente sob agitação  
\* (com anticorpo monoclonal anti-MSP5 não necessário este passo porque já vem marcado com peroxidase).
09. Lave a membrana por 10 minutos por 6 vezes com PBS-Tween 20 0,1% sem leite.
10. Revele através da Quiluminescência
  - a. incubar a membrana em solução 1 + solução 2 diluídas 1:1.
  - b. retire o excesso de umidade com auxílio de bastão de vidro ou papel toalha de boa qualidade.
  - c. envolver a membrana em filme plástico de PVC e
11. Monte o cassete para Raios-X em câmara escura,

- a. colocando a membrana de nitrocelulose envolta no filme de PVC com a face que recebeu a transferência voltada para cima,
  - b. depois a chapa de filme fotográfico e feche o cassete.
  - c. Deixe 1 minuto para que vele o filme e revele em equipamento de Raio X.
- \* O tempo de exposição pode variar de acordo com a intensidade da luminescência a que o filme estiver exposto, sendo um tempo maior ou menor.
- quando se usa o anticorpo monoclonal de camundongo anti-MSP5 marcado com peroxidase omite-se os passos 7, 8 e 10.

#### Tampão de Transferência

Tris (0,025M) ..... 3,03 g ..... 1,515 g  
 Glicina (0,192M) .. 14,4 g ... 7,2 g  
 Metanol ..... 200 mL ..... 100 mL  
 Água dest. q.s.p. .. 1000 mL ..... 500 mL

#### Salina Tamponada (PBS 0,01M)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O ... 1,98 g ... 0,99 g (0,001M)  
 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> . H<sub>2</sub>O ... 0,36 g ... 0,18 g (0,003M)  
 NaCl ..... 8,17 g ... 4,085 g (0,14M)  
 Água Ultrapura qsp 1000 mL .. 500 mL

Obs.: não precisa certar o pH, mas recomenda-se medir ( $\pm$  8,23).

Usar só uma vez

Salina Tamponada (PBS 0,01M) 0,1% T

Tampão de Bloqueio 5% de leite Desnatado

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O . 1,98 g ..0,99 g (0,001M)  
 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2O .. 0,36 g ... 0,18 g (0,003M)  
 NaCl ..... 8,17 g .. 4,085 g (0,14M)  
 Água Ultrapura qsp 1000 mL .. 500 mL  
 Tween 20 ..... 1 mL ..... 0,5 mL

Salina Tamponada (PBS 0,01M) 0,1% T ..15 mL  
 Leite Desnatado ..... 0,75 g

### 13. Teste de Imunofluorescência Indireta:

O teste de Imunofluorescência Indireto foi utilizado para detecção de anticorpos anti-*A. marginale* (IFI), conforme o descrito por Madruga et al. (1986) (GOFF; WINWARD, 1983). Os resultados foram classificados como negativos e positivos com título 320 e 640.

#### 2. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (MADRUGA et al, 1986)

1. Retire as lâminas com antígeno do freezer -20C, descongele e desenhe 21 circunferências com esmalte vermelho sobre o esfregaço sangüíneo com o antígeno.
2. Dilua a 1:320 e 1:640 dois soros controle positivos e um negativo para *A. marginale*
3. Pipete 10 µl dos soros controle negativos e positivos diluídos a 1:320 e nove soros serem testados diluídos a 1:320 e 1:640 em cada lâmina.
4. Incube por 30 minutos de incubação a 37°C, em câmara úmida,
5. Lave as lâminas por três vezes durante dez minutos em PBS a pH 7,2, e seque à temperatura ambiente.
6. Diluir o conjugado de anti-IgG bovina total produzido em coelho conjugado com Isotiacianato de Fluoresceína (SIGMA) a 1:750 em PBS pH 7,2 e adicione às lâminas,
7. Incube por 30 minutos a 37°C em câmara úmida.
8. Lave duas vezes em PBS pH 7,2 durante dez minutos e uma vez em tampão fosfato pH 7,2 a 4°C por cinco minutos, e seque à temperatura ambiente,
9. Adicionada uma camada de glicerina tamponada pH 9,0 e lamínula para a leitura em microscópio EPISCOPIC FLUORESCENCE ATTACHMENT “EF”/“EFA” (NIPPON KOGAKU K.K.) para imunofluorescência e filtros de seleção de comprimento de onda de 450nm, com oculares de 10 x e objetiva de 40 x.

#### Soluções utilizadas:

##### Tampão Fosfato (PBS) pH 7.2

###### 1) Solução A:

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ----- 9,46 g  
H<sub>2</sub>O destilada q.s.p.----- 1000,0 ml

###### 2) Solução B:

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ----- 11,34 g  
H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. ----- 1000,0 ml

Solução A ----- 112,5 ml  
Solução B ----- 28,0 ml  
NaCl ----- 8,5 g  
H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. ----- 1000,0 ml

##### Tampão Fosfato pH 7,2

Solução A ----- 100,0 ml  
Solução B ----- 50,0 ml

### 13. Teste de ELISA de Competição (cELISA)

O teste de ELISA por competição (cELISA) foi realizado segundo Knowles et al. (1996).

#### 1º Passo: Sensibilização das microplacas

1. Dilua o antígeno MSP5r/USA (estocado a 1:2 em glicerol) a 1:25 em Tampão Carbonato/Bicarbonato pH 9,6 (totalizando 1:50) na concentração 1 µg/cavidade. Distribua 100 µl por cavidade.
2. Misture o antígeno diluído em Mixer ou Vortex durante 5 minutos.
3. Preencha as microplacas, cobrir com Parafilm e manter overnight no refrigerador.
4. Proceda o desenvolvimento do protocolo, no dia seguinte, com utilização imediata da placa ou transferi-la para o freezer.

#### 2º Passo: Adsorção do soro com MBP (1,3 µg/ml)

1. Diluir a MBP 1:100: para 1 microplaca diluir 60 µl em 6 ml em Tampão do Conjugado
2. Deposite em placa de fundo em U 120 µl de MBP diluída e acrescente 120 µl do soro e incube por 30 minutos, em agitador de placas.

#### 3º Passo: Desenvolvimento do Teste

1. Retire as placas do refrigerador ou do freezer, esperar descongelar por uma hora em temperatura ambiente.
2. Despreze o antígeno. Bloqueie as placas por uma hora, no mínimo, com 200 µl de Tampão de Bloqueio em cada cavidade.
3. Lave a microplaca com 200 µl de Tampão de Lavagem (PBS com 0,2 % de Tween 20) em cada cavidade, por 4 vezes.
4. Adicione 100 µl do soro adsorvido em cada cavidade, em duplicata e incube durante 30 minutos, sob agitação.  
Controles: branco  
2 soros positivos  
2 soros negativos
5. Lave a microplaca por 4 vezes,
6. Adicione 100 µl do conjugado AnaF16C1-HRPO, diluído 1:12000. Incubar por 15 minutos, sob agitação.
7. Lave novamente por 4 vezes.
8. Adicione 50µl de substrato e incubar com por 10 minutos, sob agitação.
9. Interrompa a reação com 25µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, quando a reação apresentar coloração amarelo intenso. Leia em espectrofotômetro em 490nm.
10. Após o teste, o ponto limite ou de corte é 25% de inibição

## Soluções Utilizadas

### Tampão de Adsorção - Carbonato/Bicarbonato pH 9,6

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -----	1,59 g (15mM)
NaHCO <sub>3</sub> -----	2,93 g (35mM)
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. -----	1000,00 ml

### Salina Tamponada de Fosfato de Potássio a 0,5 M pH 7,2 (PPBS)

Solução A 0,5 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ---	5,14 ml
Solução B 0,5 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ---	13,3 ml
NaCl -----	8,76 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. -----	1000,00 ml

#### Solução A 0,5 M

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	68,045 g
Água Destilada .....	1000 mL

#### Solução B 0,5 M

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	87,09 g
Água Destilada .....	1000 mL

### Tampão de Bloqueio pH 7,2 -Sol. Estoque 2x [ ]

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 M (Sol. A) -----	56 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 M (Sol. B) -----	144 ml
BSA (fração V) -----	10 g
Glicina -----	15 g
Sacarose -----	40 g
H <sub>2</sub> O dest. -----	1000 ml

### Tampão de Bloqueio pH 7,2 - Solução em Uso

Tampão de Bloqueio -----	500 ml
PPBS (sem BSA) -----	500 ml

### Tampão de Lavagem

#### PBS / 0,2% Tween Rinse pH 7,4

Na Cl -----	8,00 g
KCl -----	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -----	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -----	0,24 g
Tween 20 -----	2,00 ml
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. -----	1000,00 ml

### Tampão de Diluição do Conjugado (4°C)

PPBS 0,5 M pH 7,2 -----	100 ml
Soro Albumina Bovina (BSA FraçãoV) --	1 g

### Tampão do Substrato - Tampão Citrato pH 7,4

#### Solução estoque

0,1 M Ácido Cítrico -----	24,3 ml
0,2 M Fosfato de Sódio Dibásico-	25,7 ml
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. -----	100,00 ml

#### **14. Avaliação do ELISA de competição tendo como antígeno a Proteína Recombinante MSP5-PR1 (r MSP5-PR1)**

##### **1º Passo: Sensibilização das microplacas**

5. Dilua o antígeno rMSP5-PR1 (estocado a 1:2 em glicerol) a 1:25 em Tampão Carbonato/Bicarbonato pH 9,6 (totalizando 1:50) na concentração 2 µg/cavidade. Distribua 100 µl por cavidade. Misture o antígeno diluído em Mixer ou Vortex durante 5 minutos.
6. Preencha as microplacas, cobrir com Parafilm e manter overnight no refrigerador.
7. Proceda o desenvolvimento do protocolo, no dia seguinte, com utilização imediata da placa ou transfira-la para o freezer.

##### **2º Passo: Adsorção do soro com lisado de *E. coli* BL21 Star (DE3) One Shot™**

1. Dilua o de *E. coli* BL21 Star (DE3) One Shot™ na concentração de 0,22 µg/ml em Tampão de Conjugado.
- Deposite em placa de fundo em U 120 µl do lisado diluído e acrescente 120 µl do soro e incube por 30 minutos, em agitador de placas.

##### **3º Passo: Desenvolvimento do Teste**

11. Retire as placas do refrigerador ou do freezer, esperar descongelar por uma hora em temperatura ambiente.
12. Despreze o antígeno. Bloqueie as placas por uma hora, no mínimo, com 200 µl de Tampão de Bloqueio em cada cavidade.
13. Lave a microplaca com 200 µl de Tampão de Lavagem (PBS com 0,2 % de Tween 20) em cada cavidade, por 4 vezes.
14. Adicione 100 µl do soro adsorvido em cada cavidade, em duplicata e incube durante 30 minutos, sob agitação.  
Controles: branco  
2 soros positivos  
2 soros negativos
15. Lave a microplaca por 4 vezes,
16. Adicione 100 µl do conjugado AnaF16C1-HRPO, diluído 1:12000. Incubar por 15 minutos, sob agitação.
17. Lave novamente por 4 vezes.
18. Adicione 100µl de substrato e incubar com por 10 minutos, sob agitação.
19. Interrompa a reação com 50µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, quando a reação apresentar coloração amarelo intenso. Leia em espectrofotômetro em 490nm.
20. Após o teste, o ponto limite ou de corte é 25% de inibição

**Tampão de Adsorção - Carbonato/Bicarbonato pH 9,6**

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ----- 1,59 g (15mM)  
 NaHCO<sub>3</sub> ----- 2,93 g (35mM)  
 H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. ----- 1000,00 ml

**Salina Tamponada de Fosfato de Potássio a 0,5 M pH 7,2 (PPBS)**

Solução A 0,5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> --- 5,14 ml  
 Solução B 0,5 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> --- 13,3 ml  
 NaCl ----- 8,76 g  
 H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. ----- 1000,00 ml

**Solução A 0,5 M**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 68,045 g  
 Água Destilada ..... 1000 mL

**Solução B 0,5 M**

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 87,09 g  
 Água Destilada ..... 1000 mL

**Tampão de Bloqueio pH 7,2 -Sol. Estoque 2x [ ]**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 M (Sol. A) ----- 56 ml  
 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 M (Sol. B) ----- 144 ml  
 BSA (fração V) ----- 10 g  
 Glicina ----- 50 g  
 Sacarose ----- 40 g  
 H<sub>2</sub>O dest. ----- 1000 ml

**Tampão de Bloqueio pH 7,2 - Solução em Uso**

Tampão de Bloqueio ----- 500 ml  
 PPBS (sem leite desnatado) ----- 500 ml

**Tampão de Lavagem****PBS / 0,2% Tween Rinse pH 7,4**

Na Cl ----- 8,00 g  
 KCl ----- 0,20 g  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ----- 1,44 g  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ----- 0,24 g  
 Tween 20 ----- 2,00 ml  
 H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. ----- 1000,00 ml

**Tampão de Diluição do Conjugado (4°C)**

PPBS 0,5 M pH 7,2 ----- 100 ml  
 Soro Albumina Bovina (BSA FraçãoV) -- 1 g

**Tampão do Substrato - Tampão Citrato pH 7,4**  
**Solução estoque**

0,1 M Ácido Cítrico -----	24,3 ml
0,2 M Fosfato de Sódio Dibásico-	25,7 ml
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. -----	100,00 ml

**Dosagem Protéica pelo Método Bradford (BRADFORD, 1976).**

**Preparo do Corante**

01. Dissolva 25 mg (0,025 g) de Brilliant Blue (Comassie Brilliant Blue G Anhydrous – Sigma B 1131 PM 854 C<sub>47</sub>H<sub>48</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>Na) em 12,5 mL de Etanol 95%.
02. Adicione 25 mL de Ácido Orto-Fosfórico 85%.
03. Complete o volume para 250 mL com Água Bidestilada. Filtre em Papel de Filtro.

Obs.: \* Homogeneizar bem em todas as etapas para evitar formação de grumos.

\* O corante deve ser de cor tijolo.

\* Armazene a temperatura ambiente em frasco escuro com tampa esmerilhada.

\* Verifique se há formação de grumos toda vez que for utilizado.

\* O corante é estável indefinidamente. Só há necessidade de filtração antes da confecção de outra curva.

**Preparo de Soro Albumina Bovina (SAB)**

01. Dissolva 6 mg (0,006 g) de SAB (Albumin Bovine Fraction V – Powder, estocada em freezer – 20°C) em 10 mL de NaCl 0,9%.

\* Homogeneíze bem para dissolução de toda a SAB, sob agitação lenta para evitar formação de espuma.

\* Prepare apenas 15 mL de SAB, não sendo necessários 50 mL para a plotagem da curva de calibração

02. Complete o volume para 15 mL com Solução Salina 0,9%.

**Construção da Curva Padrão.**

TUBOS	SAB (mL)	SALINA 0,9% (mL)
Branco	-	2,5
1	0,5	2
2	1,0	1,5
3	1,5	1,0
4	2,0	0,5
5	2,5	-

01. Leia em 280 nm de absorvância em luz ultravioleta.

02. Calibre o Espectrofotômetro com Solução Salina 0,9% (branco) em zero % de absorvância e 100 % de transmitância

03. Dilua a SAB em vidraria limpa e homogeneíze lentamente (inversão ou Vortex). Leia após 2 minutos a uma hora, ao estabilizar o valor apresentado pelo espectrofotômetro.
04. Determine a concentração da SAB pura (tubo 5): ex.:  
Absorbância em 280 nm  $\cong$  0,240:  $C = \frac{240}{0,66} = 363 \mu\text{g} / \text{mL}$  (padrão para esta SAB)
05. Determine a concentração da SAB diluída (não é necessária a leitura no espectrofotômetro, basta o cálculo matemático).  
Obs.: Resultados da confecção de curva já realizada.  
Ex.: SAB pura com leitura de 0,22, então:  $C = \frac{220}{0,66} = 333 \mu\text{g} / \text{mL}$

<b>Tubos</b>	<b><u>Volume Total</u> Volume de SAB</b>	<b>Concentração de SAB</b>	<b>Dosagem de SAB pura</b>	<b>Concentração de SAB <math>\mu\text{g} / \text{mL}</math></b>
1A	5 : 1	5	333 : 5	66,6
2A	5 : 2	2,5	333 : 2,5	133,2
3A	5 : 3	1,66	333 : 1,6	200,6
4A	5 : 4	1,25	333 : 1,25	266,4
5A	5 : 5	1	333 : 1	333,0

### **Determinação da Concentração Final da SAB**

01. Inteira-se antecipadamente com o manuseio do Espectrofotômetro a ser usado para as leituras através das quais se faz a dosagem protéica.
02. calibre o Espectrofotômetro para a Absorbância 595 nm em zero % de Absorbância e 100% de Transmitância com o corante de Bradford e Solução Salina, somando 2 mL, sendo:  
50  $\mu\text{L}$  (0,05 mL) de Solução Salina 0,09% + 1950  $\mu\text{L}$  do corante de Bradford.
03. Leia em absorbância 595 nm com as diluições dos tubos 1, 2, 3, 4 e 5 de SAB, com:  
50  $\mu\text{L}$  (0,05 mL) da respectiva diluição de SAB + 1950  $\mu\text{L}$  do corante de Bradford.

<b>Tubos</b>	<b>Salina (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>SAB DILUÍDO</b>	<b>Corante de Bradford (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
Branco	50	-	1950
1B	-	50 $\mu\text{L}$ do tubo 1A	1950
2B	-	50 $\mu\text{L}$ do tubo 2A	1950
3B	-	50 $\mu\text{L}$ do tubo 3A	1950
4B	-	50 $\mu\text{L}$ do tubo 4A	1950
5B	-	50 $\mu\text{L}$ do tubo 5A	1950

04. Calcule a concentração final da SAB:

<b>Tubos</b>	<b>Concentração de SAB <math>\mu\text{g} / \text{mL}</math> (leitura a 280 nm) x diluição de SAB : pelo volume total</b>	<b>Concentração Protéica (<math>\mu\text{g} / \text{mL}</math>)</b>
1	66,60 x 0,05 : 2,0	1,62
2	133,2 x 0,05 : 2,0	3,25
3	200,6 x 0,05 : 2,0	5,08
4	266,4 x 0,05 : 2,0	6,50
5	333,0 x 0,05 : 2,0	8,12

05. Leia a absorbância da proteína na amostra e plote os resultados da concentração protéica em  $\mu\text{g} / \text{mL}$  calculada para cada diluição na ordenada (eixo x) e os valores de absorbância da proteína testada em cada diluição na abscissa (eixo y) em papel milimetrado formato A4 “Probus” (dois quadrantes grandes por item).

<b>Pontos de Leitura</b>	<b>Absorbância da Proteína Eixo Y</b>	<b>Concentração Protéica (<math>\mu\text{g} / \text{mL}</math>) Eixo X</b>
1º ponto	0,10	1,62
2º ponto	0,20	3,25
3º ponto	0,28	5,08
4º ponto	0,36	6,50
5º ponto	0,44	8,12

05. Interprete o gráfico através da fórmula:

$$[ ] \text{ obtida } \times 2 : 0,05 : 1000 \times \text{fator de diluição} = \text{mg} / \text{mL}$$

Onde: 2 = volume do diluído.

0,05 = quantidade da amostra em  $\mu\text{g}$ .

1000 = para passar de  $\mu\text{g}$  para mg.