

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**Obtenção e caracterização molecular de isolados puros de  
*Babesia bovis* (Babes, 1888), *Babesia bigemina* (Smith &  
Kilborne, 1893) e *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910)**

Autor: Francisco de Carvalho Dias Filho  
Orientador: Professor Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares

GOIÂNIA  
2006

**FRANCISCO DE CARVALHO DIAS FILHO**

**Obtenção e caracterização molecular de isolados puros de  
*Babesia bovis* (Babes, 1888), *Babesia bigemina* (Smith &  
Kilborne, 1893) e *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910)**

Tese apresentada para a obtenção do grau de Doutor  
em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Goiás

**Área de Concentração:**  
Sanidade Animal

**Orientador:**  
Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares

**Comitê de Orientação:**  
Profa. Dra. Ligia Miranda Ferreira Borges  
Prof. Dr. Luiz Antonio Franco da Silva

**GOIÂNIA**  
**2006**

## FRANCISCO DE CARVALHO DIAS FILHO

Tese defendida e aprovada em **29/11/2006** pela Banca Examinadora constituída pelos professores:

---

Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares  
(ORIENTADOR (A))

---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Massard – UFRRJ/RJ

---

Prof. Dr. Albenones José de Mesquita

---

Prof. Dr. Jurij Sobestiansky

---

Profa. Dra. Ângela Patrícia Santana - UnB/DF

## **AGRADECIMENTOS**

- Às inúmeras pessoas que de uma forma ou de outra nos ajudaram, inclusive com palavras de estímulo e apoio moral. Guardarei sempre em meu coração a lembrança das mesmas.
- Ao CNPq que financiou todo o material necessário ao desenvolvimento de nosso experimento.
- À Escola de Veterinária da UFG meu segundo lar onde já passei mais da metade da minha existência.
- Ao caro colega ex-aluno; meu professor orientador Guido Fontgalland Coelho Linhares, que me guiou com segurança dedicação e serenidade ao longo destes anos.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTAS DE QUADROS .....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
<b>CAPITULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO II - OBTENÇÃO DE ISOLADOS PUROS DE <i>Babesia bovis</i> E <i>Babesia bigemina</i> A PARTIR DE LARVAS E NINFAS DE <i>Boophilus microplus</i> EM BEZERROS NEONATOS PRIVADOS DE COLOSTRO.....</b>	<b>7</b>
RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	7
2.1 INTRODUÇÃO .....	8
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	11
2.4 CONCLUSÕES .....	14
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	14
<b>CAPITULO III - OBTENÇÃO DE ISOLADO PURO DE <i>Anaplasma marginale</i> EM BEZERROS NEONATOS PRIVADOS DE COLOSTRO.....</b>	<b>17</b>
RESUMO .....	17
ABSTRACT .....	17
3.1 INTRODUÇÃO .....	18
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	22
3.4 CONCLUSÕES .....	24
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	25

<b>CAPITULO IV - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE <i>Babesia bovis</i>, <i>Babesia bigemina</i> E <i>Anaplasma marginale</i> NO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA, ESTADO DE GOIÁS, BRASIL”</b> .....	<b>27</b>
RESUMO .....	27
4.1 INTRODUÇÃO .....	29
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.2.1 Obtenção de isolados puros de <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> e <i>A. marginale</i> .....	33
4.2.2 Obtenção de isolados de campo de <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> e <i>A. marginale</i> .....	33
4.2.3. Caracterização molecular dos isolados puros de <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> e <i>A. marginale</i> : sequenciamento e análise de homologia.....	35
4.2.4 Caracterização molecular dos isolados de <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> e <i>A. marginale</i> : RFLP-PCR .....	35
4.2.5 Leitura dos Resultados de PCR e RFLP-PCR .....	38
4.2.6 Documentação Fotográfica .....	38
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
4.3.1 Caracterização molecular dos isolados puros de <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> e <i>A. marginale</i> : PCR .....	38
4.3.2 Caracterização molecular dos isolados puros de <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> e <i>A. marginale</i> : sequenciamento de produtos de PCR.....	40
4.3.3 Caracterização molecular dos isolados puros de <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> e <i>A. marginale</i> : RFLP-PCR.....	44
4.3.4 Caracterização molecular dos isolados de campo de <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> e <i>A. marginale</i> : PCR e RFLP-PCR .....	50
4.4 CONCLUSÕES .....	53
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>63</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Simulação do perfil preditivo de polimorfismo de restrição pela enzima *SauI*96I, para porções das sequências X59604 (*B. bigemina*) e L31922 (*B. bovis*) flanqueadas com os iniciadores GAU9/10, GAU6/7, respectivamente..... 37
- Figura 2.** Simulação do perfil preditivo de polimorfismo de restrição pela enzima *AluI*, para porções das sequências AF221693 e M59845 de *A. marginale*, flanqueadas com os iniciadores BAP2/AL34S. .... 37
- Figura 3.** Eletroforese dos produtos de restrição pela enzima *SauI*96I, referentes ao *amplicon* GAU9/10-SSR rRNA do isolado puro de *B. bovis*..... 45
- Figura 4.** Fragmento preditivo de 685pb do gene SSU RNAr de *B. bigemina* (X59604) flanqueado por *gau6/7* e perfil preditivo *SauI*96I/RFLP-PCR correspondente; 3 e 4. *Amplicon* *gau6/7*-PCR do isolado de *B. bigemina* e perfil *SauI*96I/RFLP-PCR correspondente; 5 e 6. Fragmento preditivo de 541pb do gene SSU RNAr de *B. bovis* (L31922) flanqueado por *gau9/10* e perfil preditivo *SauI*96I/RFLP-PCR correspondente; 7 e 8. *Amplicon* *gau9/10*-PCR do isolado de *B. bovis* e perfil *SauI*96I/RFLP-PCR correspondente..... 46
- Figura 5.** Eletroforese dos produtos de restrição pela enzima *SauI*96I, referentes ao *amplicon* GAU6/7-SSR rRNA do isolado puro de *B. bigemina*..... 47
- Figura 6.** Eletroforese dos produtos de restrição pela enzima *SauI*96I, referentes ao *amplicon* BAP2/AL34S- MSP1 $\beta$  do isolado puro de *A. marginale*. .... 49
- Figura 7.** Fragmento preditivo de 392pb do gene MSP1 $\beta$  (AF221693) de *A. marginale* flanqueado por BAP2/AL34S e perfil preditivo *SauI*/RFLP-PCR correspondente; 3 e 4. Fragmento preditivo de 408pb do gene MSP1 $\beta$  (M59845) de *A. marginale* flanqueado por BAP2/AL34S e perfil preditivo *SauI*/RFLP-PCR correspondente; 5. *Amplicon* BAP2/AL34S do isolado de *A. marginale* e perfil *SauI*/RFLP-PCR correspondente. .... 50

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resultados das análises de homologia pela ferramenta BLAST-N®, referentes à sequência do produto de PCR (GAU9/10-SSR rRNA) do isolado puro de *B. bovis*. ..... 41
- Tabela 2.** Resultados das análises de homologia pela ferramenta BLAST-N®, referentes à sequência do produto de PCR (GAU6/7-SSR rRNA) do isolado puro de *B. bigemina*. ..... 42
- Tabela 3.** Resultados das análises de homologia pela ferramenta BLAST-N®, referentes à sequência do produto de PCR (BAP-2/AL34S-MSP1β) do isolado puro de *A. marginale*. ..... 44



## LISTAS DE QUADROS

### **CAPÍTULO II - OBTENÇÃO DE ISOLADOS PUROS DE *Babesia bovis* E *Babesia bigemina* A PARTIR DE LARVAS E NINFAS DE *Boophilus microplus* EM BEZERROS NEONATOS PRIVADOS DE COLOSTRO..... 7**

**Quadro 1.** Resultados das reações de PCR para DNA extraído de amostras de sangue colhidas em bezerros suscetíveis antes e após a infestação experimental com larvas (Bezerro n<sup>o</sup>.1) e ninfas (Bezerro n<sup>o</sup> 2) infectadas respectivamente com *B. bovis* e *B. bigemina* em Goiânia, 2005..... 12

### **CAPITULO III - OBTENÇÃO DE ISOLADO PURO DE *Anaplasma marginale* EM BEZERROS NEONATOS PRIVADOS DE COLOSTRO. .... 17**

**Quadro 1.** Resultados das reações de PCR em amostras de DNA extraídas de sangue de bezerros suscetíveis, um dia antes da infecção experimental com amostra de campo de *A. marginale* (D-1) e no primeiro dia de parasitemia patente (PP). .... 22

### **CAPITULO IV - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* E *Anaplasma marginale* NO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA, ESTADO DE GOIÁS, BRASIL” ..... 27**

**Quadro 1.** Resultados das reações espécie-específicas de PCR em amostras de DNA extraídas de isolados puros de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*, obtidas em bezerros suscetíveis..... 39

**Quadro 2.** Seqüências de bases nitrogenadas obtidas pelo sequenciamento dos produtos de PCR referentes aos isolados puros de *B. bovis* (output GAU9/10-SSR rRNA de 443pb), *B. bigemina* (output GAU6/7-SSR rRNA de 626pb) e *A. marginale* (Output BAP-2/AL34S-MSP1 $\beta$  de 371pb)..... 40

## LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST-N: "basic local alignment search tool - nucleotide".

DMSO: dimetil sulfóxido.

ERIC-PCR: reação da polimerase em cadeia com sequências repetitivas enterobacterianas intergênicas de consenso.

EV/UFG: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.

MSPs: principais proteínas de superfície.

PBS: salina tamponada.

PCR: reação em cadeia da polimerase.

RAPD: amplificação aleatória de DNA polimórfico.

REP-PCR: reação da polimerase em cadeia com sequências de elementos extragênicos repetitivos palindrômicos.

RFLP: "restriction fragmente length polymorphism"

RFLP-PCR: análise de restrição de produtos de PCR.

RIFI: reação de imunofluorescência indireta.

SSU RNAr: subunidade menor do RNA ribossomal.

SSU rRNA: small subunit ribosomal RNA.

18S RNAr: porção 18S do RNA ribossomal.

## RESUMO

Os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, assim como a riquetsia *Anaplasma marginale* são agentes etiológicos da Tristeza Parasitária Bovina, doença de grande impacto econômico para a bovinocultura no Estado de Goiás. A diversidade molecular de populações de microrganismos autóctones, geograficamente distintas, vem sendo alvo frequente da pesquisa científica. A concepção desse trabalho objetivou a obtenção e a caracterização molecular de isolados autóctones para as três espécies de hemoparasitos. Isolados puros de *B. bovis* e de *B. bigemina* foram obtidos em bezerros suscetíveis, respectivamente, a partir de infestações com larvas e ninfas do carrapato *Boophilus microplus*. Isolado puro de *A. marginale* foi obtido a partir da inoculação de amostra de sangue colhida de bovino portador de infecção natural, previamente tratado com droga babesicida esterilizante. Como animais suscetíveis foram utilizados bezerros neonatos privados de colostro. A condição de isolado puro foi comprovada com a soroconversão específica pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), assim como pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e sub-inoculação. Os resultados confirmaram a eficácia da estratégia previamente reportada para isolamento puro de *B. bovis* e *B. bigemina*, a partir de larvas e ninfas de carrapatos com infecções naturais. Confirmaram que o uso de bezerros neonatos privados de colostro, como animais suscetíveis, demonstrou ser modelo prático, eficaz e de baixo custo para o isolamento de hemoparasitos em regiões endêmicas. Os isolados puros de cada organismo foram caracterizados pelos métodos moleculares: reação em cadeia da polimerase; análises de homologia das sequências de fragmentos do gene SSU RNAr de *B. bovis* e *B. bigemina* e do gene MSP1 $\beta$  de *A. marginale* e, finalmente pela técnica de *Sau96I*-RFLP/PCR para as espécies de babesia e *AluI*-RFLP/PCR para *A. marginale*. Observou-se alto grau de homologia e perfil de restrição idênticos às respectivas amostras de referência registradas no GenBank, para cada espécie. Ainda, como parte deste estudo, foram realizadas análises moleculares, com base na técnica de *Sau96I*-RFP/PCR, em 69 isolados de campo de *B.bovis* e 144 de *B. bigemina*, e, pelo ensaio de *AluI*-RFLP/PCR, 126 isolados de campo de *A. marginale*. Os resultados evidenciaram a ocorrência de diversidade molecular intraespecífica na proporção de 1,5% entre os isolados de *B. bovis* e 1,6% entre os de *A. marginale*. Para *B. bigemina* nenhum nível divergência foi detectado pelo método empregado. Amostras dos isolados puros foram criopreservadas, na forma de estabilizados, para comporem banco de isolados de referência regional, destinados a novas pesquisas no âmbito do tema.

**PALAVRAS-CHAVE:** Babesiidae, Rickettsiales, bovinos, isolados de referência, gene 18S RNAr, gene MSP1 $\beta$ .

## ABSTRACT

The protozoans *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* as well as the rickettsia *Anaplasma marginale* are the etiologic agents of the disease known as cattle tick fever which imposes severe economic burden to livestock in the State of Goiás, Brazil. The genetic diversity of the geographically distinct microorganism populations has been a frequent objective of scientific researches. This study was designed to achieve a molecular characterization of autochthonous isolates of these hemoparasites. Pure isolates of *B. bovis* and *B. bigemina* were obtained in susceptible calves, respectively, by *Boophilus microplus* larvae and nymphs infestations. The pure isolate of *A. marginale* was obtained by subinoculation with blood sample collected from naturally infected carrier animal, which had been previously treated with a sterilizing dose of babesicide. Colostrum-deprived newborn calves were used as susceptible animals. The purity of the isolates was determined by specific fluorescent antibody seroconversion, PCR and subinoculations. The results certified the feasibility of the previously reported method to obtain pure isolates of *B. bovis* and *B. bigemina* with naturally infected *B. microplus* larvae and nymphs, respectively. It was also concluded that the colostrum-deprived newborn calf represented a practical, efficient and low cost model to isolate hemoparasites in enzootic areas. The pure isolate of each organism was characterized by the following techniques: PCR assays; analysis of homology of partial sequences of the SSU rRNA genes of *B. bovis* and *B. bigemina* and of the MSP1 $\beta$  gene of *A. marginale*; and, finally, by *Sau96I*-RFLP/PCR in the case of the *B. bovis* and *B. bigemina* and *AluI*-RFLP/PCR for *A. marginale*. The results demonstrated, for the three organisms, high levels of homology and similar restriction profiles in comparison with the correspondent reference sequences accessed in the GenBank. Also, in this study it was applied a *Sau96I*-RFLP/PCR for a molecular analysis of 69 *B. bovis* and 144 *B. bigemina* field isolates. With the same purpose a *AluI*-RFLP/PCR assay was performed in 126 *A. marginale* field isolates. The results showed the occurrence of intraspecific molecular diversity of 1.5% among *B. bovis* and 1.6% among *A. marginale* field isolates. No divergence was detected among *B. bigemina* isolates. Pure isolates samples were cryopreserved and maintained as a bank of pure isolates of the hemoparasites that represented regional reference isolates to be used on further studies.

**KEY WORDS:** Babesiidae, Rickettsiales, bovine, reference isolates, 18S rRNA gene, MSP1 $\beta$  gene.

## CAPITULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS

A participação brasileira no mercado mundial de carne bovina tem sido cada vez mais relevante, passou de 8,55% no ano 2000 para 26,4% em 2005. Esse aumento de produção tende a ser sempre crescente já que deverá acompanhar um consumo cada vez maior da população por esta comodite. Para atender essa demanda torna-se fundamental a utilização de técnicas de produção adequadas que viabilizem um incremento na quantidade e qualidade dos produtos.

O FAPRI (2006) projetou um crescimento anual de 1,4% na produção mundial de carne bovina até o ano de 2014, sendo que a estimativa prevê que até essa data a produção será de 60,4 milhões de toneladas. O Brasil mantém-se, segundo essa projeção, como o principal exportador de carne bovina.

O Estado de Goiás possui o quarto maior rebanho bovino do país, com mais de 15 milhões de cabeças e ocupa a segunda posição no *ranking* nacional de produção de leite, com 2,65 bilhões de litros/ano (ANUALPEC, 2006). Tem a sua economia baseada na produção agropecuária, chegando a representar mais de 60% do Produto Interno Bruto, contabilizados a comercialização de produtos primários, processados e industrializados. A produção de bezerros no estado de Goiás no ano de 2005 foi de 4.625.924 cabeças (ANUALPEC, 2006).

Tendo em vista o crescimento da economia mundial, em média, 3% ao ano até 2020 e uma crescente urbanização, aliada ao envelhecimento da população, projeta-se uma diversificação alimentar, com aumento da demanda, sobretudo nos países em desenvolvimento, por produtos processados (laticínios, etc.), de maior valor protéico (carnes), além de açúcar e frutas. Somente a China deverá responder, em 2015, por 60% da demanda mundial de laticínios (MAPA, 2006).

Em contraste aos importantes avanços verificados no melhoramento genético do rebanho bovino, na nutrição, no melhoramento de pastagens e na tecnologia dos sistemas de produção, os problemas sanitários que favorecem a manutenção de agentes infecciosos e parasitários continuam como entraves para a otimização da produtividade animal.

Por ocasião do I Workshop Sanidade do Rebanho Leiteiro de Goiás, realizado em Goiânia no ano de 1997, por iniciativa da Federação da Agricultura do Estado de Goiás, reuniram-se médicos veterinários, representantes de Instituições de Pesquisa e Extensão, Cooperativas, professores de Universidades e pesquisadores de renome, para discutirem a problemática da sanidade animal para a região. Como produto da reunião foi elaborado um documento cujo objetivo principal foi o de padronizar normas de condutas técnicas frente às diferentes enfermidades de importância econômica (FAEG, 1997). Durante o evento evidenciou-se a importância de várias enfermidades infecciosas ocorrentes em Goiás, entre elas a babesiose e a anaplasmosse bovina, como também a necessidade do melhoramento técnico-científico dos laboratórios de diagnóstico de doenças infecciosas em atuação no Estado.

A babesiose e a anaplasmosse bovina, que compõem o complexo designado de tristeza parasitária bovina (TPB), na América Latina, apresentam altos índices de prevalência e riscos de prejuízos econômicos para a bovinocultura regional e nacional, principalmente entre os bezerros e animais procedentes de áreas livres (LINHARES et al., 1992; SANTOS et al., 2001a; SANTOS et al., 2001b).

A babesiose dos bovinos no Brasil é causada pelos hematozoários *Babesia bovis* e/ou *Babesia bigemina*, enquanto que a anaplasmosse tem como etiologia a riquetsia *Anaplasma marginale*. Infecções mistas ou isoladas podem originar doença com sinais clínicos como febre, anemia, icterícia, hemoglobinúria e perda de apetite, com a presença do agente no sangue do animal (KESSLER & SCHENK, 1998).

O principal vetor destas hemoparasitoses é o carrapato *Boophilus microplus* que encontra na região Centro-Oeste, condições favoráveis ao desenvolvimento do seu ciclo de vida (MADRUGA et al., 1984). Para o caso específico de *A. marginale*, está documentado na literatura a possibilidade da transmissão mecânica por outros vetores hematófagos como moscas, mosquitos ou tabanídeos (FUENTE et al., 2001)

Na América Latina os prejuízos decorrentes das hemoparasitoses foram estimados em US\$ 513 milhões por ano (MONTENEGRO-JAMES et al., 1992). De acordo com GRISI et al. (2002) a associação de *B. microplus* e as doenças

por ele transmitidas, são responsáveis por prejuízos bastante significativos para a pecuária nacional, atingindo cifras estimadas em mais de 2 bilhões de dólares anuais.

Os métodos de diagnóstico para a TPB vêm sendo aperfeiçoados no decorrer dos anos. A microscopia direta de esfregaços sangüíneos corados, tem sido o procedimento convencional e o mais comumente adotado, no entanto, devido a sua baixa sensibilidade, limita-se ao diagnóstico de casos com manifestações clínicas. O diagnóstico sorológico, apesar de apresentar elevada sensibilidade, é pouco utilizado devido às limitações quanto aos custos e a disponibilidade de antígenos, reagentes e equipamentos de laboratório. A soroconversão somente ocorre alguns dias após o início da manifestação clínica da doença, portanto o método sorológico tem uma maior aplicação para estudos epidemiológicos ou no monitoramento do estado imune dos animais, não sendo indicado como um método que permita o diagnóstico precoce nas formas agudas da enfermidade. No entanto, técnicas sorológicas de diagnóstico para a TPB têm sido desenvolvidas, tais como: fixação de complemento, imunofluorescência indireta (IFI), hemoaglutinação indireta e imunoadsorção enzimática (IICA, 1987; BOSE et al., 1995; REDDY et al., 1997).

Recentes avanços na área de biologia molecular têm proporcionado progressos na concepção de métodos, altamente específicos e sensíveis, para identificação direta de agentes causadores de enfermidades infecciosas. Entre estas técnicas, destacam-se a hibridização com sondas moleculares e a reação em cadeia da polimerase (PCR), que possibilitam um diagnóstico preciso e seguro. A reação de PCR oferece ainda, como vantagem, a rapidez na execução e a possibilidade da automatização do método, sendo sensível para detectar parasitemias em níveis equivalentes a  $10^{-5}$  (BOSE et al., 1995; PERSING, 1996).

De acordo com o documento intitulado "Projeção do Agronegócio Mundial e no Brasil", elaborado por uma equipe acessoria em gestão estratégica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil e disponibilizado em fevereiro de 2006, o Brasil ocupa o 5º lugar em pesquisa científica na área de biologia aplicada, cerca de 2,2%, enquanto que a América do Norte, Ásia, Europa e Japão contribuem com 32,4%, 14,3%, 38,4% e 6,9% respectivamente. Neste documento os autores enfatizam que: "o conhecimento é insumo fundamental

para a produção e a biotecnologia, a engenharia genética e a nanotecnologia constituem-se importantes vetores tecnológicos para ampliação das oportunidades do setor agropecuário nacional” (MAPA, 2006).

Técnicas avançadas de biologia molecular vêm se constituindo em ferramentas valiosas aos estudos sobre microrganismos e suas interações com o ambiente e seus hospedeiros. Entre estes, o conhecimento sobre a diversidade genética tem sido tema relevante na pesquisa científica mundial. Estudos sobre a caracterização gênica de isolados fisiográficos de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* tem confirmado variedade genotípica existente entre isolados de diferentes regiões do planeta (LEW et al., 1997; MADRUGA et al., 2002; FUENTE et al., 2004).

A demonstração da diversidade intra-específica entre populações distintas tem estimulado pesquisadores na condução de estudos envolvendo processos de avaliação da heterogeneidade genética e sua implicação em áreas afins do conhecimento como a patologia, a imunologia e a epidemiologia molecular, entre outras. Os avanços científico-tecnológicos neste campo serão importantes para gerar novos conhecimentos que possam ser aplicados no planejamento e adoção de medidas preventivas, assim como para a descoberta de novos produtos biológicos como antígenos e imunógenos e, ainda, no desenvolvimento de novas drogas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANUALPEC. **Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: Editora Argos Comunicações. São Paulo, 2006. 440p
2. BÖSE R., JORGENSEN, W.K., DALGLIESH, R.J., FRIEDHOFF, K.T., VOS,A.J., Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Vet. Parasitol.**, v.57, p.61-74, 1995.
3. FAEG – Federação da Agricultura do Estado de Goiás. **Sanidade do rebanho leiteiro do Estado de Goiás. Manual de condutas técnicas**. Goiânia: Centro Editorial Gráfico da UFG. Goiânia, 1997, 46p.
4. FAPRI - Food and Agriculture Policy Research Institute. **FAPRI 2006 US and world agricultural outlook**. Center for Agricultural and Rural Development - Iowa State University, US, 2006 [on line], 2006. Disponível em: <http://www.fapri.iastate.edu/publications>. Acesso em: 10 jul. 2006.



5. FUENTE, J. de la; GARCIA-GARCIA, J.C.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M. Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. **Int. J. Parasitol**, v.31, p.1705-1714, 2001.
6. FUENTE, J. de la, PASSOS, L.M.F., BUSSCHE, R.A. van den, RIBEIRO, M.F.B., FACURY-FILHO, R.J., KOCAN, K.M. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. **Vet Parasitology**, v.121, p.307-316, 2004.
7. GRISI, L., MASSARD, C.L., MOYA, B.G.E., PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v.21, n.125, p.8-10, 2002.
8. IICA - Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. **Técnicas para el diagnóstico de babesioses y anaplasmosis bovina**. San José, Costa Rica, 1987. (Primer informe).
9. KESSLER, R.H., SCHENK, M.A.M. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanosomose dos bovinos**. Campo Grande: EMBRAPA – CNPGC, 1998. 157p.
10. LEW, A.E., DALRYMPLE, B.P., JESTON, P.J., BOCK, R.E., PCR methods for the discrimination of *Babesia bovis* isolates. *Vet. Parasitol.*, v.71, p.223-237, 1997.
11. LINHARES, G.F.C., MASSARD, C.L., ARAÚJO, J.L.B., ALVES, L. Levantamento sorológico para *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1983) e *Babesia bovis* (Babes, 1888) em bovinos na região Centro-Oeste do Brasil. **Arq. Univ. Fed. Rur. RJ**, v.15, n.1, p.85-91, 1992.
12. MADRUGA, C.R.; AYCARDI, E.; KESSLER, R.H.; SCHENK, M.A.M.; FIGUEIREDO, G.R.; CURVO, J.B.E. Níveis de anticorpos anti-*Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, em bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelores. **Pesq Agropec Brasileira**, v.19, p.1163-1168, 1984.
13. MADRUGA, C.R.; LEAL, C.R.B.; FERREIRA, A.M.T. et al. Genetic and antigenic analysis of *Babesia bigemina* isolates from five geographical regions of Brazil. **Pesq Vet Bras**, v.22, n.4, p.153-160, 2002.
14. MAPA - Ministério do Abastecimento, Pecuária e Agricultura. **Projeções do agronegócio: Brasil e mundo, 2006** [on line], 2006. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 15 jul. 2006.
15. MASSARD, C.L., FREIRE, R.B., Etiologia, manifestações e diagnóstico das babesioses bovinas no Brasil. **A Hora Vet.**, v. 4, n.23, 1985.
16. MONTENEGRO-JAMES, S., GUILLEN, A.T., TORO, M., DOT-ELISA para el diagnóstico serológico de anaplasmosis y babesiosis bovinas. *Rev. Cubana Ciên. Vet.*, v.23, n.1, p.14-24, 1992.

17. PERSING, D. **PCR protocols for emerging infectious diseases.** Washington: ASM Press., 1996. 180p.
18. REDDY, G.G.B., MISIIRA, A.K., RAO, J.R., TEWARI, A.K., Comparison of indirect immunofluorescence (IIF) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in detecting *Babesia bigemina* infection in cattle, **Acta Veterinaria Hungarica**, v.45, n.1, p.67-74, 1997.
19. SANTOS, H.Q.; LINHARES, G.F.C.; MADRUGA, C.R. Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em bovinos de leite da microrregião de Goiânia determinada pelos testes de Imunofluorescência indireta e ELISA. **Ciê An Bras**, v.2, n.2, p.133-137, 2001a.
20. SANTOS, H.Q., MADRUGA, C.R., LINHARES, G.F.C. Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em bovinos de leite da microrregião de Goiânia, pela reação de imunofluorescência indireta e Elisa. **Rev. Bras. Ciên. Vet.**, Niterói, v.8, n.1, p.31-34, 2001b.

## **CAPÍTULO II - OBTENÇÃO DE ISOLADOS PUROS DE *Babesia bovis* E *Babesia bigemina* A PARTIR DE LARVAS E NINFAS DE *Boophilus microplus* EM BEZERROS NEONATOS PRIVADOS DE COLOSTRO.**

### **RESUMO**

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo principal de se obter isolados puros autóctones de *Babesia bovis* e de *Babesia bigemina* a partir do carrapato *Boophilus microplus*, naturalmente infectado, proporcionando dessa forma, amostras de referência regional para futuros estudos no âmbito do tema. Os isolados puros de *B. bovis* e *B. bigemina* foram obtidos, respectivamente, por meio da infestação de bezerros neonatos privados de colostro, com larvas e ninfas de *B. microplus*, naturalmente infectadas. A condição de isolados puros foi comprovada pela soroconversão específica pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), assim como pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e sub-inoculação. Confirmaram ainda a eficácia da estratégia previamente reportada para isolamento puro de *B. bovis* e *B. bigemina*, a partir de larvas e ninfas de carrapatos com infecções naturais. Concluiu-se ainda que o uso de bezerros neonatos privados de colostro, como animais suscetíveis, pode ser considerado um modelo prático, eficaz e relativamente barato para o isolamento de hemoparasitos em regiões endêmicas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Babesiidae, bovinos, babesiose bovina, doenças transmitidas por carrapatos.

### **PURE ISOLATES OF *Babesia bigemina* AND *Babesia bovis* OBTAINED FROM *Boophilus microplus* LARVAE AND NYMPHS IN COLOSTRUM-DEPRIVED NEWBORN CALVES**

### **ABSTRACT**

The present study was conducted with the main objective of obtaining pure autochthonous isolates of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* from naturally infected *Boophilus microplus* in order to provide regional reference samples for further studies. The pure isolates of *B. bovis* and *B. bigemina* were achieved by infesting susceptible colostrum-deprived newborn calves with naturally infected *B. microplus* larvae and nymphs, respectively. The status of pure isolates for each species was demonstrated either by fluorescent antibody specific seroconversion, by polymerase chain reaction (PCR) and subinoculation. The results demonstrated the efficacy of the previous reported method to isolate *B. bovis* from larvae and *B. bigemina* from nymphs from naturally infected ticks. Finally, it was assumed that colostrum-deprived newborn calves might be used as a susceptible animal model to isolate hemoparasites in endemic areas, combining advantages such as effectiveness and feasibility with low cost.

**KEY WORDS:** Babesiidae, cattle, bovine babesiosis, tick-borne disease.

## 2.1 INTRODUÇÃO

Os protozoários *B. bigemina* Smith & Kilborne 1893 e *B. bovis* Babes 1888 são microrganismos intra-eritrocíticos que causam doença infecciosa caracterizada por quadro típico de anemia hemolítica nos bovinos. Nas Américas, estes agentes são transmitidos naturalmente pelo carrapato *Boophilus microplus* Canestrini 1887, cuja distribuição geográfica ocorre entre os paralelos 32° N e 32° S (GONZALES, 1995).

O clima predominantemente tropical do Estado de Goiás favorece o ciclo de vida do *B. microplus* e, portanto, sua grande incidência (BORGES & SILVA, 1994). Esta situação epidemiológica justifica as altas taxas de prevalência de *B. bigemina* e *B. bovis* nos rebanhos da região, caracterizando uma condição de estabilidade enzoótica (LINHARES et al., 1992, SANTOS et al., 2001).

GRISI et al. (2002) estimaram prejuízos anuais de 2 bilhões de dólares para a pecuária nacional, em decorrência da ação direta do *B. microplus* ou através dos agentes patogênicos por ele transmitidos.

A diversidade genética tem sido demonstrada para espécies do gênero *Babesia* entre isolados de diferentes regiões geográficas, sendo, esta, responsável pelo polimorfismo antigênico que determina heterogeneidade intra-específica (ALLRED, 2001). Considerando-se a extensão territorial do Brasil e o expressivo efetivo de bovinos, pode-se inferir a existência de acentuadas variações no perfil molecular entre diferentes isolados ou cepas regionais (MADRUGA et al., 2002), o que justifica a necessidade da obtenção e disponibilização de microrganismos de referência para estudos de epidemiologia molecular das populações autóctones.

Para o isolamento e manutenção de amostras viáveis de hemoparasitos de bovinos tem sido empregado meio de cultura de eritrócitos ou bovinos suscetíveis. O primeiro é considerado mais adequado tecnicamente, no entanto, alguns fatores como o custo elevado e a necessidade de pessoal altamente qualificado limitam seu emprego (BOSE et al., 1995).

Bovinos suscetíveis têm sido utilizados, alternativamente, para o isolamento de amostras puras a partir de carrapatos naturalmente infectados por *B. bigemina* e *B. bovis*. Esta estratégia é embasada no conhecimento de que *B.*

*bigemina* é transmitida por ninfas e adultos de *B. microplus* (CALLOW & HOYTE, 1961) e *B. bovis* apenas pelas larvas (MAHONEY & MIRRE, 1979).

Como animais suscetíveis, utilizam-se bovinos procedentes de área livres (DALGLIESH & STWART, 1983; RUIZ *et al*, 1999) ou, ainda, bezerros nascidos em área endêmica, que tenham sido mantidos fora do contato com *B. microplus*, desde o nascimento até a perda total da imunidade colostrar (KESSLER *et al.*, 1987; KESSLER *et al.*, 1998; BARREIRA *et al.*, 2005).

Objetivou-se com o presente trabalho obter isolados autóctones puros de *B. bigemina* e *B. bovis* para comporem banco de isolados de referência regional. Paralelamente foi avaliado o emprego de bezerros neonatos totalmente privados de colostro, como animais suscetíveis, para o isolamento dos respectivos microrganismos.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Para obtenção de isolados puros de *B. bovis* e de *B. bigemina*, foram inicialmente alojados 6 bezerros totalmente privados de colostro, portanto desprovidos de imunidade materna. Os animais eram mestiços Holandês/Jersey, em aparente estado de higidez, nascidos em local livre de carrapatos e transferidos para a área de isolamento na Escola de Veterinária (EV) da UFG, onde foram adotadas medidas de biossegurança para prevenir a entrada de vetores artrópodes. Foram observados os cuidados relativos à alimentação e ao ambiente, no sentido de proporcionar conforto e bem-estar animal. Os bezerros receberam dieta a base de leite *in natura*, na quantidade de três a quatro litros diários.

Com o objetivo de se obter larvas e ninfas de *B. microplus*, infectadas por *Babesia* spp., foram colhidas teleóginas com diâmetro  $\geq 4\text{mm}$  em bezerros mestiços crioulos, entre 2 a 5 meses de idade, pertencentes ao rebanho bovino da EV/UFG. No laboratório eram higienizadas e distribuídas seis teleóginas por placa de Petri, fixadas com fita adesiva de dupla face, perfazendo um total de 143 placas. As placas eram então identificadas e incubadas em estufa B.O.D. a  $27^{\circ}\text{C}$  + ou  $-1^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa superior a 80%, conforme THOMPSON (1976). Ovos até o terceiro dia do início da postura foram eliminados para garantir maior taxa de infecção (RIEK, 1964, 1966). Sete dias após início da postura, procedeu-se a

análise da hemolinfa das teleóginas, segundo IICA (1987), para identificar os esporozoítos de *Babesia* spp. As teleóginas positivas foram mantidas na estufa para postura e as negativas descartadas. Os ovos das positivas foram pesados e acondicionados em seringas plásticas adaptadas, distribuindo-se 0,5 g de ovos, equivalente à 10.000 larvas, em cada uma das 15 seringas que foram recolocadas na B.O.D. (BARREIRA *et al.*, 2005).

As infecções experimentais dos bezerros suscetíveis, visando a obtenção dos isolados puros de *B. bovis* e *B. bigemina*, foram executadas empregando-se, respectivamente, larvas e ninfas de *Boophilus microplus* infectadas naturalmente, conforme MAHONEY & MIRRE (1979) e CALLOW & HOYTE (1961). No sétimo dia de vida, o bezerro nº 1 recebeu na região das duas orelhas, 20.000 larvas de 10 dias de eclosão, contidas em cápsulas de tecido fixado na base das mesmas, segundo KESSLER *et al.* (1987). Entre o quarto e o quinto dias da fixação das larvas procedeu-se a remoção mecânica das metalarvas, sendo estas transferidas para o bezerro nº 2, contidas da mesma forma como descrito acima.

Os bezerros nº 3 e nº 4 foram mantidos no mesmo ambiente e sob as mesmas condições de manejo, sem contudo receberem qualquer tipo de infestação ou inóculo, como controles.

Após a infestação e durante todo o período experimental os bezerros eram monitorados clínica e laboratorialmente, duas vezes ao dia. A temperatura retal e sinais clínicos eram registrados em fichas individuais. Uma vez verificada alteração nos parâmetros normais, procedia-se a coleta de sangue com anticoagulante para a pesquisa microscópica de parasitos em preparações de esfregaço sanguíneo coradas pelo Giemsa e para a determinação do volume globular (VG) pela técnica convencional do micro-hematócrito. Para a avaliação do nível de parasitemia adotou-se metodologia descrita pelo IICA (1987). Uma vez confirmada a infecção patente, colheu-se uma amostra de sangue com anticoagulante EDTA (Anticoagulante Universal, Doles) para extração de DNA total e outra com heparina (1mg/mL) para criopreservação.

Para a extração de DNA total, empregou-se *kit* comercial (GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit, Amersham Biosciences). As amostras de DNA foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) com a finalidade

de comprovar a identidade molecular e a pureza dos isolados. Empregou-se, na reação, o par de *primers* GAU9/GAU10, para a amplificação espécie-específica de um fragmento do gene SSU RNAr de *B. bovis* e o par GAU6/GAU7 para *B. bigemina*, conforme LINHARES et al. (2002). As amostras foram também submetidas ao teste de PCR específico para a amplificação de um fragmento do gene MSP1 de *Anaplasma marginale*, segundo BARBET & ALLRED (1991). O teste de PCR foi também aplicado às amostras de DNA total extraídas do sangue coletado dos bezerros no dia -1 das infestações por carrapatos.

As amostras de sangue heparinizado foram alíquotadas em tubos plásticos com tampas rosqueadas de 3 mL e criopreservadas, sob a forma de estabilizado, em solução PBS/DMSO, conforme IICA (1987).

No dia -1 da infestação com carrapatos e 21 dias após o início da parasitemia patente colheu-se, ainda, dos bezerros n° 1 e 2, amostras de sangue sem anticoagulante para a obtenção de soro com a finalidade de avaliar a soroconversão específica pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Os bezerros n° 3 e 4 também foram submetidos a este tipo de avaliação. As reações foram executadas em diluições seriadas do soro na escala de 1:10, a partir de 1:80 e até 1:5.120, segundo TODOROVIC & LONG (1976). O conjugado (FITIC anti-IgG bovina, Sigma) foi utilizado na diluição de 1:350, conforme prévia titulação. Os antígenos empregados procederam da Universidade Federal de Minas Gerais, gentilmente cedidos pelo Dr. José Divino Lima.

Com a finalidade de comprovar a pureza e a viabilidade das amostras criopreservadas, os bezerros n° 5 e n° 6 foram subinoculados com 3mL dos isolados criopreservados de *B. bovis* e *B. bigemina*, obtidos previamente nos bezerros n° 1 e n° 2, respectivamente.

### **2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Do total de 859 teleóginas de *B. microplus* mantidas para a produção de larvas e ninfas, 25,8% (n=222) apresentaram infecções por *Babesia* spp., evidenciadas pela presença de esporocinetos ao exame microscópico da hemolinfa.

O bezerro n° 1, infestado com larvas de *B. microplus* obtidas de teleóginas infectadas naturalmente por *Babesia* spp., apresentou aumento da

temperatura retal no 12º dia pós-infestação, ocasião em que foi detectada infecção patente por *B. bovis*, com parasitemia estimada em 0,01%. Infecção patente por *B. bigemina* foi obtida no bezerro nº 2, com parasitemia de 0,1%, no 11º dia pós-infestação com ninfas de *B. microplus*. Os períodos prepatentes observados estavam dentro dos valores padrões para as duas espécies, como registrado na literatura (LOSOS, 1986; KESSLER *et al.*, 1987; KESSLER *et al.*, 1998; BARREIRA *et al.*, 2005).

O fragmento espécie-específico de 541pb de *B. bovis* foi evidenciado pela eletroforese dos produtos de PCR somente da amostra de DNA total do bezerro nº 1, referente ao dia da parasitemia. Por outro lado, o resultado do ensaio de PCR para o fragmento espécie-específico de 685 pb de *B. bigemina* foi positivo apenas para a amostra do bezerro nº 2 do dia da parasitemia. Esses resultados confirmaram a identidade molecular e a pureza dos isolados de *B. bovis* e *B. bigemina*, nos bezerros nº1 e 2, respectivamente (Quadro 1). Os resultados dos ensaios de PCR para *A. marginale* foram negativos para todas as amostras testadas, ou seja, referentes ao dia -1 e ao dia da parasitemia em ambos os bezerros.

**Quadro 1.** Resultados das reações de PCR para DNA extraído de amostras de sangue colhidas em bezerros suscetíveis antes e após a infestação experimental com larvas (Bezerro nº.1) e ninfas (Bezerro nº 2) infectadas respectivamente com *B. bovis* e *B. bigemina* em Goiânia, 2005.

PCR espécie-específico	Bezerro no. 1		Bezerro no. 2	
	D-1	PP	D-1	PP
<i>A. marginale</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
<i>B. bovis</i>	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
<i>B. bigemina</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.

D-1= amostra colhida no dia anterior à infestação por larvas ou ninfas; PP= amostra colhida no primeiro dia de parasitemia patente; Neg.= resultado PCR negativo; Pos.= resultado de PCR positivo.

Pela sorologia pareada pela RIFI, observou-se soroconversão específica para *B. bovis* no bezerro nº 1, com resultado negativo no dia -1 e positivo até o título de 1:1.280 no 21º dia após o início da parasitemia. A



soroconversão específica para *B. bigemina* foi evidenciada no bezerro n° 2 pela diferença entre o título zero no dia -1 e 1:640 no 21° dia após a parasitemia patente. Portanto, a soroconversão específica observada para *B. bovis* no bezerro n° 1 e para *B. bigemina* no bezerro n° 2, assim como os títulos das reações, representaram a confirmação sorológica da obtenção dos isolados puros dos respectivos hemoparasitos, com valores de títulos sorológicos dentro dos parâmetros reportados por outros autores (RUIZ *et al.*, 1999; MENDONÇA *et al.*, 2003).

Os bezerros controle n° 3 e n° 4 não apresentaram nenhuma manifestação clínica e a sorologia não revelou soroconversão dos mesmos.

Os bezerros n° 5 e 6, subinoculados com os estabilizados criopreservados de *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente, apresentaram infecções patentes puras. Os períodos prepatentes observados nesta etapa foram de 11 dias para *B. bovis* e de 7 dias para *B. bigemina*.

Os resultados alcançados referentes aos exames de PCR, sorologia (soroconversão específica) e subinoculação foram confirmatórios comprovando serem equivalentes para a identificação dos protozoários em nível de espécie como reportado por BÖSE *et al.* (1995).

Neste estudo foi demonstrada a viabilidade do uso de bezerros neonatos, privados de colostro, como animais suscetíveis para a obtenção de isolados puros de hemoparasitos. Apesar da vulnerabilidade imunológica dos bezerros devido a privação de colostro, nenhum distúrbio de ordem infecciosa foi registrado em consequência a esta condição. As medidas sanitárias e de biossegurança adotadas durante todo o experimento, envolvendo os animais, o pessoal, os alimentos e o ambiente, provavelmente contribuíram para contornar o risco potencial.

Foram observadas as seguintes vantagens decorrentes da utilização de bezerros neonatos como animais suscetíveis, quando comparadas com outros métodos tradicionalmente aplicados (DALGLIESH & STWART, 1983; KESSLER *et al.*, 1987; KESSLER *et al.*, 1998; BARREIRA *et al.*, 2005): custo irrisório dos animais experimentais e seu transporte, pois os bezerros eram descartes de granjas leiteiras da região; curto período de tempo de alojamento e manutenção dos animais em experimento; baixo custo com alimentação e manejo simplificado.

Apesar dos resultados alcançados, os autores alertam para a necessidade veemente de estrita precaução quanto a presença de carrapatos no local de nascimento e alojamento para os bezerros suscetíveis, quando o experimento for realizado em região endêmica para tristeza parasitária bovina. Da mesma forma, falhas nos cuidados com biossegurança e conforto animal podem produzir resultados não satisfatórios.

Os resultados alcançados neste estudo referentes à obtenção de isolados puros de *B. bovis* e *B. bigemina* a partir de larvas e ninfas de *B. microplus*, respectivamente, comprovaram a eficácia dos métodos descritos originalmente por CALLOW & HOYTE (1961) e MAHONEY & MIRRE (1979) e também empregado por outros pesquisadores como KESSLER et al. (1987), KESSLER et al. (1998) e BARREIRA et al. (2005).

## 2.4 CONCLUSÕES

- O emprego de larvas e de ninfas de *B. microplus*, procedentes de área endêmica para babesiose bovina na região de cerrado é adequado para a obtenção de isolados puros de *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente.

Bezerros recém-nascidos e totalmente privados de colostro são adequados como animais suscetíveis para experimentos envolvendo o isolamento de *B. bovis* e de *B. bigemina*.

## 2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLRED, D.R. Antigenic variation in babesiosis: is there more than one 'why'? **Microbes Infect**, v.3, n.6, p.481-491, 2001.
2. BARBET, A.F.; ALLRED, D.R. The msp1 beta multigene family of *Anaplasma marginale*: nucleotide sequence analysis of an expressed copy. **Infect Immun**, v.59, n.3, p.971-976, 1991.
3. BARREIRA, J.D.; DORIA ROSSI, M.I.; SILVA, G.V.O.; PIRES, F.A.; MASSARD, C.L. Morfologic characterization of biological aspects of evolutive forms of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) (Protozoa: Babesiidae) in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Rev Bras Parasitol Vet**, v.14, n.1, p.1-6, 2005.
4. BORGES, L.M.F.; SILVA, R.F. Ixodídeos parasitos de bovinos e eqüinos da microrregião de Goiânia, Goiás. **Rev Patol Trop**, v.23, n.1, p.69-74, 1994.

5. BÖSE R.; JORGENSEN, W.K.; DALGLIESH, R.J.; FRIEDHOFF, K.T.; VOS, A.J., Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Vet Parasitol**, v.57, p.61-74, 1995.
6. CALLOW, L.L.; HOYTE, H.M.D. Transmission experiments using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia* spp. and the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Aust Vet J**, v.37, p.381-390, 1961.
7. DALGLIESH, R.J. & STEWART, N.P. The use of tick transmission by *Boophilus microplus* to isolate pure strains of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* from cattle with mixed infections. **Vet Parasitol**, v.13, p.317-323, 1983.
8. GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA-BORJA, G.E.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **Hora Vet**, n. 125, p.8-10. 2002.
9. GONZALES, J.C. **O controle do carrapato do boi**. 2.ed. Porto Alegre: Edição do autor, 1995. 80p.
10. IICA - Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. **Técnicas para el diagnóstico de babesioses y anaplasmosis bovina**. San José: IICA, 1987. 79p.
11. KESSLER, R.H.; MADRUGA, C.R.; JESUS, E.F.; SEMPREBOM, D.V. Isolamento de cepas puras de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em área enzoótica. **Pesq Agropec Bras**, v.22, n.7, p.747-752, 1987.
12. KESSLER, R.H.; SCHENK, M.A.M.; MADRUGA, C.R.; GOMES, A. Viability of a method for the isolation of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* to create a strain bank from five physiographical regions of Brazil. **Rev Bras Parasitol**, v.7, n.2, p.91-94, 1998.
13. LINHARES, G.F.C.; MASSARD, C.L.; ARAÚJO, J.L.B.; ALVES, L. Levantamento sorológico para *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1983) e *Babesia bovis* (Babès, 1888) em bovinos na região Centro-Oeste do Brasil. **Arq Univ Fed Rur RJ**, v.15, n.1, p.85-91, 1992.
14. LINHARES, G.F.C.; SANTANA, A.P.; LAUERMAN, H.L.; MADRUGA, C.R. Assessment of primers designed from the small ribosomal subunit RNA for specific discrimination between *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* by PCR. **Ciênc An Bras**, v.3, n.2, p.27-32, 2002.
15. LOSOS, G.J. **Infectious tropical diseases of domestic animals**. New York: Longman Scientific & Technical, 1986. 138p.
16. MADRUGA, C.R.; LEAL, C.R.B.; FERREIRA, A.M.T. et al. Genetic and antigenic analysis of *Babesia bigemina* isolates from five geographical regions of Brazil. **Pesq Vet Bras**, v.22, n.4, p.153-160, 2002.

17. MAHONEY, D.F. & MIRRE, G.B. A note on the transmission of *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*) by the one-host tick *Boophilus microplus*. **Res Vet Sci**, v.26, p.253-254, 1979.
18. MENDONÇA, C.L.; VIEIRA, D.; KOHAYAGAWA, A.; SCHENK, M.A.M.; MADRUGA, C.R.; AFONSO, J.A.B. Clinical and hematological evaluation of Nelore calves experimentally infected with isolates of *Babesia bigemina* from the southeastern, northeastern and northern regions of Brazil. **Pesq Vet Bras**, v.23, n.2, p.52-60, 2003.
19. RIEK, R.F. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). **Aust J Agric Res**, v.15, n.5, p.802-821, 1964.
20. RIEK, R.F. The life cycle of *Babesia argentina* Lignière, 1903 (Sporozoa: Piroplasmidea) in the vector *Boophilus microplus*). **Aust J Agric Res** v.17, n.2, p.247-254, 1966.
21. RUIZ, P.M.G.; LIMA, J.D.; PASSOS, L.M.F. Serological profile of *Babesia bovis* in animals submitted to premunition. **Rev Bras Parasitol Vet**, v.81, n.1, p.45-48, 1999.
22. SANTOS, H.Q.; LINHARES, G.F.C.; MADRUGA, C.R. Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em bovinos de leite da microrregião de Goiânia determinada pelos testes de Imunofluorescência indireta e ELISA. **Ciê An Bras**, v.2, n.2, p.133-137, 2001.
23. THOMPSON, K.C. A technique to establish a laboratory colony of *Boophilus microplus* infected with *Babesia bigemina*. **Vet. Parasitol.**, v.2, p.223-229, 1976.
24. TODOROVIC, R.A.; LONG, R.F. Comparison of indirect fluorescent antibody (IFA) with complement fixation (CF) tests for diagnosis of *Babesia* spp. infections in Colombia cattle. **Zeitschrift Tropenmed Parasitol**, v.27, p.169-181, 1976.

### **CAPITULO III - OBTENÇÃO DE ISOLADO PURO DE *Anaplasma marginale* EM BEZERROS NEONATOS PRIVADOS DE COLOSTRO.**

#### **RESUMO**

O trabalho foi realizado com o objetivo principal de se obter isolados autóctones puros de *Anaplasma marginale* a partir de amostra de sangue de bovino criado em uma área endêmica para a Tristeza Parasitária Bovina no município de Goiânia, Estado de Goiás, Brasil. O inóculo para o isolamento de *A. marginale* foi obtido de animal doador, portador de infecções naturais mistas, após receber tratamento seletivo com dose babesicida esterelizante de dipropionato de imidocarb. Dois dias após o tratamento foi colhida uma amostra de sangue de 20 mL do animal doador para inoculação em bezerro neonato privado de colostro e livre de infecções por hemoparasitos. Após 30 dias da inoculação, o receptor apresentou febre, apatia e parasitemia patente por *A. marginale*. Amostras de sangue foram então colhidas e preparadas na forma de estabilizados para serem criopreservadas e, assim, comporem banco de isolados de hemoparasitos autóctones. A comprovação da pureza do isolado foi realizada, concomitantemente, pela demonstração de soroconversão específica, pelos testes de PCR e, ainda, pela sub-inoculação da amostra criopreservada em bezerro suscetível. Constatou-se ainda que o uso de bezerros neonatos privados de colostro, como animais suscetíveis, pode ser considerado um modelo prático, eficaz e relativamente barato, para o isolamento de hemoparasitos em regiões endêmicas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Rickettsiales, bovinos, anaplasmose, infecção experimental

**OBTAINMENT OF *Anaplasma marginale* PURE ISOLATE IN COLOSTRUM-DEPRIVED NEWBORN CALVES.**

#### **ABSTRACT**

This study was conducted with the main objective of obtaining pure autochthonous *Anaplasma marginale* isolate from blood sample of indigenous bovine which has been raised in an enzootic area of the municipality of Goiânia, State of Goiás, Brazil. The *A. marginale* inoculum was obtained from a naturally infected carrier animal. The donor was previously treated with imidocarb dipropionate in order to sterilize any possible babesia concomitant infection. A 20mL blood sample was collected from the donor two days after the treatment. The blood was then inoculated in a colostrum-deprived newborn calf which was used as a susceptible and *Anaplasma*-free animal. Thirty days after inoculation the susceptible calf showed signs of fever, apathy and patent *A. marginale* parasitemia. At this time other blood samples were collected, aliquoted and cryopreserved in order to establish a bank of autochthonous pure isolates. The purity of the isolate was

confirmed by specific seroconversion, by PCR and also by subinoculation of cryopreserved samples in another susceptible animal. It was concluded that colostrum-deprived newborn calves can be considered a practical, efficient and a low cost model to be used in experiments designed to isolate hemoparasites in enzootic areas.

**KEY WORDS:** Rickettsiales, cattle, anaplasmosis, experimental infection.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) é uma riquetsia de parasitismo intraeritrocitário obrigatório, que provoca em bovinos a doença conhecida por anaplasnose (RISTIC & KREIER, 1974). Esta, por sua vez, faz parte do complexo designado de Tristeza Parasitária Bovina que, geralmente, é responsável por sérios prejuízos à pecuária bovina, como reflexo da alta taxa de mortalidade, perda de peso e diminuição na produção de leite (KESSLER et al., 2004).

O *A. marginale* ocorre endemicamente em regiões tropicais e subtropicais do mundo, apresentando ampla distribuição geográfica nas Américas, na África e na Austrália (KESSLER & SCHENK, 1998). No Brasil, é endêmico em todo o território, causando importantes problemas sanitários, não somente em áreas de instabilidade enzoótica, mas também em áreas de estabilidade enzoótica (VIDOTTO, & MARANA, 2001).

A principal forma de transmissão do *A. marginale* ocorre através da participação de artrópodes, como vetores mecânicos ou biológicos, podendo ainda ser transmitida iatrogenicamente (GUGLIELMONE, 1995). A transmissão congênita também tem sido reportada (RIBEIRO et al., 1995). No Brasil, o carrapato *Boophilus microplus* é considerado o seu principal vetor biológico (KESSLER, 2001).

No Estado de Goiás, as condições climáticas são propícias ao desenvolvimento do ciclo biológico do *B. microplus*, durante ano todo. Esta interação agente/ambiente favorável contribui para o estabelecimento de condições epidemiológicas que caracterizam uma situação de estabilidade enzoótica. SANTOS et al. (2001), demonstraram taxa de prevalência de 96,73%

(n=521) para os rebanhos bovinos da microrregião de Goiânia, sendo que 100% das propriedades avaliadas (n=25) apresentavam positividade para *A. marginale*.

Os estudos sobre os fenômenos biológicos, epidemiológicos e imunológicos, assim como as pesquisas sobre novas técnicas de diagnóstico e na produção de imunógenos, requerem a disponibilidade de cepas ou isolados que permitam a obtenção de produtos biológicos purificados. O desenvolvimento de novos métodos científicos depende da utilização de produtos biológicos que atendam às necessidades mínimas necessárias para a padronização dos mesmos.

O emprego de bovinos suscetíveis para o isolamento de amostras de hemoparasitos requer a locomoção de animais procedentes de áreas livres (DALGLIESH & STUART, 1983; SCHENK et al., 1993; RUIZ et al., 1999) ou de criações mantidas sob estrito controle contra os vetores, com a finalidade específica de preparar animais para experimentos desta natureza (KESSLER et al., 1987, KESSLER et al., 1998). Bezerros nascidos de vacas imunes têm sido também utilizados para esta finalidade (KESSLER et al., 1998; BARREIRA et al., 2005), no entanto, estes devem ser confinados em instalações protegidas contra os vetores, a partir do nascimento e até a idade de quatro meses, para garantir a total eliminação da imunidade colostrar.

Em condições laboratoriais há, como alternativa, o método do isolamento e manutenção de hemoparasitos em meios de cultura de eritrócitos. Apesar deste ser reconhecido como método tecnicamente mais correto, fatores como o custo elevado e a necessidade de técnicos altamente qualificados limitam seu uso mais frequente (BOSE et al., 1995).

Objetivou-se com o presente trabalho obter isolados autóctones puros de *A. marginale* para compor banco de isolados de referência regional, a partir de amostra de sangue procedente de bovino portador de infecções naturais mistas com os agentes da Tristeza Parasitária Bovina. Paralelamente, avaliou-se o emprego de bezerros neonatos totalmente privados de colostro, como animais suscetíveis, para o isolamento do respectivo microrganismo.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção de isolados puros de *A. marginale* foram inicialmente alojados três bezerros receptores totalmente privados de colostro, antes portanto de receberem transferência da imunidade materna via colostro. Os animais eram mestiços Holandês/Jersey, com aparente estado de higidez, nascidos em ambiente livre de carrapatos e confinados em instalações numa área de isolamento na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (EV/UFG). Medidas de biossegurança foram adotadas para prevenir a entrada de vetores artrópodes. Foram ainda observados os cuidados relativos à alimentação e ao ambiente, no sentido de proporcionar conforto e bem-estar animal. Os bezerros receberam dieta à base de leite *in natura*, na quantidade de três a quatro litros diários.

Para a obtenção do inóculo de campo de *A. marginale* foi preparado um bezerro doador, com idade de 12 meses, livre de infecções, proveniente do rebanho da EV/UFG. O animal foi considerado provável portador de infecção natural por *A. marginale*, com base no fato de ter sido criado em uma área endêmica de permanente exposição ao *B. microplus* e apresentar anticorpos anti-*A. marginale*, detectados pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

O doador foi submetido a tratamento parenteral com dipropionato de imidocarb (Imizot B12, União Química Farmacêutica Nacional S.A.) na dose de 3 mg/Kg de peso vivo, via subcutânea. A dosagem foi assim estipulada visando alcançar um efeito babesicida esterilizante que não comprometesse o estado de portador para *A. marginale* (LOSOS, 1986, IICA, 1987). Dois dias após a administração do fármaco, foi colhida uma amostra de 20 mL de sangue do doador por meio de punção da veia jugular. O sangue retirado foi imediatamente aplicado no bezerro receptor de nº 1, sem anticoagulante.

Após a inoculação e durante todo o período experimental o bezerro foi monitorado clínica e laboratorialmente, duas vezes ao dia. A temperatura retal e os sinais clínicos eram registrados em fichas individuais. Uma vez verificada alteração nos parâmetros normais, procedia-se a coleta de sangue com anticoagulante para a pesquisa microscópica de parasitos em preparações de esfregaço sanguíneo coradas pelo Giemsa e para a verificação do volume



globular (VG) pela técnica do micro-hematócrito. A parasitemia foi determinada adotando-se a metodologia descrita por IICA (1987).

Quando confirmada a infecção patente por *A. marginale*, colheu-se uma amostra de 20mL de sangue com anticoagulante EDTA (Anticoagulante Universal, Doles – 1 gota/5mL) para extração de DNA total e outra de 20mL em tubo heparinizado (1mg/mL) para o preparo de estabilizado e criopreservação.

A extração de DNA foi realizada empregando-se *kit* comercial (GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit, Amersham Biosciences). Amostras de DNA total foram testadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com a finalidade de comprovar a identidade molecular e a pureza do isolado. As reações de PCR foram realizadas adotando-se três protocolos diferentes. Nos dois primeiros foram empregados os pares de iniciadores GAU9/GAU10 e GAU6/GAU7 para a amplificação espécie-específica de fragmentos do gene SSU RNAr de *Babesia bovis* (541 pares de base – pb) e de *Babesia bigemina* (685 pb), respectivamente, conforme LINHARES et al. (2002). No terceiro ensaio de PCR foram empregados iniciadores específicos para o fragmento de 409 pb do gene MSP1 de *A. marginale*, segundo BARBET & ALLRED (1991). Os testes de PCR também foram aplicados à amostra de DNA total, extraído do sangue coletado no dia –1 da inoculação no receptor.

A amostra de 20mL de sangue heparinizado foi aliquoteada em tubos plásticos de 3 mL, com tampa rosqueável (Techno Plastic Products, TPP®), para a criopreservação sob a forma de estabilizado, em solução PBS/DMSO, conforme IICA (1985).

Do bezerro receptor nº 1 foram ainda colhidas amostras de sangue sem anticoagulante para a obtenção do soro, no dia -1 da inoculação e 21 dias após o início da parasitemia patente por *A. marginale*. Estas foram utilizadas para a demonstração de soroconversão específica pela RIFI.

Os testes sorológicos de RIFI foram executados em diluições seriadas do soro na escala de 1:2, a partir de 1:80 e até 1:5.120, segundo metodologia descrita por TODOROVIC & LONG (1976). O conjugado (FITIC anti-IgG bovina, Sigma) foi utilizado na diluição de 1:350, conforme prévia titulação. Foram realizadas reações com antígenos totais de *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*, preparados em lâminas individualizadas, de acordo com IICA (1987). Os

antígenos utilizados na reação de IFI foram preparados na Universidade Federal de Minas Gerais e gentilmente cedidos pelo Dr. José Divino Lima (in memoria).

Com a finalidade de comprovar a pureza e a viabilidade do isolado criopreservado de *A. marginale* obtido no bezerro nº 1, uma amostra de 3mL do mesmo foi subinoculada no bezerro nº 2. Para este último foram executados procedimentos idênticos aos do bezerro nº 1. O bezerro nº 3 foi mantido como controle, durante todo o experimento, sob as mesmas condições dos anteriores, sem contudo receberem algum tipo de inóculo.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O bezerro receptor nº 1, inoculado com amostra de sangue procedente de bovino portador de infecção natural de *A. marginale*, apresentou aumento da temperatura retal no 30º dia pós-inoculação. Nesta mesma ocasião foi detectada infecção patente com parasitemia de 1% para *A. marginale*, ao exame microscópico do esfregaço sanguíneo. O período prepatente observado ocorreu, portanto, dentro do intervalo esperado para a enfermidade, entre 20 a 40 dias, como registrado por RISTIC (1981).

A eletroforese dos produtos de PCR revelou o fragmento espécie-específico de 409 pb do gene MSP1 apenas nas reações realizadas com DNA total extraído no dia da parasitemia patente, tanto do bezerro nº 1 como do nº 2. Os resultados dos ensaios de PCR para *B. bovis* e *B. bigemina* foram negativos para todas as amostras de DNA procedentes de ambos os bezerros receptores (Quadro 1).

**Quadro 1.** Resultados das reações de PCR em amostras de DNA extraídas de sangue de bezerros suscetíveis, um dia antes da infecção experimental com amostra de campo de *A. marginale* (D-1) e no primeiro dia de parasitemia patente (PP).

PCR espécie-específico	Bezerro nº. 1		Bezerro nº. 2	
	D-1	PP	D-1	PP
<i>A. marginale</i>	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.
<i>B. bovis</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
<i>B. bigemina</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

Neg.= resultado de PCR negativo; Pos.= resultado de PCR positivo.

Os resultados referentes aos exames de RIFI para *B. bigemina* e *B. bovis* foram negativos tanto para as amostras de soros coletadas no dia anterior à inoculação como naquelas referentes ao 21º dia após o início da parasitemia patente por *A. marginale*. Por outro lado, os testes de RIFI evidenciaram soroconversão específica para *A. marginale*, nos dois bezerros receptores, os quais apresentaram, títulos iguais a zero no dia -1 da inoculação e 1:1.280 (bezerro nº1) e 1:640 (bezerro nº 2) no 21º dia após o início da parasitemia.

A soroconversão, demonstrada em amostras pareadas de soro, tem sido amplamente empregada como um método confirmatório e seguro para o diagnóstico de infecções por microrganismos específicos (KUTTLER et al, 1984; SWAI et al., 2005). Portanto, os resultados dos exames sorológicos permitiram concluir que os isolados obtidos nos bezerros nº 1 e 2 representavam amostras puras de *A. marginale*.

O bezerro nº 2, subinoculado com estabilizado criopreservado, apresentou infecção patente pura por *A. marginale* no 28º dia pós-inoculação, com parasitemia de 1,2%. Os bezerros nº 3 e nº 4, mantidos como controle, não apresentaram nenhuma manifestação clínica, nem soroconversão, confirmando a pertinência dos critérios experimentais conduzidos.

Os resultados alcançados neste estudo, referentes aos exames de PCR, às provas sorológicas e à subinoculação, foram reciprocamente confirmatórios para a obtenção de isolado puro de *A. marginale*.

A obtenção de isolados puros de *A. marginale*, a partir da inoculação experimental com amostra de sangue oriunda de animal portador de infecções naturais mistas (agentes da Tristeza Parasitária Bovina), comprovou a eficácia da atividade seletiva quimioesterilizante do dipropionato de imidocarb para os microrganismos *B. bigemina* e *B. bovis*, como descrito previamente por LOSOS (1986) e IICA (1987).

Fica portanto demonstrada, a viabilidade do uso de bezerros neonatos, privados de colostro, como animais suscetíveis para a obtenção de isolados puros de hemoparasitos. Apesar da vulnerabilidade imunológica dos bezerros devido à privação de colostro (BESSI et al., 2002; PAULETTI et al., 2003), nenhuma ocorrência clínica foi registrada em consequência a esta condição. As medidas

sanitárias e de biossegurança adotadas durante o experimento, envolvendo os animais, o pessoal, os alimentos e o ambiente, certamente contribuíram para contornar o risco potencial.

Nas condições em que foi desenvolvido o presente trabalho, pode-se observar algumas vantagens do uso de bezerros neonatos como animais suscetíveis, em relação a outros métodos tradicionalmente aplicados por outros pesquisadores como DALGLIESH & STUART (1983), KESSLER et al. (1987), SCHENK et al. (1993), KESSLER et al. (1998), RUIZ et al. (1999) e BARREIRA et al. (2005). Entre estas vantagens, destacam-se o baixo custo dos animais e o curto intervalo de tempo entre a preparação dos mesmos e a conclusão do experimento. Em função da idade e do pequeno porte dos animais, registrou-se baixos dispêndios com transporte, alojamento e alimentação, além da maior facilidade com o manejo diário.

Apesar dos resultados satisfatórios alcançados com esta metodologia, os autores alertam para a necessidade de estrita precaução quanto à presença de carrapatos no local de nascimento e alojamento para os bezerros suscetíveis, principalmente quando o experimento for realizado em região endêmica para tristeza parasitária bovina. Da mesma forma, falhas nos cuidados com biossegurança e conforto animal podem desencadear resultados indesejáveis.

### **3.4 CONCLUSÕES**

Nas condições deste estudo pode-se concluir que é possível obter de isolados puros de *A. marginale*, a partir do sangue de bovino portador de infecções naturais mistas por agentes da Tristeza Parasitária Bovina, empregando-se o dipropionato de imidocarb como uma droga babesicida esterilizante.

A utilização de bezerros neonatos, privados de colostro, como animal suscetível para obtenção de isolados puros de *A. marginale* é uma alternativa viável e de baixo custo, quando comparado aos métodos convencionais.

### 3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARBET, A.F.; ALLRED, D.R. The msp1 beta multigene family of *Anaplasma marginale*: nucleotide sequence analysis of an expressed copy. **Infect Immun**, v.59, n.3, p.971-976, 1991.
2. BARREIRA, J.D.; DORIA ROSSI, M.I.; SILVA, G.V.O.; PIRES, F.A.; MASSARD, C.L. Morfológic characterization of biological aspects of evolutive forms of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) (Protozoa: Babesiidae) in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Rev Bras Parasitol Vet**, v.14, n.1, p.1-6, 2005.
3. BESSI, R.; PAULETTI, P.; d'ARCE, R.D.; NETO, R.M. Absorção de anticorpos do colostro em bezerros. I. Estudo no intestino delgado proximal. **Rev Bras Zootec**, v.31, n.6, p.2314-232, 2002.
4. BÖSE R.; JORGENSEN, W.K.; DALGLIESH, R.J.; FRIEDHOFF, K.T.; VOS,A.J., Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Vet Parasitol**, v.57, p.61-74, 1995.
5. DALGLIESH, R.J. & STEWART, N.P. The use of tick transmission by *Boophilus microplus* to isolate pure strains of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* from cattle with mixed infections. **Vet Parasitol**, n.13, p.317-323, 1983.
6. IICA - Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. **Técnicas para el diagnóstico de babesioses y anaplasmosis bovina**. San José: IICA, 1987. 79p.
7. KESSLER, R.H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesq Vet Bras**, v.21, n.4, p.177-179, 2001.
8. KESSLER, R.H.; MADRUGA, C.R.; JESUS, E.F.; SEMPREBOM, D.V. Isolamento de cepas puras de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em área enzoótica. **Pesq Agropec Bras**, v.22, n.7, p.747-752, 1987.
9. KESSLER, R.H., SCHENK, M.A.M. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanosomose dos bovinos**. Campo Grande: EMBRAPA – CNPGC, 1998. 157p.
10. KESSLER, R.H.; SCHENK, M.A.M.; MADRUGA, C.R.; GOMES, A. Viability of a method for the isolation of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* to create a strain bank from five physiographical regions of Brazil. **Rev Bras Parasitol**, v.7, n.2, p.91-94, 1998.
11. KUTTLER, K.L.; ZAUGG, J.L.; JOHSON, L.W. Serologic and clinical responses of premunized, vaccinated and previously infected cattle to challenge exposure by different *Anaplasma marginale* isolates. **Am J Vet Res**, v.45, n.11, p.2223-2226, 1984.

12. LINHARES, G.F.C.; SANTANA, A.P.; LAUERMAN, H.L.; MADRUGA, C.R. Assessment of primers designed from the small ribosomal subunit RNA for specific discrimination between *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* by PCR. **Ciên An Bras**, v.3, n.2, p.27-32, 2002.
13. LOSOS, G.J. **Infectious tropical diseases of domestic animals**. New York: Longman Scientific & Technical, 1986. 138p.
14. PAULETTI, P.; NETO, R.M.; PACKER, I.U.; d'ARCE, R.D.; BESSI, R. Quality of colostral passive immunity and pattern of serum protein fluctuation in newborn calves. **Scientia Agricola**, v.60, n.3, p-453-456, 2003.
15. RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D.; GUIMARÃES, A.M. et al. Transmissão congênita de anaplasmosose bovina. **Arq Bras Med Vet Zoot**, n.47, v.3, p.297-304, 1995.
16. RISTIC, M. Anaplasmosis. In: RISTIC, M.; McINTYRE, L. **Diseases of cattle in the tropics – economic and zoonotic relevance**. The Hague: Martinus Nijhoff Publishers, v.6, 1981, p.327-344.
17. RISTIC, M.; KREIER, J.P. Family Anaplasmataceae. In: BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.E. **Bergey's manual of determinative bacteriology**, 8 ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1974, p.906-914.
18. RUIZ, P.M.G.; LIMA, J.D.; PASSOS, L.M.F. Serological profile of *Babesia bovis* in animals submitted to premunition. **Rev Bras Parasitol Vet**, São Paulo, v.81, n.1, p.45-48, 1999.
19. SANTOS, H.Q.; MADRUGA, C.R.; LINHARES, G.F.C. Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em bovinos de leite da microrregião de Goiânia, pela reação de imunofluorescência indireta e Elisa. **Rev. Bras. Ciên. Vet.**, Niterói, v. 8, n. 1, p. 31-34, 2001.
20. SCHENK, MA.M.; KESSLER, R.H.; MIGUITA, M.; HONER, M.R. Desenvolvimento de cepas atenuadas de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma centrale*: III. Teste crítico com bovinos Bangus. **Rev Bras Parasitol Vet**, v.2, n.2, p.75-78, 1993.
21. SWAI, E.S.; FRENCH, NP; BEAUCHAMP, G. FITZPATRICK, J.L.; BRYANT, M.J.; KAMBARAGE, D; OGDEN, N.H. A longitudinal study of sero-conversion to tick-borne pathogens in smallholder dairy youngstock in Tanzania. **Vet Parasitol**, v131, n.1-2, p.129-37, 2005.
22. TODOROVIC, R.A.; LONG, R.F. Comparison of indirect fluorescent antibody (IFA) with complement fixation (CF) tests for diagnosis of *Babesia* spp. Infections in Colombia cattle. **Zeit Tropenm Parasitol**, v.27, p.169-181, 1976.
23. VIDOTTO, O.; MARANA, E.R.M. Diagnóstico em anaplasmosose bovina. **Ciên An**, Santa Maria, v.31, n.2, p.361-368, 2001.

## **CAPITULO IV - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* E *Anaplasma marginale* NO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA, ESTADO DE GOIÁS, BRASIL”.**

### **RESUMO**

Os microrganismos *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* são patógenos envolvidos no complexo etiológico da "tristeza parasitária bovina", doença de grande impacto econômico na bovinocultura nacional. A diversidade molecular de populações de microrganismos autóctones, geograficamente distintas, vem sendo alvo frequente da pesquisa científica. Resultados de estudos recentes têm contribuído significativamente com informações que alimentam campos específicos da ciência como a epidemiologia molecular, a imunologia e a patologia. Objetivou com o presente estudo realizar a caracterização molecular de isolados de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* em amostras procedentes do município de Goiânia. Inicialmente foram obtidos isolados puros para cada organismo e os mesmos foram caracterizados pelos métodos moleculares: reação em cadeia da polimerase; análises de homologia das sequências de fragmentos do gene SSU rRNA de *B. bovis* e *B. bigemina* e do gene MSP1 $\beta$  de *A. marginale* e, finalmente pela técnica de *Sau96I*-RFLP/PCR para as espécies de babesia e *AluI*-RFLP/PCR para *A. marginale*. Verificou-se alto grau de homologia e perfil de restrição idênticos às respectivas amostras de referência registradas no GenBank, para cada espécie. Ainda, como parte deste estudo, foram realizadas análises moleculares, com base na técnica de *Sau96I*-RFP/PCR, em 69 isolados de campo de *B.bovis* e 144 de *B. bigemina*, e, pelo ensaio de *AluI*-RFLP/PCR, 126 isolados de campo de *A. marginale*. Os resultados evidenciaram a ocorrência de diversidade molecular intraespecífica na proporção de 1,5% entre os isolados de *B. bovis* e 1,6% entre os de *A. marginale*. Para *B. bigemina* nenhum nível divergência foi detectado pelo método empregado. Amostras dos respectivos isolados foram criopreservadas, na forma de estabilizados, para comporem banco de isolados puros destinados a novas pesquisas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Babesiidae, Rickettsiales, isolados de referência, gene 18S rRNA, gene MSP1 $\beta$ ; RFLP-PCR.

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* isolates in the municipality of Goiânia, State of Goiás, Brazil.**

**ABSTRACT**

The microorganisms *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* are pathogens involved in the etiologic complex of the cattle tick fever, which is recognized as a disease that imposes major economic burden to the Brazilian livestock. The molecular diversity of the geographically distinct microorganism populations has been a frequent objective of scientific researches. Results of recent studies have offered significant contribution on knowledge that are directly applied to specific fields of science such as molecular epidemiology, immunology and pathology. The present study was conducted with the main objective to achieve a molecular characterization of *B. bovis*, *B. bigemina* and *A. marginale* isolates of the municipality of Goiânia. Firstly it was obtained pure isolates that represented each of the organisms. Then the isolates were characterized by the following molecular techniques: PCR assays; analysis of homology of partial sequences of the SSU rRNA gene of *B. bovis* and *B. bigemina* and of the MSP1 $\beta$  gene of *A. marginale*; and, finally, by *Sau96I*-RFLP/PCR in the case of *B. bovis* and *B. bigemina* and *AluI*-RFLP/PCR for *A. marginale*. The results demonstrated, for the three organisms, high levels of homology and similar restriction profiles in comparison with the correspondent reference sequences accessed in the GenBank. Also, in this study it was applied a *Sau96I*-RFLP/PCR for a molecular analysis of 69 *B. bovis* and 144 *B. bigemina* field isolates. With the same purpose a *AluI*-RFLP/PCR assay was performed in 126 *A. marginale* field isolates. The results showed the occurrence of intraspecific molecular diversity of 1.5% among *B. bovis* and 1.6% among *A. marginale* field isolates. No divergence was detected among *B. bigemina* isolates. Pure isolates samples were cryopreserved and maintained as a bank of pure isolates of the hemoparasites that represented regional reference isolates to be used on further studies.

**KEY WORDS:** Babesiidae, Rickettsiales, reference isolates, 18S rRNA gene, MSP1 $\beta$  gene; RFLP-PCR.



## 4.1 INTRODUÇÃO

Os protozoários *Babesia bovis* Babes 1888 e *Babesia bigemina* Smith & Kilborne 1893 são parasitos intraeritrocitários obrigatórios, agentes da Babesiose dos bovinos. Nas Américas são endêmicos entre os paralelos 32°N e 32°S, área correspondente à distribuição geográfica do vetor biológico natural, o carrapato *Boophilus microplus* (KESSLER & SCHENK, 1998; GUGLIELMONE, 1995).

*Anaplasma marginale* Theiler 1910 é agente patogênico intraeritrocitário, de natureza bacteriana, responsável pela enfermidade descrita como anaplasmosse bovina (RISTIC & KREIER, 1974; KOCAN et al., 2000). Ocorre, de forma endêmica, em partes da América do Norte e na maioria dos países da América Latina, inclusive o Brasil (GUGLIELMONE, 1995). É transmitido aos hospedeiros vertebrados por espécies de carrapatos que atuam como vetores biológicos, sendo o *Dermacentor variabilis* o principal na América do Norte e o *Boophilus microplus* na América Latina (GUGLIELMONE, 1995; KOCAN, et al., 2003). A ocorrência de Anaplasmosse em regiões localizadas fora da área de distribuição geográfica do *B. microplus* sugere a participação de insetos hematófagos como vetores mecânicos (GUGLIELMONE, 1995).

O termo "epidemiologia molecular" tem sido empregado para definir "a ciência direcionada ao estudo dos fatores de riscos potenciais de origem genética e as interações com o ambiente, identificados em nível molecular intra-específico ou entre diferentes populações de organismos vivos" (MEH, 2006).

Do ponto de vista econômico, o conhecimento amplo sobre a diversidade genética de microrganismos é de grande importância nos estudos referentes ao desenvolvimento de novas vacinas. Esforços têm sido despendidos com a finalidade de monitorar, identificar antígenos e viabilizar a produção de vacinas em escala industrial, tanto para *A. marginale* (KOCAN, et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2003) como para *B. bovis* e *B. bigemina* (LEW et al., 1997; SACCO, 2001).

A diversidade genética tem sido demonstrada para as espécies do gênero *Babesia* entre isolados de diferentes regiões geográficas, sendo esta, responsável

pelo polimorfismo antigênico que caracteriza a heterogeneidade intra-específica (ALLRED, 2001).

Pesquisas comprovando a diversidade geográfica de isolados de *A. marginale* têm sido realizadas com base em diferenças biológicas (SMITH et al., 1986; GUGLIELMONE, 1995, GARCIA-HORTIZ et al., 2000), morfológicas (RIBEIRO et al, 1997), características antigênicas (ALLRED et al, 1990; OLIVEIRA et al, 2003), ou ainda, através das sequências de proteínas (FUENTE et al., 2001a) ou de ácidos nucleicos (PALMER et al., 2001; FERREIRA et al., 2001; FUENTE et al., 2004).

O desenvolvimento de técnicas moleculares como a PCR e o sequenciamento genético automatizado, possibilitou o incremento de técnicas precisas de diagnóstico e de análise filogenética de microrganismos oriundos das mais diferentes regiões geográficas. Esta metodologia possibilitou o aprofundamento e a agilidade dos estudos sobre a diversidade genética de microrganismos e os consequentes avanços do conhecimento científico no campo da epidemiologia molecular.

Com o evento das novas metodologias, que surgiram da década de 70 e que foram designadas de "tecnologia do DNA recombinante", novos impulsos foram injetados no campo da biologia molecular (SWAMINATHAN & MATAR, 1993). Atualmente, são diversas as abordagens metodológicas disponíveis ao estudo da heterogeneidade genética intra-específica de microrganismos (ALLRED, 2001; FUENTE et al., 2004).

Entre os métodos de análise de ácido nucleico, inicialmente aplicados ao estudo da tipagem molecular (DNA) de microrganismos destacam-se a técnica do sequenciamento de nucleotídeos e as técnicas baseadas no polimorfismo de restrição do DNA, como o RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), a análise de perfís de plasmídeos e as técnicas de hibridização, incluindo as diversas modalidades do emprego de sondas moleculares (*DNA probes*), entre elas, a ribotipagem (SWAMINATHAN & MATAR, 1993).

Com o descobrimento da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) por Mullis, na década de 80, surgiram diversos métodos alternativos voltados à pesquisa com tipagem molecular de microrganismos (PERSING et al, 1993). Vários

testes, com base na reação de PCR, foram originalmente desenvolvidos para esta finalidade, destacando-se, entre outros: (a) o método da amplificação arbitrária de DNA polimórfico - RAPD (*random amplification of polymorphic DNA*), que tem como princípio a obtenção de perfís de DNA genômico gerados em uma reação de PCR empregando iniciadores arbitrários, sem homologia conhecida com a sequência alvo; (b) o método do RFLP-PCR, que tem como base a demonstração de perfís gerados pela digestão enzimática de produtos de PCR, obtidos da amplificação de sequências previamente definidas (SWAMINATHAN & MATAR, 1993); (c) o método baseado em perfís de amplificação dos elementos extragênicos repetitivos palindrômicos, obtidos por PCR (REP-PCR) (STERN et al., 1984); e, finalmente, (d) o método de caracterização de perfís de amplificação de sequências repetitivas enterobacterianas intergênicas de consenso (ERIC-PCR) (HULTON et al., 1991).

A rapidez, a praticidade e a não necessidade de grande número de células dos microrganismos, durante o processo de amplificação por PCR, foram vantagens que tornaram todos os métodos baseados nesta técnica muito atrativos para as pesquisas envolvendo estudos moleculares de populações. A análise dos produtos de PCR pelo sequenciamento dos nucleotídeos é considerada a estratégia mais informativa em relação aos polimorfismos de microrganismos. Entretanto, quando se têm informações sobre a existência de polimorfismo em um determinado locus, em nível de sequência de nucleotídeos, métodos mais rápidos e simples, como RFLP-PCR, podem ser empregadas (ZAHA, 1996).

A reação de PCR específica para *B. bigemina* e *B. bovis* tem sido utilizada em diferentes protocolos, empregando-se iniciadores construídos para reconhecerem sequências alvo de diferentes genes. FIGUEROA et al. (1992) descreveu um ensaio de PCR para a detecção de um fragmento de 0,3 KB designado *SpeI-Aval*, localizado no gene pBbil6 (derivado do gene pBR322 de *B. bigemina*). Diversos protocolos e iniciadores têm sido propostos para a amplificação de diferentes fragmentos alvo do gene que codifica a subunidade menor do RNAr (*small-subunit rRNA* - SSU rRNA) de *B. bovis* (CALDER et al., 1996; LINHARES et al., 2002) e de *B. bigemina* (LINHARES et al., 2002). Outros ensaios foram desenvolvidos, ainda, para a detecção de produtos de PCR específicos para: o gene que codifica uma proteína de superfície

de 60-kDa do merozoítio de *B. bovis* (SUAREZ et al., 1991); para o gene BabR de *B. bovis* (McLAUGHLIN et al., 1992); para o gene Bv80 de *B. bovis* (BROWN et al., 1993) e, finalmente para o gene BvVA1 de *B. bovis* (DALRYMPLE et al., 1992, LEW et al., 1997).

A maioria dos ensaios de PCR para *Anaplasma* tem sido desenvolvida para a detecção específica de fragmentos de genes que codificam proteínas MSPs (*major surface proteins*) (CALDER et al., 1996; CORONA & RIVAS, 1996; PALMER et al., 1998).

A amplificação de sequências de DNA pela PCR tem dado grande impulso às pesquisas voltadas à obtenção de sequências completas do genoma de microrganismos. Estas informações, por sua vez, tem permitido grandes avanços aos estudos envolvendo as mais diversas relações filogenéticas, através de construção e análises de dendogramas (FUENTE et al., 2004).

Ensaio de RFLP-PCR, empregando diferentes enzimas de restrição, têm sido propostos para estudos filogenéticos de espécies do gênero *Babesia* e *Anaplasma*, ocorrentes em bovinos. CACCIÒ et al. (2000) reportaram um padrão de polimorfismo para diferenciar DNA de *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. major* e *B. divergens* com a digestão pela *RsaI*/RFLP-PCR do gene da  $\beta$ -tubulina. INOKUMA et al. (2001) empregaram protocolos com as enzimas *AclI* e *XhoI* para definir padrões de corte para espécies dos gêneros *Babesia* e *Anaplasma*, a partir do gene citrato-sintase (*gltA*). Ainda, para diferenciar *B. bovis*, *B. bigemina* e *B. divergens*, DEVOS & GEYSEN (2004) publicaram um protocolo com base no perfil de digestão do gene 18S rRNA por *DdeI*/RFLP-PCR.

MADRUGA et al. (2002) comprovaram a aplicabilidade das técnicas de REP-PCR e ERIC-PCR, originalmente descritas para microrganismos bacterianos, para a análise genética de protozoários. No estudo, demonstraram polimorfismos genéticos entre isolados de *B. bigemina* de 5 regiões geográficas no Brasil.

Estudos recentes, envolvendo a análise de relações filogeográficas de *A. marginale* com base nas sequências da MSP1a e MSP4, evidenciaram variabilidade em isolados, dentro e entre populações, de diferentes localizações geográficas dos

Estados Unidos (FUENTE et al., 2001b), assim como entre isolados obtidos no Brasil, Argentina e México (FUENTE et al., 2004). Estes resultados comprovam a necessidade da inclusão de antígenos de diferentes isolados geográficos nas vacinas contra *A. marginale*, independente do tipo de vetor predominante.

Considerando-se a extensão territorial do Brasil e o expressivo efetivo de bovinos, pode-se inferir a existência de acentuadas variações no perfil molecular entre diferentes isolados ou cepas regionais (MADRUGA et al., 2002), o que justifica a necessidade da obtenção e disponibilização de microrganismos de referência para estudos de epidemiologia molecular das populações autóctones.

Objetivou-se com o presente trabalho, realizar a caracterização molecular de isolados de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* do município de Goiânia, empregando as técnicas de PCR e RFLP-PCR, assim como análises de homologia das sequências de fragmentos do gene SSU RNAr de *B. bovis* e *B. bigemina* e do gene MSP1 $\beta$  de *A. marginale*, obtidos com o sequenciamento dos produtos de PCR.

## **4.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1 Obtenção de isolados puros de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale***

Os isolados puros de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* foram obtidos junto ao banco de isolados criopreservados do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Parasitárias da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. As amostras foram registradas como isolados de referência, autóctones do município de Goiânia, obtidas por DIAS FILHO et al. (2005) (*B. bovis* e *B. bigemina*), e DIAS FILHO (2006) (*A. marginale*).

### **4.2.2 Obtenção de isolados de campo de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale***

Para a obtenção de isolados de campo dos hemoparasitos *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*, foram colhidas amostras de sangue de bezerros em 35

propriedades rurais localizadas na área de influência da Bacia Leiteira de Goiânia, predominantemente, no município de Goiânia, Estado de Goiás, Brasil.

Para aumentar a probabilidade de colher amostras de animais com infecções patentes e, assim, aumentar a chance de detecção dos microrganismos pelos métodos de diagnóstico laboratoriais, foram escolhidos animais com idade entre 30 e 90 dias. Nesta faixa etária, geralmente, são observadas as ocorrências das primo-infecções nos rebanhos mantidos em áreas endêmicas (MADRUGA et al., 1984; MADRUGA et al., 1985).

Foi amostrado um total de 187 bezerros em 35 propriedades visitadas. Amostras de sangue foram colhidas com anticoagulante EDTA (Anticoagulante Universal, Dolles), na proporção de 1 gota/5 mL de sangue venoso. As amostras foram transportadas ao laboratório, sob refrigeração, para serem submetidas ao processo de extração de DNA total. Ainda, de cada bezerro, foi colhida uma gota de sangue periférico, sem anticoagulante, para a imediata preparação de esfregaço sanguíneo.

Os esfregaços foram fixados com metanol, ainda na propriedade, e transportados ao laboratório para coloração pelo método de Giemsa. Após a coloração, os esfregaços foram examinados à microscopia ótica, no aumento de 1.000x, avaliando-se as características morfológicas típicas, descritas na literatura para *B. bovis* (RIEK, 1966), *B. bigemina* (RIEK, 1964) e *A. marginale* (RISTIC & KREIER, 1974).

Para a extração de DNA total, empregou-se *kit* comercial (GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit, Amersham Biosciences). O eluato final de DNA total de cada amostra foi alíquotado em amostras de 50 µL, em tubos tipo Eppendorf de 0,25 mL e armazenado à 6 °C para serem utilizadas nas reações de PCR, necessárias à realização dos estudos moleculares.

As amostras de DNA foram submetidas aos testes de PCR, com a finalidade de conferir a identidade molecular dos isolados de campo. Foram, então, realizadas reações com os pares de iniciadores GAU9/GAU10 e GAU6/GAU7, para a amplificação espécie-específica dos fragmentos de 541 e 685 pares de base (pb) do gene SSU rRNA de *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente, segundo LINHARES et

al. (2002) e reações com o par de iniciadores específicos BAP-2/AL34S para o fragmento de 409pb do gene MSP1 $\beta$  de *A. marginale*, segundo BARBET & ALLRED (1991).

Foram considerados como "isolados de campo" as amostras com resultados positivos ao teste espécie-específico de PCR, para o respectivo microrganismo.

#### **4.2.3. Caracterização molecular dos isolados puros de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*: sequenciamento e análise de homologia**

Para a análise molecular, os produtos (*amplicons*) obtidos nas reações de PCR para os isolados puros de *B. bovis*, *B. bigemina* (fragmentos espécie-específicos do gene SSU RNAr) e para *A. marginale* (fragmento espécie-específico do gene MSP1 $\beta$ ) foram sequenciados, empregando-se o método da incorporação de ddNTP (*DYEnamic<sup>TM</sup>ET dye terminator kit MegaBACE<sup>TM</sup>*, Amersham Biosciences). Os sequenciamentos foram processados em seqüenciador automático (*MegaBACE 1000<sup>TM</sup>*, Amersham Biociences), no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB).

As análises de homologia molecular dos produtos dos sequenciamentos (*outputs*) foram realizadas empregando-se a ferramenta BLAST-N<sup>®</sup> (ALTSCHUL et al., 1990), disponível na página do *National Center for Biotechnology Information* na internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

#### **4.2.4 Caracterização molecular dos isolados de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*: RFLP-PCR**

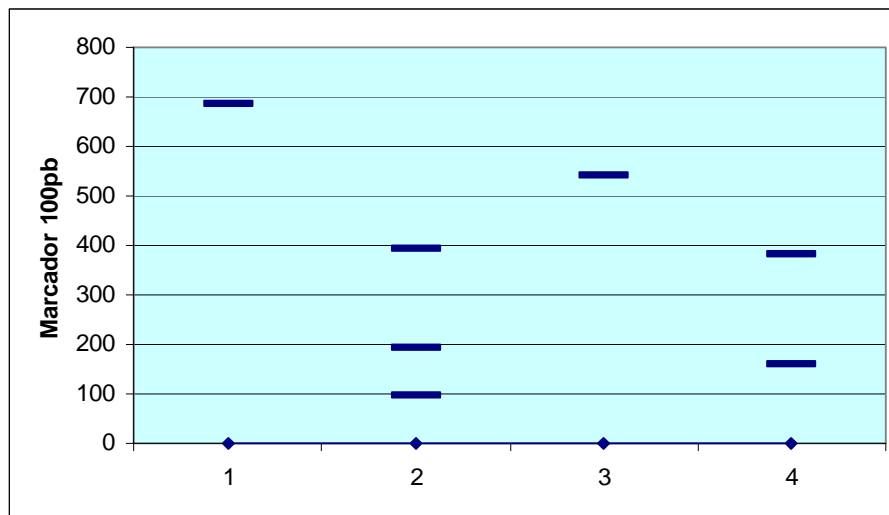
Como parte da caracterização molecular dos isolados, foram realizadas análises de restrição dos produtos de PCR, empregando-se protocolos de ensaios de RFLP-PCR, adaptados de ZÄHLER, et al. (1998). Os produtos de PCR, específicos para cada microrganismo, foram tratados com enzimas de restrição, em um volume total de reação de 50 $\mu$ L (20  $\mu$ L de produto de PCR, 0,2  $\mu$ L da enzima, 5 $\mu$ L de tampão, 24,8  $\mu$ L de água ultra-pura). Para a análise das amostras de *B. bovis* e *B.*

*bigemina* empregou-se a enzima de restrição *Sau96I* e, para *A. marginale*, a *AluI* (*New England, Biolabs*). O tempo de digestão para ambas enzimas foi de 2 horas, à 37 °C, e os tampões utilizados foram o NEBuffer 4 para as digestões com *Sau 96I* e NEBuffer 2 para *Alu I*, de acordo com manual de instrução do mesmo fabricante. De acordo com os sítios de clivagem conhecidos para as enzimas *Sau96I* (5'...G<sup>↓</sup>GNCC...3') e *AluI* (5'...AG<sup>↓</sup>CT...3') a estimativa esperada para frequência de clivagens era na ordem de 1/256.

Previamente à realização das reações de RFLP-PCR foram construídos gráficos com a simulação de resultados preditivos, com base nas informações sobre as sequências do *GenBank*. Para esta finalidade buscaram-se todas as sequências possíveis de serem flanqueadas pelos pares de iniciadores espécie-específicos, GAU9/10, GAU6/7 e BAP2/AL34S. Este procedimento foi executado por meio da ferramenta BLAST-N<sup>®</sup> (ALTSCHUL et al., 1990). De acordo com o parâmetro estabelecido, foi encontrada apenas uma sequência para o par GAU9/10 (L31922 = gene SSU rRNA de *B. bovis*), três para o par GAU6/7 (X59604, X59605 e X59607 = gene SSU rRNA de *B. bigemina*) e duas para o par BAP2/AL34S (AF221693 e M 59845 = gene MSP1 $\beta$  de *A. marginale*) (Figuras 1 e 2).

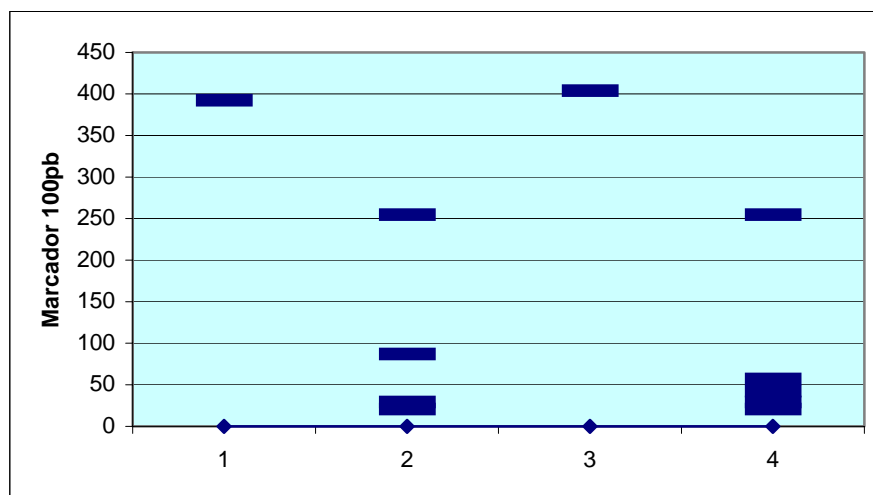
Para *B. bigemina* foi escolhida, aleatoriamente, a de número X59604, tendo em vista que as três eram semelhantes. No caso do *A. marginale*, ambas as sequências foram consideradas separadamente, pois as mesmas apresentavam divergências significativas.





**Figura 1.** Simulação do perfil preditivo de polimorfismo de restrição pela enzima *SauI96I*, para porções das sequências X59604 (*B. bigemina*) e L31922 (*B. bovis*) flanqueadas com os iniciadores GAU9/10, GAU6/7, respectivamente.

(1) Fragmento GAU6/7-PCR (685pb) do gene SSU rNAr (X59604) de *B. bigemina* e (2) respectivos produtos de digestão por *Sau96I* (393, 194 e 98pb); (3) Fragmento GAU6/7-PCR (541pb) do gene SSU rNAr (L31922) de *B. bovis* e (4) respectivos produtos de digestão por *Sau96I* (382 e 159pb).



**Figura 2.** Simulação do perfil preditivo de polimorfismo de restrição pela enzima *AluI*, para porções das sequências AF221693 e M59845 de *A. marginale*, flanqueadas com os iniciadores BAP2/AL34S.

(1) Fragmento BAP2/AL34S-PCR (392pb) do gene MSP1 $\beta$  (AF221693) de *A. marginale* e (2) respectivos produtos da digestão por *AluI* (255, 87, 29 e 21pb); (3) Fragmento BAP2/AL34S-PCR (404pb) do gene MSP1 $\beta$  (M59845) de *A. marginale* e (4) respectivos produtos de digestão por *AluI* (255, 57, 42, 29 e 21pb).

#### 4.2.5 Leitura dos Resultados de PCR e RFLP-PCR

Os produtos de PCR e dos processos de digestão enzimática foram submetidos à eletroforese em gel de agarose à 1,5%, em tampão TBE1x. Para a determinação dos tamanhos dos fragmentos, foi utilizado o marcador de massa molecular de 100 pb (*DNA Ladder 100bp, Invitrogen*).

Após as corridas, em cuba horizontal, os géis eram corados em solução de brometo de etídio à 0,4µg/mL e observados em transiluminador à luz ultravioleta, em ambiente escuro.

#### 4.2.6 Documentação Fotográfica

A documentação fotográfica referente às leituras das corridas de eletroforese foi realizada utilizando-se fotodocumentador de géis (*Vilber Lourmat*). As fotos capturadas foram armazenadas em arquivos digitais no formato JPG.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Caracterização molecular dos isolados puros de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*: PCR

Os testes de PCR aplicados foram conclusivos para a confirmação da identidade molecular dos isolados puros, tendo, como parâmetros, o resultado positivo de amplificação e o tamanho dos fragmentos espécie-específicos obtidos em cada reação. Os resultados negativos corroboraram para a mesma conclusão (Quadro 1).

Os resultados obtidos pela técnica de PCR foram efetivos para caracterização molecular dos isolados específicos, analisados neste estudo. As reações de PCR com o par de iniciadores GAU9/10, específico para o fragmento de 541pb do gene SSU rRNA de *B. bovis*, foram positivas somente para o DNA extraído do isolado puro, de referência, de *B. bovis*. Este fragmento, obtido pelo flanqueamento dos iniciadores específicos GAU9/10, foi de tamanho correspondente

à sequência do gene SSU rRNA de *B. bovis*, depositada no GenBank, sob o número L31922.

**Quadro 1.** Resultados das reações espécie-específicas de PCR em amostras de DNA extraídas de isolados puros de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*, obtidas em bezerros suscetíveis.

Isolados Puros	Resultados dos Testes Espécie-específicos de PCR		
	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>A. marginale</i>
<i>B. bovis</i>	Pos.	Neg.	Neg.
<i>B. bigemina</i>	Neg.	Pos.	Neg.
<i>A. marginale</i>	Neg.	Neg.	Pos.

Neg.= resultado de PCR negativo; Pos.= resultado de PCR positivo.

A PCR com o par GAU6/7 apresentou resultado positivo para a amplificação do fragmento específico de 685pb do gene SSU rRNA de *B. bigemina*, somente frente ao DNA do isolado puro de *B. bigemina*. O tamanho do fragmento obtido nesta reação correspondeu, portanto, ao segmento esperado pelo flanqueamento dos iniciadores GAU6/7 na sequência do gene SSU rRNA de *B. bigemina*, registrada no GenBank com o número de acesso X59604.

Para *A. marginale*, o emprego dos iniciadores BAP-2/AL34S na reação de PCR para a sequência-alvo de 408pb do gene MSP1 $\beta$ , produziu resultado positivo de amplificação, apenas para o DNA extraído do isolado de *A. marginale*. O tamanho do produto desta reação correspondeu ao resultado esperado para o flanqueamento dos *primers* BAP-2/AL34S na sequência do gene MSP1 $\beta$  de *A. marginale*, identificado no GenBank sob o número de acesso M59845.

Os *amplicons* obtidos, como descritos acima, referentes aos isolados identificados como *B. bovis* e *B. bigemina* foram correspondentes aos resultados esperados para os ensaios de PCR descritos por LINHARES et al. (2002). Da mesma forma, o produto obtido para o isolado de *A. marginale* foi o correspondente ao esperado, tendo em vista o emprego do protocolo de PCR descrito por BARBET & ALLRED (1991).

#### 4.3.2 Caracterização molecular dos isolados puros de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*: sequenciamento de produtos de PCR

Os resultados dos sequenciamentos dos produtos de PCR, referentes aos fragmentos GAU9/10-SSR rRNA do isolado de *B. bovis*, GAU6/7-SSU rRNA de *B. bigemina* e BAP-2/AL34S-MSP1 $\beta$  de *A. marginale*, estão representados na forma de *outputs* no Quadro 2.

**Quadro 2.** Seqüências de bases nitrogenadas obtidas pelo sequenciamento dos produtos de PCR referentes aos isolados puros de *B. bovis* (*output* GAU9/10-SSR rRNA de 443pb), *B. bigemina* (*output* GAU6/7-SSR rRNA de 626pb) e *A. marginale* (*Output* BAP-2/AL34S-MSP1 $\beta$  de 371pb)

**Output 1 - GAU9/10-SSR rRNA (443pb): ISOLADO *B. bovis***

5'gtc gatgacgcacgactgcgaaagcatttgccaaggacgttcattaatcaagaacgaaagttaggggatcgaagacgatcaga  
taccgtcgtagtcctaaccttaactatgccgactagggattggtggtcgtcgcctcgactccgtcagcacctgagagaaatcaaagt  
ctttgggttctggggggagtagtggtcgaagctgaaactaaaggaattgacgtgtgggcaccaccaggcgtggagcctgcggctta  
atctgactcaacacggggaacctcaccaggtccagacagcgttaaggattgacaggtgattgtcctttcttgattctctggtagtggtg  
catggccgttcttagttggtggagtgattgtctggttaattccgttaacgaacgagacctaacctgctatttagctcgtcgtctccgt3'

**Output 2 - GAU6/7-SSR rRNA (597pb): ISOLADO *B. bigemina***

5'actttgagaaaattagagtgttcaagcagacttttcttgaatactcagcatggaataatagagtaggaccttgggtctattttgttg  
tttcgagccttggtaatggtaataggaacgggtggggcattcgtatttaactgtcagaggtgaaattcttagatttgttaaagacgaacc  
actgcgaaagcatttgccaaggacgtttcattaatcaagaacgaaagttaggggatcgaagacgatcagataccgtcgtagtcctaac  
cataaactatgccgactagggattggaggtcgtctttccgactcctcagcacctgagagaaatcaaagctttgggttctgggggg  
agtagtggtcgaagctgaaactaaaggaattgacggaaggccaccaccaggcgtggagcctgcggcttaattgactcaacacgg  
ggaacctcaccaggtccagacagagtaaggattgacagattgatagctctttcttgattctttgggtggtggtgcatggccgttcttagt  
ggtggagtgatttctggttaataaagttaacggacgagacctaacctgctaa3'

**Output 3 - BAP-2/AL34S-MSP1 $\beta$  (327pb): ISOLADO *A. marginale***

5'gaggtggcagagatcacccagaaatgcagaacatgagcagcgtatactgtagcagaagcccagattgtcgaactgcctta  
ctgaagcagtaaatgacactagtaaggacgaccaagcaattgttaattggcctataaacgctacaatagaggtgtgcacagacaga  
ctaatacactgcggggcgtactgccgaggtccaagaaggcgtggaagctgcaggtgtaaaagtcgaagatgcacacaccacct  
gaagccaaggcgtggaaggcattaatcaagaggaactcagcagggcagctgaaggtcttctgctgct3'

Para cada isolado, obtidos pela execução do programa BLASTN, estão registrados na Tabela 2 (*B. bovis*), Tabela 3 (*B. bigemina*) e Tabela 4 (*A. marginale*).

A identidade molecular do isolado de *B. bovis* foi comprovada pela demonstração de homologia da sequência do fragmento GAU9/10-SSU RNAr (*output* 1 = 443pb) mais próxima às sequências correspondentes ao gene SSU RNAr de *B. bovis*, conforme os registros de referência do *GenBank*. A sequência de referência que apresentou maior escore de homologia (854 pontos) foi a do gene SSU RNAr de *B. bovis* de número L31922, com 99% de identidade, correspondente a 440 bases nitrogenadas sequenciais semelhantes, entre 443 do *output* 1. As demais sequências que apresentaram a mesma percentagem de identidade (99%) foram também referentes ao mesmo gene de *B. bovis* (números L19078 e L19077), apesar de terem expressado escores ligeiramente inferiores à primeira (848 e 841 pontos, respectivamente) (Tabela 1).

Portanto, para *B. bovis*, as variações na identidade molecular observadas ficaram entre 97% a 99%. As sequências de referência com 99% de identidade eram originárias do México (L31922) e África do Sul (L19078 e L19077), enquanto que aquelas com 98% e 97% de identidade eram procedentes da China e Portugal, respectivamente.

**Tabela 1.** Resultados das análises de homologia pela ferramenta BLAST-N®, referentes à sequência do produto de PCR (GAU9/10-SSU rRNA) do isolado puro de *B. bovis*.

Sequências <i>GenBank</i>	Espécie	Gene	Identidade %	Escore
L31922	<i>B. bovis</i>	SSU RNAr	440/443 (99%)	854
L19078	<i>B. bovis</i>	18S RNAr	437/440 (99%)	848
L19077	<i>B. bovis</i>	18S RNAr	436/440 (99%)	841
AY603398	<i>B. bovis</i>	SSU RNAr	425/430 (98%)	813
AY150059	<i>B. bovis</i>	18S RNAr	428/438 (97%)	773
AY533146	<i>B. ovis</i>	SSU RNAr	397/414 (95%)	686
AY150058	<i>B. ovis</i>	18S RNA	397/414 (95%)	686
DQ409338	<i>B. ovis</i>	18S RNA	397/414 (95%)	686
DQ409336	<i>B. ovis</i>	18S RNA	397/414 (95%)	686
DQ409335	<i>B. ovis</i>	18S RNA	397/414 (95%)	686

Para o isolado de *B. bigemina*, a identidade molecular foi confirmada pela demonstração de alto grau de homologia do fragmento GAU6/7-SSU RNAr (*output* 2 = 597pb) com sequências correspondentes ao gene SSU RNAr de *B. bigemina*

registradas no *GenBank*. O maior escore de homologia (1144) foi registrado para a sequência de referência relativa ao gene SSU RNAr de *B. bigemina* de número AY603402, com 99% de identidade, correspondente a 593 bases nitrogenadas sequenciais idênticas, entre as 597 do *output 2*. A mesma percentagem de 99% foi verificada para as sequências X59607, X59605 e X59604, porém com escores ligeiramente inferiores (1136) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resultados das análises de homologia pela ferramenta BLAST-N<sup>®</sup>, referentes à sequência do produto de PCR (GAU6/7-SSR rRNA) do isolado puro de *B. bigemina*.

Sequências <i>GenBank</i>	Espécie	Gene	Identidade %	Escore
AY603402	<i>B. bigemina</i>	SSU RNAr	593/597 (99%)	1144
X59607	<i>B. bigemina</i>	SSU RNAr	592/597 (99%)	1136
X59605	<i>B. bigemina</i>	SSU RNAr	592/597 (99%)	1136
X59604	<i>B. bigemina</i>	SSU RNAr	592/597 (99%)	1136
AY603401	<i>B. ovata</i>	SSU RNAr	590/597 (98%)	1120
AY603403	<i>Babesia</i> sp.	SSU RNAr	589/597 (98%)	1112
DQ159071	<i>Babesia</i> sp.	18S RNAr	588/597 (98%)	1104
AY603400	<i>B. ovata</i>	SSU RNAr	588/597 (98%)	1104
DQ159072	<i>Babesia</i> sp.	18S RNAr	587/597 (98%)	1096
AY081192	<i>B. ovata</i>	SSU RNAr	588/597 (98%)	1096

As sequências identificadas nesta análise apresentaram alto grau de semelhança com a do isolado de *B. bigemina* deste estudo, apesar das origens geográficas distantes. A sequência de número AY603402 era originária da China e as de números X59607, X59605 e X59604 eram do México.

A análise molecular referente à sequência do isolado de *A. marginale* proporcionou a identificação do mesmo pela demonstração de homologia do fragmento BAP2/AL34S-MSP1 $\beta$  (*output 3* = 327pb) mais próxima das sequências correspondentes ao gene MSP1 $\beta$  de *A. marginale* registradas no *GenBank*. A sequência de referência com maior escore de homologia foi a de número de acesso AF221693, com 95% de identidade, correspondente a 312 bases nitrogenadas sequenciais iguais, entre 327 do *output 3*. As outras mais próximas, quanto ao grau de homologia, também foram para o mesmo gene de *A. marginale*, apesar de

apresentarem escores de menor pontuação e identidade variando entre 93% e 95% (números de acesso: AF112480, AF110808, AY841153, AF221692, AF110809, AF348137, AF111197, AF111195, CP000030 E M59845) (Tabela 3).

Entre estas sequências a AF112480 era originária de cepa cubana, a AY841153 de Israel e as demais eram de cepas norte-americanas (da Flórida: AF110808, AF221692, AF110809 e M59845; de Idaho: AF111197, AF111195 e CP000030; de Oklahoma: AF348137).

As diferenças de homologia intra-específicas observadas nas análises moleculares entre as sequências dos isolados e as de referência do *GenBank*, foram consideradas normais, levando-se em consideração a questão da complexidade do fenômeno da diversidade molecular envolvendo populações geograficamente distantes, como registrado previamente nos artigos publicados por DALRYMPLE et al. (1992), ALLRED (2001) e MADRUGA et al (2002).

O menor grau de homologia verificado para a espécie *A. marginale* pode ser explicado em função da natureza do gene escolhido como base para a realização do estudo. O gene MSP1 $\beta$ , apesar de ser relativamente conservado, quando comparado à maioria dos genes MSPs (ARAÚJO et al., 2003), não apresenta o mesmo nível de conservação intra-específica em comparação aos genes SSU RNAr. Portanto, diferenças de homologia intra-específica mais marcantes para *A. marginale*, em contraste como os resultados alcançados nesta análise molecular para *B. bovis* e *B. bigemina*, já eram previstas.

**Tabela 3.** Resultados das análises de homologia pela ferramenta BLAST-N®, referentes à sequência do produto de PCR (BAP-2/AL34S-MSP1 $\beta$ ) do isolado puro de *A. marginale*.

Sequências <i>GenBank</i>	Espécie	Gene	Identidade %	Escore
AF221693	<i>A. marginale</i>	MSP1 $\beta$	312/327 (95%)	529
AF112480	<i>A. marginle</i>	MSP1 $\beta$	309/327 (94%)	505
AF110808	<i>A. marginale</i>	MSP1 $\beta$	308/327 (94%)	498
AY841153	<i>A. marginale</i>	MSP1 $\beta$	238/248 (95%)	412
AF221692	<i>A. marginale</i>	MSP1 $\beta$	236/250 (94%)	385
AF110809	<i>A. marginale</i>	MSP1 $\beta$	236/250 (94%)	385
AF348137	<i>A. marginale</i>	MSP1 $\beta$	233/248 (93%)	373
AF111197	<i>A. marginale</i>	MSP1 $\beta$	233/248 (93%)	373
AF111195	<i>A. marginale</i>	MSP1 $\beta$	233/248 (93%)	373
CP000030	<i>A. marginale</i>	MSP1 $\beta$	233/248 (93%)	373
M59845	<i>A. marginale</i>	MSP1 $\beta$	233/248 (93%)	373
M59845	<i>A. marginale</i>	MSP1 $\beta$	75/75 (100%)	75

#### 4.3.3 Caracterização molecular dos isolados puros de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*: RFLP-PCR

O ensaio de RFLP-PCR empregando a enzima de restrição *Sau96I* proporcionou o estabelecimento de perfis de restrição definidos para os microrganismos *B. bovis* e *B. bigemina*.

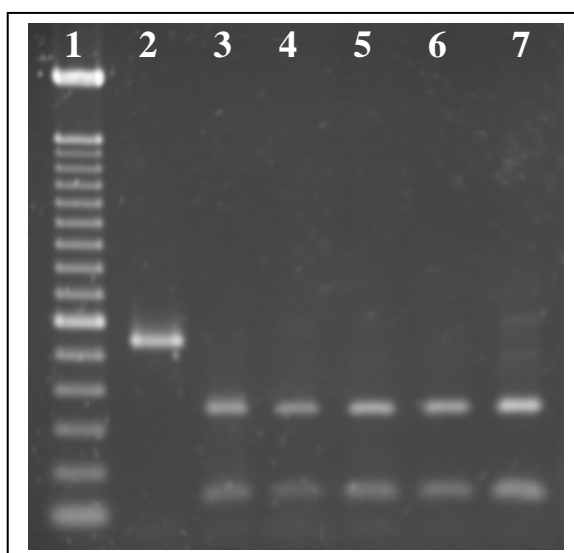
O perfil de restrição do fragmento GAU 9/10 do isolado de *B. bovis*, obtido pelo ensaio de RFLP-PCR com a enzima *Sau96I*, caracterizou-se pela evidenciação de dois fragmentos resultantes da clivagem enzimática, sendo, um com tamanho inferior a 200pb e outro ligeiramente menor que 400pb (Figura 3). Portanto, o perfil *Sau96I*/RFLP-PCR, demonstrado para o isolado de *B. bovis* foi semelhante ao perfil preditivo para a sequência L31922, utilizada como referência para a espécie *B. bovis* (Figura 4).

O resultado da análise molecular, tendo como base o perfil de restrição pela *Sau96I*/RFLP com o produto GAU9/10-PCR, demonstrou aplicabilidade do método para a caracterização de organismos da espécie *B. bovis*. A análise molecular demonstrou semelhanças entre microrganismos representantes de



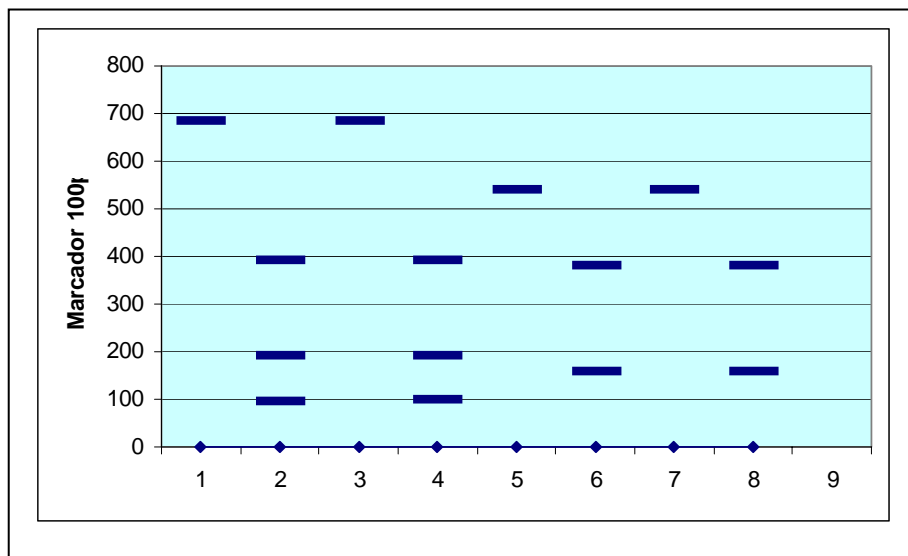
populações de origens geográficas distantes, no caso, o isolado regional e a cepa mexicana (L31922) de *B. bovis*. Análises das sequências sul-africanas (L19077 e L19078), cujas percentagens de homologia também acusaram valores de 99% pelo BLAST-N<sup>®</sup>, demonstraram o mesmo padrão de perfil preditivo da sequência L31922.

O resultado obtido na avaliação foi o esperado, tendo em vista que o produto GAU9/10-PCR, submetido à análise de restrição enzimática, representava um fragmento do gene SSU rRNA. Os genes codificadores de RNA ribossomais são reconhecidos quanto à propriedade de manter alto grau de conservação intra-específica entre populações distintas (SOGIN & SILBERMAN, 1998).



**Figura 3.** Eletroforese dos produtos de restrição pela enzima *Sau96I*, referentes ao *amplicon* GAU9/10-SSR rRNA do isolado puro de *B. bovis*.

(1) Marcador de 100 pb; (2) fragmento GAU9/10-PCR (541pb) do gene SSU rRNA do isolado puro de *B. bovis* (bez 1); (3 a 5) produtos de digestão por *Sau96I* do fragmento GAU9/10-PCR do isolado puro de *B. bovis* (bez 1) – três repetições; (6 e7) produtos de digestão por *Sau96I* do fragmento GAU9/10-PCR do isolado puro de *B. bovis* (bez 4) duas repetições.

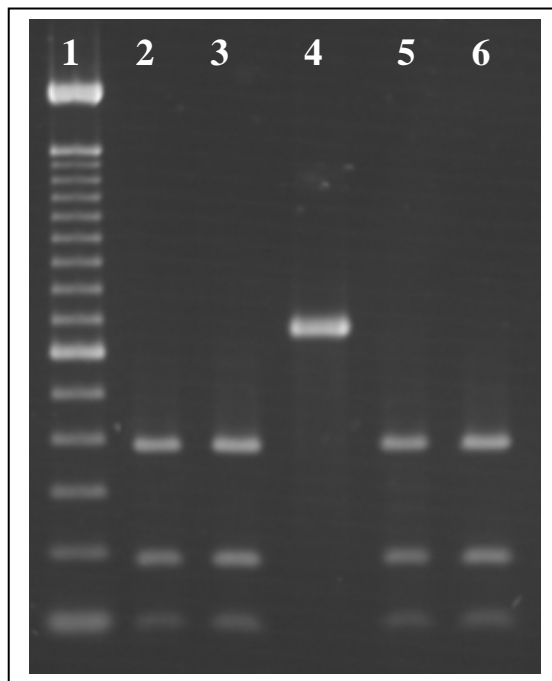


**Figura 4.** Fragmento preditivo de 685pb do gene SSU RNAr de *B. bigemina* (X59604) flanqueado por gau6/7 e perfil preditivo *Sau96I*/RFLP-PCR correspondente; 3 e 4. Amplicon gau6/7-PCR do isolado de *B. bigemina* e perfil *Sau96I*/RFLP-PCR correspondente; 5 e 6. Fragmento preditivo de 541pb do gene SSU RNAr de *B. bovis* (L31922) flanqueado por gau9/10 e perfil preditivo *Sau96I*/RFLP-PCR correspondente; 7 e 8. Amplicon gau9/10-PCR do isolado de *B. bovis* e perfil *Sau96I*/RFLP-PCR correspondente.

O perfil de restrição para o fragmento GAU6/7 do isolado de *B. bigemina*, demonstrado pela reação de RFLP-PCR com a enzima de restrição *Sau96I*, caracterizou-se pela evidenciação de três subprodutos da clivagem enzimática, com tamanhos aproximados de 100, 200 e 400pb (Figura 5). Portanto, o perfil *Sau96I*/RFLP-PCR demonstrado para o isolado de *B. bigemina* foi semelhante ao perfil preditivo para a sequência de *B. bigemina* (X59604), utilizada como referência para a espécie (Figura 4).

As considerações feitas acima, com relação a aplicabilidade do método para *B. bovis*, também são válidas para *B. bigemina*. A análise molecular pelo perfil de restrição demonstrou, da mesma forma como observado para *B. bovis*, a existência de semelhança entre microrganismos de populações geograficamente distantes, como o isolado regional e a cepa mexicana (X59604) de *B. bigemina*. Análises das sequências mexicanas (X59605 e X59607) e chinesa (AY603402), que

também apresentaram homologia de 99% pelo BLAST-N<sup>®</sup>, demonstraram o mesmo perfil preditivo desenhado para a sequência X59604.



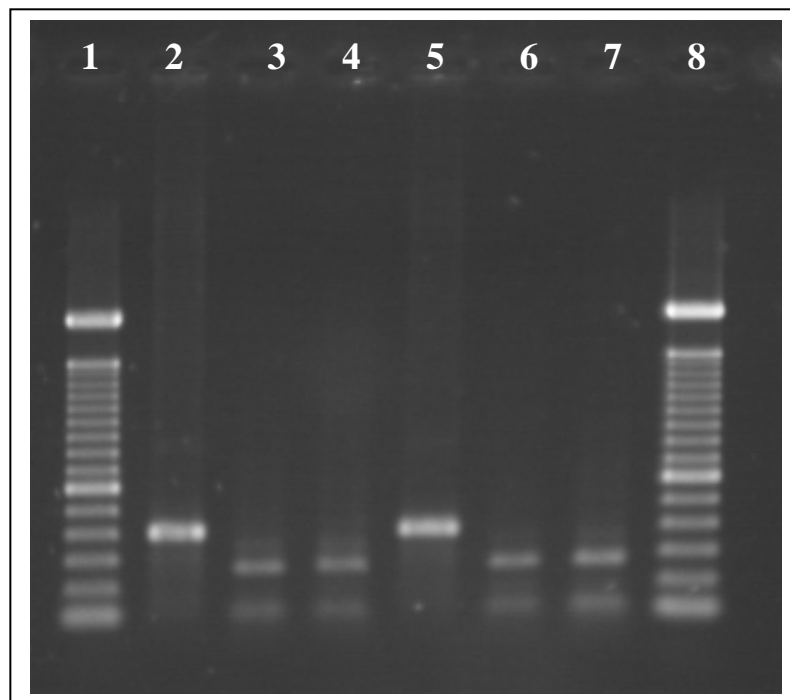
**Figura 5.** Eletroforese dos produtos de restrição pela enzima *Sau96I*, referentes ao amplicon GAU6/7-SSR rRNA do isolado puro de *B. bigemina*.

(1) Marcador de 100 pb; (2 e 3) produtos de digestão por *Sau96I* do fragmento GAU9/10-PCR do isolado puro de *B. bigemina* (bez 2) – duas repetições; (4) fragmento GAU6/7-PCR (685pb) do gene SSU RNAr do isolado puro de *B. bigemina* (bez. 2); (5 e 6) produtos de digestão por *Sau96I* do fragmento GAU9/10-PCR do isolado puro de *B. bovis* (bez 5) duas repetições.

O perfil de restrição do fragmento BAP2/AL34S, referente ao isolado de *A. marginale*, demonstrado pela técnica da RFLP-PCR com a enzima de restrição *AluI*, caracterizou-se pela evidenciação de dois fragmentos como produtos da clivagem enzimática, sendo um de tamanho aproximado de 100pb e outro de 250pb (Figura 6). O perfil obtido para o isolado de *A. marginale* mostrou semelhanças e diferenças quando comparado aos perfis preditivos para as sequências de referência AF221693 e M59845 (Figura 7). O produto de PCR do isolado regional revelou-se de tamanho semelhante ao produto preditivo para a sequência M59845 e ligeiramente maior do que o produto preditivo correspondente, para a sequência AF221693.

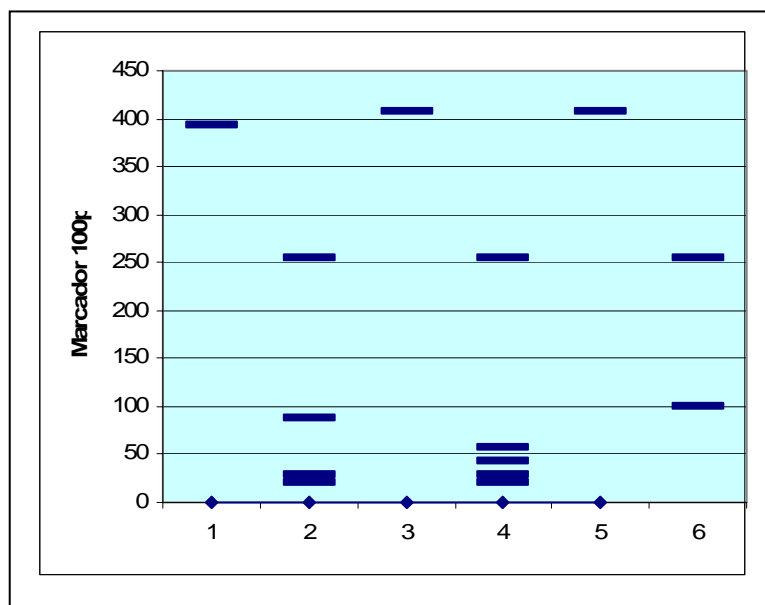
O produto maior da digestão enzimática do isolado de *A. marginale*, apresentou-se com tamanho muito semelhante aos produtos preditivos para a digestão de ambas as sequências de referência. Por sua vez, o produto menor da digestão apresentou-se ligeiramente maior que o produto correspondente preditivo para a sequência AF221693 e sem equivalente aproximado para a sequência M59845. Concluiu-se, portanto, que o perfil de restrição para o isolado de *A. marginale* era mais próximo ao perfil preditivo da sequência AF221693, apesar do tamanho do fragmento BAP2/AL34S-PCR ser mais próximo ao da outra cepa (M59845).

Os resultados, em termos comparativos entre o isolado regional e as cepas norte-americanas da Flórida (AF221693 e M59845), evidenciaram diferenças moleculares intra-específicas, demonstrada pela técnica de *AluI*/RFLP-PCR aplicada ao gene MSP1 $\beta$  de *A. marginale*. Estes resultados corroboraram com registros na literatura sobre o polimorfismo molecular do gene MSP1 $\beta$ , entre isolados geográficos de *A. marginale* (BARBET & ALRED, 1991). VISESHAKUL et al. (2000) concluíram que o gene MSP1 $\beta$  era conservado entre isolados da Flórida e de Oklahoma, nos Estados Unidos, no entanto a similaridade não ultrapassou a percentagem de 96%.



**Figura 6.** Eletroforese dos produtos de restrição pela enzima *Sau96I*, referentes ao amplicon BAP2/AL34S- MSP1 $\beta$  do isolado puro de *A. marginale*.

(1) Marcador de 100 pb; (2) fragmento BAP2/AL34S-PCR (408pb) do gene MSP1 $\beta$  do isolado puro de *A. marginale* (bez. 3); (3 e 4) produtos de digestão por *AluI* do fragmento BAP2/AL34S-PCR do isolado puro de *A. marginale* (bez 3) – duas repetições; (5) fragmento BAP2/AL34S-PCR (408pb) do gene MSP1 $\beta$  do isolado puro de *A. marginale* (bez. 6) – duas repetições; (6 e 7) produtos de digestão por *AluI* do fragmento BAP2/AL34S-PCR do isolado puro de *A. marginale* (bez 6); (8) Marcador de 100 pb.



**Figura 7.** Fragmento preditivo de 392pb do gene MSP1 $\beta$  (AF221693) de *A. marginale* flanqueado por BAP2/AL34S e perfil preditivo *Saul*/RFLP-PCR correspondente; 3 e 4. Fragmento preditivo de 408pb do gene MSP1 $\beta$  (M59845) de *A. marginale* flanqueado por BAP2/AL34S e perfil preditivo *Saul*/RFLP-PCR correspondente; 5. Amplicon BAP2/AL34S do isolado de *A. marginale* e perfil *Saul*/RFLP-PCR correspondente.

#### 4.3.4 Caracterização molecular dos isolados de campo de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*: PCR e RFLP-PCR

Os testes de triagem para a identificação de isolados de campo, realizados em 187 amostras de bezerros procedentes de 35 propriedades rurais do município de Goiânia, revelaram os seguintes resultados referentes ao exame do esfregaço sanguíneo e PCR espécie-específica, respectivamente: 6 (3,2%) e 69 (36,9%) foram positivos para *B. bovis*; 85 (46,5%) e 144 (77%) positivos para *B. bigemina*; 120 (64,2%) e 126 (64,4%) para *A. marginale*. Do total de 187 bezerros testados, 30 (16%) foram negativos para os três microrganismos, em ambos os testes, enquanto que os restantes 157 (84%) foram positivos para, pelo menos um dos agentes, em um ou outro dos testes aplicados. Das 35 propriedade amostradas, 34 (97%) tiveram pelo menos um resultado positivo, enquanto que apenas uma (2,9%) teve todos os resultados negativos.

As diferenças observadas nos resultados para os dois testes, tanto para as espécies de *Babesia* como quanto para *A. marginale*, foram influenciadas, certamente, pelo grau de especificidade, mais favorável à técnica de PCR. Conforme documentado por BÖSE et al. (1995), a técnica da microscopia direta de esfregaços sanguíneos delgados apresenta sensibilidade capaz de detectar parasitemias entre  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ , enquanto que, por PCR, é possível a detecção de parasitemias inferiores, na ordem de  $10^{-9}$ .

Todas as amostras positivas ao exame do esfregaço sanguíneo também apresentaram resultados positivos ao teste de PCR e, este, por sua vez, detectou 37,8% (n=128) a mais de amostras positivas em comparação ao primeiro (n=211). Portanto, todas as amostras com identificação morfológica pela microscopia tiveram o resultado confirmado na reação espécie-específica de PCR.

Foram classificados como isolados de campo para os respectivos microrganismos (*B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*), aqueles cujas amostras apresentaram resultado positivo para qualquer um dos testes aplicados.

Os resultados positivos dos testes de PCR, como parte da caracterização molecular dos isolados de campo, foram precisos na amplificação dos fragmentos espécie-específicos. O DNA dos isolados de campo de *B. bovis* proporcionaram a amplificação do fragmento esperado, GAU9/10-SSU RNAr, de 541pb, enquanto que, a partir do DNA dos isolados de *B. bigemina*, foi reproduzida amplificação do fragmento esperado, GAU6/7-SSU RNAr, de 685pb. Estes resultados permitiram a identificação molecular dos isolados de campo de *B. bovis* e *B. bigemina*, com base no protocolo de PCR e iniciadores espécie-específicos descritos por LINHARES et al. (2002).

A identidade molecular dos isolados de campo de *A. marginale* foi confirmada pela amplificação do fragmento esperado, BAP2/AL34S- MSP1 $\beta$ , de 408pb, a partir do DNA das amostras testadas. Estes resultados foram admitidos como espécie-específicos, com base no protocolo de PCR e iniciadores empregados nos testes, segundo BARBET & ALLRED (1991). Entre as 126 amostras identificadas como isolados regionais de *A. marginale*, pela reação de PCR, apenas uma (n<sup>o</sup> 1.6)

gerou produto de PCR com tamanho acima do esperado. O exame microscópico do esfregaço sanguíneo desta mesma amostra revelou parasitos intra-eritrocitários típicos para a espécie *A. marginale*, conforme descrição de RISTIC & KREIER (1974), com parasitemia de  $\approx 3\%$ . Variações no tamanho de fragmentos amplificados em reações espécie-específicas de PCR podem ser explicadas pela existência de variações moleculares intra-específicas no gene correspondente e que, conforme COSTA-JÚNIOR et al. (2006), são frequentes para genes menos conservados.

Os elevados índices de positividade encontrados nesta avaliação foram interpretados como normais, tendo em vista o curso da infecção natural previsto para animais desta faixa etária em regiões endêmicas de alta prevalência, conforme documentado na literatura (MADRUGA et al., 1984; MADRUGA et al., 1985; HOMER et al., 2000). Estudos epidemiológicos anteriores já haviam caracterizado a região, onde se localiza o município de Goiânia, como uma área enzoótica de estabilidade enzoótica para a babesiose e a anaplasmose bovinas (LINHARES et al., 1992; SANTOS et al., 2001a, b).

A caracterização molecular pela técnica de RFLP-PCR empregando a enzima de restrição *Sau96I* para os isolados regionais de *B. bovis* e *B. bigemina* e a enzima *AluI* para *A. marginale*, demonstrou alto grau de semelhança entre os isolados da mesma espécie. Entre os 69 isolados, identificados como *B. bovis* pela PCR, 68 (98,5%) apresentaram perfil de restrição idêntico ao verificado para o isolado puro de *B. bovis*, neste estudo. Apenas o fragmento GAU9/10-PCR da amostra nº 26.6 não sofreu clivagem enzimática, evidenciando, dessa forma, uma diferença molecular intra-específica, na proporção de 1,5% para a população estudada.

Todos os isolados (144) reconhecidos como *B. bigemina* pela reação de PCR apresentaram perfil de restrição semelhante ao do isolado puro de *B. bigemina*. Portanto, para esta espécie, nenhuma diferença molecular intra-específica foi verificada na população estudada, pelo método utilizado.

Dos 126 isolados identificados como *A. marginale* por PCR, 124 (98,4%) evidenciaram perfil de restrição idêntico ao demonstrado para o isolado puro de *A. marginale*. Apenas dois (os de nºs 1.6 e 22.4) divergiram nesse critério de avaliação



molecular. O produto BAP2/AL34S-PCR do isolado n° 22.4 não sofreu clivagem enzimática pela *A/IuI*, portanto não apresentou nenhum perfil de restrição. O mesmo produto do isolado de n° 1.6, que já havia apresentado divergência no seu tamanho, na fase de caracterização por PCR, foi clivado pela *A/IuI*, originando dois fragmentos, assim como os demais isolados, no entanto o fragmento maior evidenciou-se com tamanho superior, estimado de 300pb. Estes resultados evidenciaram diferenças moleculares intra-específicas, na proporção de 1,6% para a população de *A. marginale* estudada.

Os genes que codificam as enzimas de superfície MSPs são reconhecidos pelo seu menor grau de conservação intra-específica de suas sequências gênicas (ALLRED et al., 1990; PALMER et al., 2001), portanto era esperado a detecção de divergências moleculares para este microrganismo, uma vez que a técnica empregada foi direcionada para análises de restrição de produtos de PCR específicos para o gene MSP1 $\beta$ .

O número de propriedades (35) e de animais amostrados (187) foi maior que nos demais estudos da mesma natureza, publicados na literatura. LEW et al (1997) avaliaram a diversidade gênica de *B. bovis* na Austrália em uma amostragem de apenas 27 isolados. MADRUGA et al. (2002), estudando diversidade genética em isolados de *B. bigemina* de cinco regiões do Brasil, utilizaram cinco isolados, sendo um de cada região. FUENTE et al, (2002) desenvolveram estudos filogeográficos de *A. marginale* em 13 isolados dos Estados Unidos, 4 isolados do México, 2 da Argentina e 1 do Brasil. FUENTE et al. (2004), desenvolveram estudo de diversidade genética e filogenia molecular no Estado de Minas Gerais, Brasil, empregando somente 10 isolados de campo.

#### **4.4 CONCLUSÕES**

Identidades moleculares de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* foram confirmados pelo elevado grau de homologia apresentado frente às sequências de referência para cada espécie.

Há intensa homogeneidade no perfil de restrição enzimática entre os isolados de campo no município de Goiânia, tanto para *B. bovis* quanto para *B. bigemina*.

Existe alta semelhança no perfil de restrição enzimática para os isolados de campo de *A. marginale*, oriundos do município de Goiânia.

Há pequena proporção de divergências moleculares entre os isolados de campo de *B. bovis* e *A. marginale*, no município de Goiânia.

#### 4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLRED, D.R. Antigenic variation in babesiosis: is there more than one 'why'? **Microbes Infect**, v.3, n.6, p.481-491, 2001.
2. ALLRED, D.R.; McGUIRE, T.C.; PALMER, G.H.; LEIB, S.R.; HARKINS, T.M.; McELWAIN, T.F.; BARBET, A.F. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and consevation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. **Proc Natl Acad Sci USA**, n.87, p.3220-3224, 1990.
3. ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v.215, n.3, p.403-410, 1990.
4. ARAÚJO, F.R.; MADRUGA, C.R.; SOARES, C.O.; KESSLER, R.H. Progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. **Pesq Vet Bras**, v.23, n.4, p.139-148, 2003.
5. BARBET, A.F.; ALLRED, D.R. The msp1 beta multigene family of *Anaplasma marginale*: nucleotide sequence analysis of an expressed copy. **Infect Immun**, v.59, n.3, p.971-976, 1991.
6. BÖSE R.; JORGENSEN, W.K.; DALGLIESH, R.J.; FRIEDHOFF, K.T.; VOS,A.J., Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Vet Parasitol**, v.57, p.61-74, 1995.
7. BROWN, W.C., ZHAO, S., WOODS, V.M., Identification of two Th1 cell epitopes on the *Babesia bovis* – encoded 77 kDa merozoite protein (*Babesia* – 1) by use of truncated recombinant fusion proteins. **Infect. Immun**, v.61, p.236-244, 1993.
8. CALDER, J.A.M., REDDY, G.R., CHIEVES, L., COURTNEY, C.H., LITTEL, R., LIVENGOOD, J.R., NORVAL,R.A.I., SMITH, C., DAME,J.B., Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR based tests. **J. Clin. Microbiol**, v.34, n.11, p.2748-2755, 1996.

9. CACCIÒ, S.; CAMMA, C.; ONUMA, M.; SEVERINI, C. The  $\beta$ -tubulin gene of *Babesia* and *Theileria* parasites is an informative marker for species discrimination. **Int J Parasitol**, v.30, p.1181-1285, 2000.
10. CORONA, B., RIVAS, D. Amplification del gen msp5 de *Anaplasma marginale* usando la reaccion en cadena de la polimerasa. **Rev. Salud Anim**, v.18, n.1, p.49-51, 1996.
11. COSTA-JÚNIOR, L.M.; RABELO, E.M.L.; MARTINS-FILHO, O.A.; RIBEIRO, M.F.B. Comparison of different direct diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated parasites. **Vet Parasitol**, v.139, p.231-236, 2006.
12. DALRYMPLE, B.P., JORGENSEN, W.K., DE VOS, A.J., WRIGHT, I.G., Analysis of the composition of samples of *Babesia bovis* and the influence of different enviromental conditions on genetically distinct subpopulations. **Int. J. Parasitol**, v.22, p.731-737, 1992.
13. DEVOS, J.; GEYSEN, D. Epidemiological study of the prevalence of *Babesia divergens* in a veterinary practice in the mid-east of France. **Vet Parasitol**, v.125, p.237-249, 2004.
14. DIAS FILHO, F.C.; LINHARES, G.F.C.; DUARTE, S.C.; LINHARES, D.C.L. Obtenção de isolados puros de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* a partir de larvas e ninfas de *Boophilus microplus* em bezerros neonatos privados de colostro. **Rev. Patol. Trop.**, Goiânia, v. 34, n. 3, p. 197-204, 2005.
15. DIAS FILHO, F.C (2006). Dados não publicados.
16. 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 Microbiology Letters**, v.197, p.139-143, 2001.
17. FIGUEROA, J.V, CHIEVES, L.P., JONHSON, G.S., BUENING, G.M., Detection of *Babesia bigemina* – infected carriers by polymerase chain reaction amplification. **J. Cl. Microbiol**, v.30, n.10, p.2576-2582, 1992.
18. FUENTE, J. de la; GARCIA-GARCIA, J.C.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M. Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. **Int. J. Parasitol**, v.31, p.1705-1714, 2001a.
19. FUENTE, J. de la; PASSOS, L.M.F.; BUSSCHE, R.A. van den; RIBEIRO, M.F.B., FACURY-FILHO, R.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.

20. FUENTE, J. de la; RONALD, A. Van Den B.; GARCIA-GARCIA, J.C.; RODRIGUEZ, S.D.; GARCIA, M.A. et al. Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. **Vet Microbiol**, n.88, p.275-285, 2002.
21. FUENTE, J. de la; Van Den BUSSCHE, R.A.; KOCAN, K.M. Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichidae). **Vet. Parasitol**, v.97, n.65, p76, 2001b.
22. GARCIA-HORTIZ, M.A.; ABOYTES-TORRES, R.; HENÁNDEZ-SALGADO, G.; CANTÓ-ALARCÓN, J.G.; RODRIGUEZ, S.D. *Anaplasma marginale*: grados de virulencia en dos aislados mexicanos. **Vet Mex**, v.31, p.157-160, 2000.
23. GUGLIELMONE, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Vet Parasitol**, v.57, p.109-119, 1995.
24. HOMER, M.J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD, S.R.; KRAUSE, P.J.; PERSING, D.H. Babesiosis. **Clin Microbiol Rev**, v.13, n.3, p.451-469, 2000.
25. HULTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other bacteria. **Mol Microbiol**, v.5, p.825-834, 1991.
26. INOKUMA, H.; BROUQUI, P.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of Ehrlichia. **J Clin Microbiol**, v.39, n.9, 2001.
27. KESSLER, R. H.; SCHENK, M.A.M. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 1998, 157 p.
28. KOCAN, K.M.; BLOUIN, E.F.; BARBET, A.F. Anaplasmosis control: past, present and future. **Ann. NY Acad Sci**, v.916, p.501-509, 2000.
29. KOCAN, K.M.; De La FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A.A.; MELENDÉZ, R.D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clin. Microbiol Rev**, v.16, p.698-712, 2003.
30. LEW, A.E., DALRYMPLE, B.P., JESTON, P.J., BOCK, R.E., PCR methods for the discrimination of *Babesia bovis* isolates. **Vet. Parasitol.**, v.71, p.223-237, 1997.
31. LINHARES, G.F.C.; MASSARD, C.L.; ARAÚJO, J.L.B.; ALVES, L. Levantamento sorológico para *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1983) e *Babesia bovis*

- (Babès, 1888) em bovinos na região Centro-Oeste do Brasil. **Arq Univ Fed Rur RJ**, v.15, n.1, p.85-91, 1992.
32. LINHARES, G.F.C.; SANTANA, A.P.; LAUERMAN, H.L.; MADRUGA, C.R. Assessment of primers designed from the small ribosomal subunit RNA for specific discrimination between *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* by PCR. **Ciêns An Bras**, v.3, n.2, p.27-32, 2002.
33. MADRUGA, C.R.; AYCARDI, E.; KESSLER, R.H.; SCHENK, M.A.M.; FIGUEIREDO, G.R.; CURVO, J.B.E. Níveis de anticorpos anti-*Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, em bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelores. **Pesq Agropec Bras**, v.19, p.1163-1168, 1984.
34. MADRUGA, C.R.; KESSLER, R.H.; GOMES, A.; SCHENK, M.A.M. ANDRADE, D.F. Níveis de anticorpos e parasitemia de *Anaplasma marginale* em área enzoótica, nos bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. **Pesq Agropec Bras**, v.20, p.135-142, 1985.
35. MADRUGA, C.R.; LEAL, C.R.B.; FERREIRA, A.M.T. et al. Genetic and antigenic analysis of *Babesia bigemina* isolates from five geographical regions of Brazil. **Pesq Vet Bras**, v.22, n.4, p.153-160, 2002.
36. McLAUGHLIN, G. L., MONTENEGRO-JAMES, S., VODKIN, M. H. et al. Molecular approaches to malaria and babesiosis diagnosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 87, Suppl. III, p.57-68, 1992.
37. MEH – Molecular Epidemiology Homepage. What's molecular epidemiology? [online], 2006. Disponível em <http://www.pitt.edu/~kkr/task.html>. Acesso em: 10 mar. 2006.
38. 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, p.395-400, 2003.
39. PALMER, G. H., ABBOTT, J. R., FRENCH, D. M., MCELWAIN, T. F. Persistence of *Anaplasma ovis* infection and conservation of the msp-2 and msp-3 multigene families within the genus *Anaplasma*. **Inf. Immun.** v.66, n.12, p.6035-6039, 1998.
40. PALMER, G.H.; RURANGIRWA, F.R.; MCELWAIN, T.F. Strain composition of the ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a mammalian reservoir for tick transmission. **J Clin Microbiol**, v.39, p.631-635, 2001.
41. PERSING, D.H., SMITH, T.F., TENOVER, F.C., WHITE, T.J. **Diagnostic molecular microbiology – principles and applications**. Washington: Library of Congress-in-Publication Data, 1993. 641p.

42. RIBEIRO, M.F.B.; PASSOS, L.M.F.; GUIMARÃES, A.M. Ultrastructure of *Anaplasma marginale* with an inclusion appendage, isolated in Minas Gerais State, Brazil. **Vet Parasitol**, n.70, p.271-277, 1997.
43. RIEK, R.F. The life cycle of *Babesia argentina* Lignière, 1903 (Sporozoa: Piroplasmidea) in the vector *Boophilus microplus*. **Aust J Agric Res** v.17, n.2, p.247-254, 1966.
44. RIEK, R.F. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). **Aust J Agric Res**, v.15, n.5, p.802-821, 1964.
45. RISTIC, M.; KREIER, J.P. Family Anaplasmataceae. In: BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.E. **Bergey's manual of determinative bacteriology**, 8 ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1974, p.906-914.
46. SACCO, A.M.S; KESSLER, R.H; MADRUGA, C.R. Cepas atenuadas de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* E DE *Anaplasma centrale* como imunógenos no controle da tristeza parasitária bovina. **Ciêñ Rur**, v.31, n.5, p.849-855, 2001.
47. SANTOS, H.Q.; LINHARES, G.F.C.; MADRUGA, C.R. Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em bovinos de leite da microrregião de Goiânia determinada pelos testes de imunofluorescência indireta e Elisa. **Ciêñ An Bras**, v.2, n.2, p.133-137, 2001a.
48. SANTOS, H.Q.; MADRUGA, C.R.; LINHARES, G.F.C. Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em bovinos de leite da microrregião de Goiânia, pela reação de imunofluorescência indireta e Elisa. **Rev. Bras. Ciêñ. Vet.**, Niterói, v. 8, n. 1, p. 31-34, 2001b.
49. SMITH, R.D.; LEVY, M.G.; KUHLENSCHMIDT, M.S.; ADAMS, J.H.; RZECHULA, D.L.; HARDT, T.A.; KOCAN, K.M. Isolation of *Anaplasma marginale* not transmitted by ticks. **Am J Vet Res**, v.47, p.127-129, 1986.
50. SOGIN, M.L.; SILBERMAN, J.D. Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. **Int J Parasitol**, n28, p.11-20, 1998.
51. STERN, M.J.; AMES, G.F.L.; SMITH, N.H.; ROBINSON, E.C.; HIGGINS, C.F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, v.37, p.1015-1026, 1984.
52. SUAREZ, C.E., PALMER, C.H., JASMER, D.P., Characterization of the gene encoding a 60-kilodalton *Babesia bovis* merozoite protein with conserved and surface exposed epitopes. **Mol Biochem. Parasitol.**, 46, p.45-52, 1991.

53. SWAMINATHAN, B.; MATAR, G.M. Molecular typing methods. In: PERSING, D.H., SMITH, T.F., TENOVER, F.C., WHITE, T.J. **Diagnostic molecular microbiology – principles and applications**. Washington: Library of Congress-in-Publication Data, p.26-50, 1993.
54. VISESHAKUL, N.; KAMPER, S., BOWIE, M.V.; BARBET, A.F. Sequence and expression analysis of a surface antigen gene family of the rickettsia *Anaplasma marginale*. **Gene**, 253:45-53, 2000.
55. ZAHA, A. **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996, 336p.
56. ZAHLER, M., SCHEIN, E., RINDER, H., GOTHE, R. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. **Parasitol Res**, v. 84, p.544–548, 1998.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os isolados puros de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*, obtidos no presente trabalho permitirão doravante o aprofundamento dos estudos relativos ao perfil molecular de cepas autóctones desses hemoparasitos e a sua homologia em relação a isolados de outras regiões, o que se reveste de fundamental importância quando se considera a extensão territorial e a dimensão do rebanho bovino brasileiros.

A utilização de bezerros neonatos totalmente privados de colostro como animais susceptíveis para obtenção de isolados puros de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* constituiu uma alternativa diante das dificuldades de se obter animais de áreas livres, conforme destacado por outros pesquisadores. Tal emprego foi também motivado pelo alto custo que representaria o transporte desses animais para o local de realização do experimento. Acrescenta-se que o uso de cultura em meio a base de eritrócitos de bovinos seria igualmente oneroso.

Além de economicamente mais viável, o uso de bezerros neonatos totalmente privados de colostro a partir do dia do nascimento permite a obtenção de isolados em menor tempo, uma vez que o método convencional, embora consagrado e com bons resultados, carece de um período de quatro meses para que os bezerros obtidos de mães imunes percam a imunidade colostrálica. Portanto, a alternativa usada mostrou-se mais acessível, permitindo, em menor intervalo de tempo, a condução e conclusão do estudo, considerando-se as condições existentes.

Os animais usados no experimento não foram submetidos a quaisquer procedimentos cirúrgicos e todos eles reintegrados ao sistema produtivo após a obtenção dos respectivos isolados.

Deve-se ressaltar, contudo, que bezerros nessa situação constituem-se em animais altamente susceptíveis a eventuais infecções intercorrentes por patógenos ambientais e que a condução de uma pesquisa nessas condições requer atenção redobrada em relação à biossegurança e ao bem estar animal, incluindo desde a qualidade da água e alimentos, à higiene de instalações e uso de produtos de



natureza tóxica para o controle de possíveis parasito, sob risco de ocorrerem grandes perdas.

Outro cuidado que deve ser rigorosamente observado refere-se ao local de nascimento dos bezerros, visando a evitar a infestação por carrapatos logo no momento do parto, o que acarretaria o comprometimento da unidade experimental.

Mais um importante aspecto a ser considerado é a capacitação de todos os integrantes da equipe de trabalho, que devem ser orientados quanto ao uso de vestimentas e calçados adequados e à utilização de medicamentos, que devem seguir a rigorosa orientação do responsável, a fim de evitar comprometimento na obtenção dos resultados.

Quanto à utilização de larvas e ninfas de *Boophilus microplus* para obtenção de *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente, como proposto por originalmente, os resultados obtidos neste estudo demonstraram sua viabilidade.

O uso de inóculo constituído por sangue colhido de animal criado em área endêmica para a tristeza parasitária, tratado como imidocarb, demonstrou igualmente ser uma técnica adequada, que resultou em infecção por *A. marginale*, livre de *Babesia* spp.

Corroborando tais resultados, destaca-se que os isolados obtidos e mantidos sob criopreservação, tiveram sua pureza e viabilidade demonstradas pela sua inoculação em susceptíveis.

Os bezerros infestados por ninfas e larvas e aquele inoculado com sangue proveniente de animal de área endêmica não só apresentaram sinais clínicos das doenças como também soroconversão para os respectivos agentes, o que também foi verificado para os bezerros subinoculados.

Quanto à obtenção dos isolados de campo, a faixa etária escolhida (um a três meses de idade) correspondeu às expectativas, uma vez que foram identificados nas amostras os agentes, através de esfregaço sanguíneo e PCR espécie-específico. Tal condição reforçou os demais critérios utilizados.

Como registrado, os resultados da análise de homologia para *B. bovis* revelaram identidade molecular entre 97 a 99%, conforme os registros de referência do GEN BANK. Para *B. bigemina*, as análises de homologia apresentaram resultados

que variaram entre 98 a 99% em relação às amostras disponibilizadas no mesmo. Os isolados de *A. marginale* mostraram escores de menor pontuação em relação à homologia, mas variando entre 93 e 95%. Portanto, os isolados puros obtidos tiveram suas identidades moleculares confirmadas pelo alto grau de homologia com as seqüências de referência.

Considerando-se todos esses aspectos abordados, finaliza-se destacando a importância de pesquisas nesta vertente, em relação à sua aplicabilidade prática, com a disponibilização de isolados puros, possibilitando a realização de estudos relativos à epidemiologia molecular e imunodiagnóstico, incluindo a produção de imunógenos.

Paralelamente, amplia-se a oportunidade de intercâmbio com outros grupos que têm se dedicado a esta linha, não somente no Brasil como em outros países, o que contribuirá para a abertura de novas perspectivas, gerando avanços consistentes na área.

## **ANEXOS**

Resultados dos exames dos esfregaços sanguíneos e das reações espécie-específicas de PCR, realizados com amostras de isolados de campo de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*, procedentes do município de Goiânia.

Amostra	Esfregaços Sanguíneos			Testes Espécie-específicos de PCR		
	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>A. marginale</i>	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>A. marginale</i>
1.1	-	-	+	-	+	+
1.2	-	+	+	+	+	+
1.3	-	-	+	-	-	+
1.4	-	-	+	+	+	+
1.5	-	-	-	-	-	-
1.6	-	-	+	-	+	+ >409pb
1.7	-	+	+	-	+	+
1.8	-	-	+	-	+	+
1.9	-	-	+	-	-	+
2.1	-	-	-	-	-	-
2.2	+	+	+	+	+	+
3.1	-	+	-	-	+	+
3.2	-	-	-	-	-	-
3.3	-	+	-	-	+	-
3.4	-	-	-	-	-	-
3.5	-	+	-	-	+	-
3.6	-	-	-	-	-	-
3.7	-	+	-	-	+	-
4.1	-	-	+	+	+	+
4.2	-	-	+	+	+	+
5.1	-	-	-	-	-	-
5.2	-	-	-	-	-	-
6.1	-	+	-	-	+	-
6.2	-	-	-	-	-	-
6.3	-	+	-	+	+	-

Continua

Continuação

Amostra	Esfregaços Sanguíneos			Testes Espécie-específicos de PCR		
	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>A. marginale</i>	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>A. marginale</i>
6.4	-	-	-	-	-	-
6.5	-	-	-	-	-	-
6.6	-	-	+	-	+	+
6.7	-	-	+	-	-	+
7.1	-	+	-	-	+	-
7.2	+	+	-	+	+	-
7.3	-	-	-	-	-	-
7.4	-	+	+	+	+	+
7.5	-	-	+	-	+	+
7.6	-	-	-	-	-	-
7.7	-	+	-	+	+	-
7.8	-	-	-	-	-	-
8.1	-	-	-	-	-	-
8.2	-	-	-	-	-	-
8.3	-	+	+	-	+	+
8.4	-	+	+	+	+	+
8.5	-	-	-	-	-	-
8.6	-	+	+	+	+	+
8.7	-	+	+	+	+	+
9.1	-	-	-	-	-	-
9.2	-	-	-	-	-	-
9.3	-	-	+	-	+	+
9.4	-	-	+	-	-	+
9.5	-	-	+	-	+	+
9.6	-	-	-	-	-	-
9.7	-	+	-	-	+	+
9.8	-	+	+	-	+	+

Continua

Continuação

Amostra	Esfregaços Sanguíneos			Testes Espécie-específicos de PCR		
	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>A. marginale</i>	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>A. marginale</i>
10.1	-	-	-	-	-	-
10.2	-	-	+	-	+	+
10.3	-	+	-	-	+	-
10.4	-	-	+	-	+	+
10.5	-	-	-	-	-	-
11.1	-	-	+	+	+	+
11.2	-	-	+	+	+	+
11.3	-	+	+	-	+	+
11.4	-	-	-	-	-	-
11.5	-	+	+	+	+	+
11.6	-	-	+	+	+	+
11.7	-	-	+	+	-	+
12.1	-	-	+	-	+	+
12.2	-	-	-	-	-	-
12.3	-	-	-	-	-	-
12.4	-	-	-	-	-	-
13.1	-	-	+	+	+	+
13.2	-	-	+	-	+	+
13.3	-	+	+	-	+	+
13.4	-	+	+	+	+	+
13.5	-	-	+	-	+	+
13.6	-	+	+	+	+	+
13.7	-	-	+	-	-	+
13.8	-	-	+	+	-	+
13.9	+	+	+	+	+	+
13.10	-	-	-	-	-	-
13.11	-	-	+	-	+	+

Continua

Continuação

Amostra	Esfregaços Sanguíneos			Testes Espécie-específicos de PCR		
	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>A. marginale</i>	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>A. marginale</i>
14.1	-	-	-	-	-	-
14.2	+	+	-	+	+	-
14.3	-	-	-	-	+	+
14.4	-	-	-	+	+	-
14.5	-	-	+	-	-	+
14.6	-	-	-	-	+	+
14.7	-	-	-	-	+	+
14.8	-	-	-	-	+	+
14.9	-	-	-	-	+	+
14.10	-	-	-	-	+	+
15.1	-	+	+	-	+	+
15.2	-	+	+	-	+	+
15.3	-	+	+	-	+	+
16.1	-	+	+	-	+	+
16.2	-	+	-	-	+	+
16.3	-	-	+	-	+	+
16.4	-	+	+	-	+	+
17.1	-	+	+	+	+	+
17.2	-	-	-	-	-	-
18.1	-	+	-	-	+	-
18.2	-	+	-	-	+	-
18.3	-	+	-	-	+	+
18.4	-	+	+	-	+	+
19.1	-	+	+	+	+	+
19.2	-	+	-	+	+	+
19.3	-	+	+	+	+	+
19.4	-	-	+	-	-	+

Continua

Continuação

Amostra	Esfregaços Sanguíneos			Testes Espécie-específicos de PCR		
	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>A. marginale</i>	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>A. marginale</i>
20.1	-	+	+	-	+	+
20.2	-	+	-	-	+	-
20.3	-	+	+	-	+	+
20.4	-	+	+	+	+	+
20.5	-	-	-	-	+	-
20.6	-	+	+	-	+	+
20.7	-	+	-	+	+	-
21.1	-	-	+	+	+	+
21.2	-	+	-	-	+	-
21.3	-	+	+	+	+	+
21.4	-	+	+	+	+	+
21.5	-	+	-	-	+	-
22.1	-	+	+	+	+	+
22.2	-	+	+	-	+	+
22.3	-	+	+	-	+	+
22.4	-	-	+	-	+	+
22.5	-	+	+	+	+	+
22.6	+	-	-	+	-	-
22.7	-	-	-	+	+	+
22.8	-	-	+	-	+	+
22.9	-	+	+	+	+	+
22.10	-	+	-	-	+	-
22.11	-	+	+	+	+	+
23.1	-	+	+	+	+	+
23.2	-	-	+	+	+	+
23.3	-	-	+	+	+	+
23.4	-	-	+	+	+	+

Continua



Continuação

Amostra	Esfregaços Sanguíneos			Testes Espécie-específicos de PCR		
	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>A. marginale</i>	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>A. marginale</i>
23.5	-	-	+	-	+	+
23.6	-	-	+	+	+	+
24.1	-	-	+	-	-	+
24.2	-	+	+	+	+	+
24.3	-	-	+	+	+	+
24.4	-	+	-	+	+	-
24.5	-	-	+	+	+	+
25.1	-	+	+	+	+	+
25.2	-	+	+	+	+	+
25.3	-	+	+	+	+	+
25.4	-	+	+	-	+	+
25.5	-	+	+	+	+	+
26.1	-	+	-	+	+	-
26.2	-	-	+	-	+	+
26.3	-	+	-	-	+	-
26.4	-	-	-	-	+	-
26.5	-	-	+	+	+	+
26.6	-	-	+	+	+	+
27.1	-	-	+	+	+	+
27.2	-	-	-	-	+	-
27.3	-	-	+	-	+	+
27.4	-	-	+	-	+	+
27.5	-	-	+	+	-	+
27.6	-	+	+	+	+	+
28.1	-	-	-	-	+	+
28.2	-	-	+	-	+	+
28.3	-	-	-	+	+	+

Continua

Continuação

Amostra	Esfregaços Sanguíneos			Testes Espécie-específicos de PCR		
	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>A. marginale</i>	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>A. marginale</i>
28.4	-	-	+	-	+	+
28.5	-	+	+	-	+	+
28.6	-	-	-	+	+	-
29.1	-	-	+	+	+	+
29.2	-	-	+	+	+	+
30.1	+	+	+	+	+	+
30.2	-	+	+	-	+	+
30.3	-	+	-	-	+	-
30.4	-	+	+	-	+	+
31.1	-	+	+	+	+	+
31.2	-	+	+	-	+	+
31.3	-	-	+	-	+	+
31.4	-	+	+	+	+	+
32.1	-	+	+	-	+	+
32.2	-	+	+	-	+	+
32.3	-	-	-	+	+	-
32.4	-	-	+	+	+	+
33.1	-	+	-	-	+	-
33.2	-	-	+	-	+	+
33.3	-	+	-	+	+	-
33.4	-	+	+	-	+	+
33.5	-	+	+	-	+	+
34.1	-	-	-	-	-	-
34.2	-	-	-	-	-	-
34.3	-	-	+	-	-	+
34.4	-	+	+	+	+	+
35.1	-	+	-	-	+	-
<b>Total</b> =187	<b>6</b>	<b>85</b>	<b>120</b>	<b>69</b>	<b>144</b>	<b>126</b>

T = total; **Amostras**: números à esquerda do ponto correspondem à identificação da propriedade; números à direita do ponto identificam os animais das respectivas propriedade.

## Caracterização molecular dos isolados puros de *B. bovis*: sítios de restrição da enzima *Sau96I*

DEFINITION *Babesia bovis* small subunit ribosomal RNA sequence.

ACCESSION L31922 (GenBank)

tagtcatatgcttgtcttaaagactaagccatgcatgtctaagtagaccagcttggttacggtagactgcgaatggctcattacaacagttatag  
 tttcttggagttcactttgctatggataaccgcgctaattgtgtggctaatacacggttgagggtattaccgcgttactggtcttgattaca  
 gtaacctgcgactcgtttttgcgatattccattcaagttctgacctcagcttgacggtagggattggcctcccaggcatcgacggg  
 taacggggaattaggggttcgattccggagagggagcctgcgagacggctaccacatctaaggaaggcagcaggcgcgcaaattacc  
 caatcctgacacagggaggtatgacaagaataccaatacggggctactgctctgtaattggcatgggggcgaccttcaccctgcc  
 cgagtaccattggagggcaagtctggtgccagcagccgcggtaatccagctccaatagecgtatattaaacttggtgcagttaaaagc  
 tctagttgtacttcacgtccccgctt**g↓gtcc**tttctcgcggggacgcctcgttactttgagaaaattagagtgttcaagcaggttcg  
 cctgtataattgagcatggaataaccttgatgacc**ctgtcgtaccgttggttgac**ttgggtaatggttaataggaacgggtgggggcatt  
 cgtactcgactgtcagaggtgaaattcttagatttgctgatgacgcacgactgcgaaagcattgccaaggacgcttcattaatcaagaa  
 cgaaagttaggggatcgaagacgatcagataaccgtcgtagtcctaaccttaactatgccgactagggttggtggtcgcctcgact  
 ccgtcagcacctgagagaaatcaaagtcttgggtctggggggagtaggtcgaagctgaaactaaaggaattgacggaagggc  
 accaccaggcgtggagcctgcggcttaattgactcaacacggggaaacctcaccag**g↓gtcc**agacagcgtaggattgacaggttgat  
 tgcctttcttgattctctgggtagtggtgcatgcccgttcttagttggtggagtgatttgcctggttaattccggttaacgaacgagacctaac  
 ctgctatttagtcgc**tcgggtctccgtccgtgcg**cacttcatagagggactctgcggcgtcaagctcggtgagggttaaggcaataacag  
 gctctgatgcccttagatgtcctgggctgcacgcgcgctacactgatgcttgcctcgtgtttaccctcggccgataggcctggtaaccc  
 tagtctgcatcgtgttgggattgatctttgcaattctagatcatgaacgaggaatgcctagtagtcgcaagtcacagcttggtcagattac  
 gtccctgccctttgtacacaccgccctcgtcctaccgatcagtgatccgggtgaattattcggaaacctgcttgcgcatccgtcgcgcg  
 tcgcgccaggtttgtgaaccttatcacttaaaggaaggagaagtcgtaacaaggttcc  
 1 . 608pb

**g↓gtcc** = sítio de restrição da enzima *Sau96I*

**ctgtcgtaccgttggttgac** = posição para anelamento do iniciador *Gau9*

**tcgggtctccgtccgtgcg** = posição para anelamento do iniciador *Gau10*

PCR gau 9/10: fragmento de 541pb

RFLP-SAU 96I: 2 fragmentos (382 +159 = 541pb)

## Caracterização molecular dos isolados puros de *B. bigemina*: sitios de restrição da enzima *Sau96I*

DEFINITION *B.bigemina* gene A small subunit rRNA.

ACCESSION X59604 (GenBank)

atggtgcgagggcgtgtgcgtttggcgtgaagctgttgcgtgcggttggcgtcgatggcctctgcgtgtcgttccgcgtctgcg  
 gtgttacgtgcgactagcgggagcgcgagagtgctcgaacgcggcgcgtcgggtttgctttgcgactcctggcggcgcgccg  
 ttgacggcgcgatgtcgtttgtgcgtcgtgtcgttgatgaatagcaacctgggtgatcctgccagtagcatatgctttaaagatta  
 agccatgcatgtctaagtacaagcttttacgggtgaaactgcgaatggcctattacaacagttatagttctttggagttcgtttccatggata  
 accgtgctaattgtagggctaatacaagttcagagcctttggcggcgtttattagttcgttaaccacttttctgggtattcataataaactgc  
 gaatcgttttgcgatgttccattcaagtttctccccatcagcttgacggtagggtattggcctaccgaggcagcaacgggtaacgggg  
 aattaggggtcgattccggagaggagcctgagaaacggctaccacatctaaggaaggcagcaggcgcgcaaattaccaatcctga  
 cacagggaggtagtgacaagaataacaatacagggccttctcttgaattggaatgatggatgtacaacctcaccagagtaccaatt  
 ggagggcaagtctgggtccagcagccgcggttaattccagctccaatagcgtatataaactgttgcagttaaaagctcgtagttgatt  
 cagcctcgcggttttccctttt~~gttgggtctttcgtggc~~tttttttactttgagaaaattagagtgttcaagcagacttttcttgaatact  
 tcagcatggaataatagagta~~g↓gacc~~ttggtctatlttgggtttgagccttggtaataggaacgggtgggggcatcgtatt  
 aactgtcagagggtgaaattcttagatttgttaaagacgaaccactgcgaaagcattgccaaaggacgtttcattaatcaagaacgaaagt  
 aggggatcgaagacgatcagataccgtcgtagtctaaccataaactatgccgactagggtggaggtcgtcatttccgactcctca  
 gcaccttgagagaaatcaaaagctttgggtctggggggagtaggtcgaagtctgaaacttaaggaattgacggaaggccaccacc  
 aggcgtggagcctgcggcctaattgactcaaacacggggaacctcaccag~~g↓gtcc~~agacagagtaaggattgacagattgatagctctt  
 tcttgattctttgggtgggtgcatggcgttcttagttgggtgagtgattgtctggtaattccgttaacgaacgagaccttaacctgctaa  
 ctgactgcttgatgttctcctgcttcttagaggac~~tcctgtgcttcaagcgtgg~~gggaagttaaggcaataacaggtctgtgat  
 gcccttagatgtcctgggctgcacgcgcgtacactgatgcatccatcagtttgcctgtcccgaagggtgggtaacttttagtgcga  
 tcgtgtcggggattgattttgcaattctaatcatgaacgaggaatgcctagatgcgcaagtcacagcttgcagattacgtccctgcc  
 cttgtacacaccgccgctcctaccgatcagtgatccgggtgaattatc~~g↓gacc~~gtggctttccgattcgtcggtttgcctagg  
 gaagttttgtgaaccttatacttaaggaaggagaagtcgtaacaaggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattcacattttattt  
 gccgtttcggcgtgcgctcggcagtggtcgggactcgtccggcgcgttttctaaaatcggtccctctgggcttccactgcgtcttgc  
 gccagcaacgcgccttgcgtttgctcgggctgcccggcgtttcgtggggcgttgcctcctcccaccgccgctcgcgttgcgtcgt  
 gtcattgtgatgcgtcctcgcgagcggg  
 //2.141pb

~~g↓gacc~~ sítio de restrição da enzima *Sau96I*

~~gttgggtctttcgtggc~~ = posição para anelamento do iniciador *Gau7*

~~tcctgtgcttcaagcgtgg~~ = posição para anelamento do iniciador *Gau6*

PCR gau 6/7: fragmento de 685pb

RFLP-SAU 96I: 3 fragmentos (98 +194 + 393 = 685pb)

## Caracterização molecular dos isolados puros de *A. marginale*: sitios de restrição da enzima *AluI*

DEFINITION *Anaplasma marginale* msp1b3pg pseudogene, partial sequence.

ACCESSION AF221693

ORIGIN

actgagagtaaatgactgcactcggggcacacttacctccgcgtcgtgccaggaccagcctatggcagcgtatgccgagtatacatcgt  
ctgactccacacaatcggacacggattcatcccacagcccaattctcgttaattgacgaggttaaccccgccatcactcagggacacacc  
aaaattgcataggggaagattgaagtaccagcgggtgaggagcaagaatttggcaaggcagcattaggttaatctcggcggttgcgc  
ccgtggtaaactcaag**ag↓ct**cagatgcaccaaggaccttgaccagagcattgacgcactaccgttcatggatgaagcacctgacac  
tggtgagaagattgaagtaccagcgggtgaggagcaagaatttggcaaggcag**ag↓ct**gggtctagcaggctcaagcgtacag  
tggatgaaagcctggagatgtagaccgaggcatgcatatgctcgcggaaggccaggcagatatacaggggattgacccaag  
gatactgcaactagtagggaaggctggaacatctagacttgggtgcagggttatgtcgaatggcttggtagaggcctcctacggcggt  
ggttatgccaatgagaccatgggcaagtatccggcaagggtctagacaagtgtaaaaacaaactcgacaatgcatgccacaagtgga  
gcaaggctctcgaagagattgaaagcctgcgcacagcaatcgcgcgaaggcagaacagcaagtgaagggtgaagcatggtctctc  
aaggggtcagtgtaaacacattctacaaggactgcataaaattggcaccgcaattgcagtag**ag↓ct**caag**ag↓ct**acctgggaaggc  
ttggctatgaccggttaagttcatgggtgctg**tag↓ct**aaact**ag↓ct**gggtgcagtagcattcgtgcgttgcagcatacaccgc**ag↓ct**atc  
gtgggtatggcc**ag↓ct**acactgcgacgctgctgctgac**ag↓ct**atggacaatcaatccgtaaacaatgccgtatgtaaagtca  
gagtacctcacagtaacgtagaacaagcaactaaagacctcatgcttcagagtttggcatgatgacatttgggtggcatcatgacgtgtg  
cca**ag↓ct**tatgaagggtccttcgcagcagtagcaatcagaagttgaagaatcaacgccaccctcgcacgggagggcacagacatc  
gctcaagggatcaaggagacttacaagtctattggcagtagcattcaagtctattggcagtagcattcaagtcaactggtat**ag↓ct**  
aagtggacaacagataagtggacagcggctctagcaggtatgcgtcagttgaac**ag↓ct**agaagaagcaaaaggaagcagacagg  
tacaggctgagcagc**ag↓ct**gaagcacaagcaatgaccgagcgtgtggcaggggagcgtgcagcaacagttgctgcagggactg  
aaaccattaagaccatcgcagcagatgcggaat**ag↓ct**gtctaaagggtgaac**ag↓ct**ca**ag↓ct**ctcgtcatcaccgatatggt  
aat**ag↓ct**gacaaaataggtgcaattctccaagcagagcgcgatgcaattgtgaagtccttcacgcctaaacctctgtaggacaac  
caagg**ag↓ct**tatctcacatagcattcgggcctagaatccgtgatgttccgtat**ggcacgtagcttgggatc**atgagcaa**ag↓ct**agt  
atagaggcaaacctgcaggacaatagtgtagaggtggcagagatcagcccagaaacgcagaacatgagcagcgtatacctgtaga  
agaagcccaaatgtcgaactgccttacttgacagcagtaaatgacactagtaaggacgaccaagcaattgttactgacctataaacgct  
acaatagaggtgtgcacagagcagactaatacacttgcggggcatactgccgaggtccaagcagggtgga**ag↓ct**gcgggtattaa  
attagacgatgcacacaccacctgaagccaaggcgtggaaggcattaatcaagaggaactcagcaggg**ag↓ct****gaaggctctt**  
**gctgctgctg**taaatgaggtctgcagatgggaagatgcaattcctcaaacgggaggccgatcttcgcagggaaagccaccaagc  
aaagtccacggctgttatccagaaactacggtacaaacgccataaacggcaaggcggccacaggtgtattgcgcgccaagtggca  
ctcaggaacgcgttacgggcaaccattggccagaggctccggtctactatagccccactactaaacatcagcaaaaaatttggataaac  
gctgtatgtagaaggcaaccattggagccgtgaacatgaaccctgcac  
2.410 pb

**ag↓ct** = sítio de restrição da enzima *AluI*

**ggcacgtagcttgggatc** = posição para anelamento do iniciador BAP2

**gaaggcttctgctgctg** = posição para anelamento do iniciador AL34S

PCR gau 11/12: fragmento de 392pb

RFLP-Alu I: 4 fragmentos (29 + 255 + 87 + 21 = 392pb)

## Caracterização molecular dos isolados puros de *A. marginale*: sitios de restrição da enzima *AluI*

DEFINITION *Anaplasma marginale* surface protein (MSP1b) gene, complete cds.

ACCESSION M59845 (GenBank)

aggaagtcagcagttcagagctgttactgccaccatgttctag↓ctgcttatcgctcatgtggtgaatttccatcatttgttctgctcta  
ggcggcgcacttttctggetgtaacccggctgataggccttgggtactttggcgtgtagcaaaagtgtatttaaccatttccagca  
g↓cttgaagttcatattaagtaagaaaatcaccgttacttttacgag↓ctcgggccccgttctgcgacgcgctctgtggaccttgc  
gcgggcggggtgctctgtgagggcaaaatcgccggacagccgaaaattgggtgaaataaagcaatgccgggtggcatgtaagagcg  
cctaaccggttatcaagacattgtaagtaggtgctgatgacagaagacgacaagcaacaacaagaatcaaacgatgtagta  
caagccatctcggccgtattccagcgcaagagtgcagag↓ctgcagcggctgaatgacttcataaaaggcgtgatggtacactcaa  
gaacgtccatcccacatgaagtcactggaagcgttctaaagcaactatcagaaaagattgcag↓ctgaggcagcagcgaaggcag  
atgctaaatacagagcgtgggactacgtgctaaagcag↓ctgcagcattaggtaatctcgggcggttgcgccgtggtaaactca  
agag↓ctcagatgcaccaaggacctgaccagagcattgacgcactaccgttcatggatgaagcactgacactggtgagaagatt  
gaagtaccagcgggtgaggagcaagaattggcaaggcagcag↓cttggggtctagcaggcttcaagcgtacagtggatgaaagcc  
tggagatgtagaccgaggcatgcacatgctcgcggaaggccaggcacagatcacaggggattgacccaaggatactgcactag  
ttagggaaggtctgaaacatctagacttgggtgcagggttatgtcgaatggcttggtagaggcctcctacggcgttggttatgccaatga  
gacattgggcaagtatgccggcaagggtctagacaagttaaaaacaaactcacaatgatccacaagtggagcaaggctctcga  
agagattgaaagcctgcgcacagcaatcgacgcgaaggcagaacgcaagttgaaggtgaagcatggtctcctgaaggggtcagtg  
ctaacacattctacaaggactgcataaaattggcaccgcaattgcagtagcag↓ctcaag↓ctacctgggaaggcttggctatgacc  
ggtaagttcatgggtgctgtag↓ctaaactag↓ctgggtgcagtatccatgtgcgttgcagcataaccgcag↓ctatcgtgggtatgg  
ccgcag↓ctacacctgcagcgtgctgctgacag↓ctatggacaatcaatccgtaacaatgccgtagttaaagtcagtgagtacctt  
cacagtaacgtagaacaagcaactaaagacctcatggcttcagagttgcatgatgacatttgggtgcatcatgactgtgccaag↓ct  
tatgaagggctccttcgcagcaatcaatcagaagttgaaagaatcaacgccaccctcacacgggaggccacagacatcgtcaaggg  
gtcaaggagacttaccagtctattggcgatgcaattggcaatgattcaagctgttggcgatgattcaagctattggcgatgattcaag  
tcag↓ctaatgatggcatag↓ctaatggacagcag↓ctctagcaggttatgcgtcagttgaacag↓ctagaagaagcaaaaggaa  
gcagacagggtacaggctgagcagcag↓ctgaagcacaagcaatgaccgagcgtgtggcaggggagcgtgcagcaacagttgc  
tgcagggactgaaaccattaagaccatcgtcagcgatagcggcaatgag↓cttgctaaagggcatgaacag↓cttcag↓ctcgtcat  
caccgatatgttaatgag↓cttgcaaaaataggtgcatttcccgaagcagagcgcgatgacttgtgaagtccttcacgcctaaacctc  
ctgctaggacaaccaaggag↓cttatctcacatagcattcgggctagaatccgtgatgttccgtatggcacgtagcttgggatc  
gagcaaag↓ctagtagagggcaaaactgcagggacaatagtgtagaggtggcagagatcagcccagaaacgcagaacatgagcga  
cgctatacctgtagaagaagccaaattgcaaaactgccttactgagcagtaaatgacactagtaaggacgaccaagcaattgttact  
gacctataaacgctacaatagaggtgtgcacagagcagactaatacacttgcggggcactactgccgaggtccaagcagggctgga  
g↓ctgcgggtattagattcagcagatgcacagggactacaagaag↓ctaccctgaagccaagggcgtggaaggcattaatcaagagg  
aactcgagcaggcag↓ctgaaggcttctgctgctgctgtaaataaggtctctgcagatgggaagatgagtcctcaatcagcaggag  
accagattgcacagggagaacagcagcaacagcagcttctggttggctaggtaaaccgtaccctaccttactgacacgggtga  
gatatgcatgtagaaggag↓ctctgccccaatcaggacgaagtcctcacagggagcacagcgcacgttctaccacaaatcggg  
gggtgcaaacccgacttctgcagaaccgctgcagttgccgtgattcagcaagaaggagattggttgcgcccccctcgggtgagt  
gggtagatgcgttctgcccagtggtgatgtcaattgtagcattgcgccatctgcgcatattcggctttcgttcgacgttcagagggtg  
ttaac

2980 bp

**ag↓ct** = sítio de restrição da enzima *AluI*

**ggcacgtagcttgggatc** = posição para anelamento do iniciador BAP2

**gaaggcttctgctgctg** = posição para anelamento do iniciador AL34S

PCR gau 11/12: fragmento de 404pb

RFLP-*AluI*: 5 fragmentos (29 + 255 + 42 + 57 + 21 = 404pb)