

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**TRANSCRIÇÃO DE GENES PARA PROTEÍNAS DE
MEMBRANA DE ISOLADOS BRASILEIROS DE
*Anaplasma marginale***

Carlos Alberto do Nascimento Ramos

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
DEZEMBRO – 2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**TRANSCRIÇÃO DE GENES PARA PROTEÍNAS DE
MEMBRANA DE ISOLADOS BRASILEIROS DE
*Anaplasma marginale***

Carlos Alberto do Nascimento Ramos

Orientador: Profa. Dra. Ana Luiza Alves Rosa Osório
Co-Orientador: Dr. Flávio Ribeiro de Araújo

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, como
requisito à obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal. Área de concentração:
Saúde Animal

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Coordenadoria de Biblioteca Central – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil)

R175t Ramos, Carlos Alberto do Nascimento.
Transcrição de genes para proteínas de membrana de isolados
brasileiros de *Anaplasma marginale* / Carlos Alberto do Nascimento
Ramos. -- Campo Grande, MS, 2006.
59 f. ; 30 cm.

Orientador: Ana Luiza Alves Rosa Osório.
Co-orientador: Flávio Ribeiro de Araújo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

1. Anaplasmose. 2. Bovino - Doenças. I. Osório, Ana Luiza Alves
Rosa Osório. II. Araújo, Flávio Ribeiro de. III. Título.

CDD (22) – 636.20896922

CARLOS ALBERTO DO NASCIMENTO RAMOS

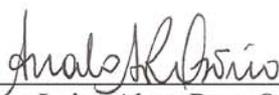
**“Transcrição de genes para proteínas de membrana de isolados
brasileiros de *Anaplasma marginale*”**

**“Transcription of genes for membrane proteins in brazilians
isolates of *Anaplasma marginale*”**

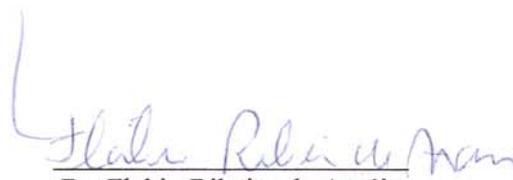
Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos
do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Saúde Animal

APROVADO: 18/12/2006



Dra. Ana Luiza Alves Rosa Osório



Dr. Flávio Ribeiro de Araújo



Dr. Cláudio Roberto Madruga



Dr. Cristiano Marcelo Espínola Carvalho

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram, mesmo que indiretamente, para a execução desse trabalho.

Agradeço também à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

	“Página”
1.0 INTRODUÇÃO.....	5
1.1 Etiologia da Anaplasmosse bovina.....	5
1.2 Distribuição de <i>A. marginale</i>.....	6
1.3 Transmissão.....	8
1.4 Ciclo Biológico.....	10
1.4.1 Ciclo de <i>A. marginale</i> no hospedeiro vertebrado.....	10
1.4.2 Ciclo de <i>A. marginale</i> no hospedeiro invertebrado.....	10
1.5 Patogenia Da Anaplasmosse Bovina.....	11
1.6 Controle.....	12
1.6.1 Controle de vetores.....	12
1.6.2 Quimioterapia.....	13
1.6.3 Vacinação.....	14
1.7 Perspectivas para o desenvolvimento de novas e mais eficientes vacinas contra <i>A. marginale</i>.....	16
1.7.1 Imunologia da infecção por <i>A. marginale</i>.....	17
1.7.2 <i>A. marginale</i> proveniente de cultivo celular.....	19
1.7.3 Vacinas derivadas de proteínas de membrana.....	20
1.8 Proteínas de membrana de <i>A. marginale</i>.....	22
1.8.1 Superfamília <i>msp1</i>.....	23
1.8.2 Superfamília <i>msp2</i>.....	23
1.8.3 Outras proteínas de membrana e associadas à membrana.....	24
REFERÊNCIAS.....	25
Anexo (<i>Short Communication</i>):	
TRANSCRIÇÃO DE GENES PARA PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE ISOLADOS BRASILEIROS DE <i>Anaplasma marginale</i>.....	39
Referências.....	45
Tabela.....	49
Figura.....	50

1.0 INTRODUÇÃO*

1.1 ETIOLOGIA DA ANAPLASMOSE BOVINA

A anaplasmoze bovina é uma doença de ruminantes, causada pela bactéria gram-negativa *Anaplasma marginale*, um microorganismo pertencente à Ordem *Rickettsiales*, a qual foi recentemente reorganizada em duas famílias, *Anaplasmataceae* e *Rickettsiaceae*, com base em análises de seqüências de ácidos nucléicos (*16S rRNA*, *groELS* e genes de proteínas de superfície) (Dumler et al. 2001). Com base nessas análises filogenéticas, a família *Anaplasmataceae* passou a englobar quatro gêneros, com diferentes graus de similaridades: *Anaplasma* com 96,1% de similaridade, *Ehrlichia* com 97,7%, *Wolbachia* com 95,6% e *Neorickettsia* com 94,9%. No gênero *Anaplasma*, atualmente estão incluídos os três patógenos de ruminantes, *A. marginale*, descrito inicialmente por Theiler (1910) na África do Sul, *A. centrale* como uma subespécie de *A. marginale* (Kocan et al. 2003), e *A. ovis*. Recentemente foram incluídos nesse gênero *A. bovis*, anteriormente classificado no gênero *Ehrlichia* como *E. bovis*, *A. platys* (*E. platys*) e *A. phagocytophilum*, cuja classificação anterior compreendia três espécies do gênero *Ehrlichia* (*E. equi*, *E. phagocytophilum* e o agente da erlichiose granulocítica humana - HGE) que não apresentaram diferenças genéticas suficientes para serem classificadas como espécies diferentes. O gênero *Aegyptianella* compreende parasitos de aves que até pouco tempo estavam sediados provisoriamente neste grupo devido a similaridades fenotípicas com espécies de *Anaplasma*, no entanto, recentemente teve sua classificação confirmada, com base em análises de seqüências gênicas de *Ae. pullorum* (Rikihisa et al. 2003), embora ainda não tenha sido formalmente renomeada como gênero *Anaplasma* (Fuente et al. 2005).

Organismos da família *Anaplasmataceae* são organismos intracelulares obrigatórios encontrados exclusivamente em vacúolos no citoplasma das células hospedeiras, formados pela invaginação da membrana celular das mesmas (Dumler et al. 2001; Yu et al. 2001). São bactérias gram-negativas, pequenas, muitas vezes pleomórficas, cocóides a elipsoidais, e podem ser encontrados individualmente ou em inclusões compactas formadas por várias unidades, denominadas mórulas. Geralmente

* Referências seguem as normas da revista "Memórias do Instituto Oswaldo Cruz"

parasitam células hematopoiéticas, como os neutrófilos e eritrócitos na corrente sanguínea ou nos tecidos, como o baço, fígado e medula óssea (Popov et al. 1998).

Recentemente um isolado americano de *A. marginale* (*St. Maries*) teve seu genoma completamente seqüenciado, demonstrando um tamanho de 1.197.687pb, com um conteúdo de G+C de 49.8% (Brayton et al. 2005), o que difere de outros microorganismos intracelulares obrigatórios, dentre os quais outras riquetsias que possuem em torno de 31% (Hotopp et al. 2006). O genoma apresentou uma alta densidade de genes codificantes (86%), o que é típico de bactérias intracelulares obrigatórias (Brayton et al. 2005). Detectou-se 949 seqüências gênicas que codificam para proteínas, dessas, pelo menos 62 codificam proteínas de membrana. O genoma possui pseudogenes funcionais, pertencentes a superfamília *msp2*, que possui uma importante função na variação antigênica das proteínas de membrana de *A. marginale* (Brayton et al. 2005). A presença de pseudogenes no pequeno genoma de *A. marginale*, sugere que esta provavelmente sofreu um processo de evolução reductiva, de forma semelhante a outras bactérias da ordem *Rickettsiales* (Anderson et al. 1998). No entanto poucos pseudogenes clássicos, definidos como cópias inativas de genes funcionais, foram encontrados em seu genoma. Brayton et al. (2005) encontraram apenas quatro pseudogenes clássicos no isolado *St Maries* de *A. marginale* (*murC*, *aspS*, *mutL* e *aatA*).

1.2 DISTRIBUIÇÃO DE *A. marginale*

Anaplasma marginale encontra-se distribuída por todas as regiões tropicais e subtropicais do planeta. É considerada endêmica em vários países das Américas Central e do Sul além do Caribe, com exceção as áreas de deserto e de elevadas altitudes como os Andes (Guglielmone, 1995). Nos Estados Unidos, *A. marginale* é enzoótica em vários estados do sudeste, ao logo da costa do Atlântico, e estados da região oeste (Kocan et al. 2003). A bactéria já foi relatada também em países europeus as margens do Mediterrâneo (Kocan et al. 2000), Oriente Médio (Rapjut et al. 2005; Molad et al. 2006) e Ásia (Liu et al. 2005), além do continente africano (Theiler, 1910), onde foi inicialmente descrita. Bovinos infectados por *A. marginale* têm sido encontrados na Áustria (Baumgartner et al. 1992), Itália (Cringoli et al. 2002), Espanha (Fuente et al.

2004), Portugal (Caeiro, 1999) e alguns países do leste europeu (Kocan et al. 2003). Na América do Sul, o carrapato *Boophilus microplus* é apontado como o único vetor biológico de *A. marginale* (Aguirre et al. 1994), o que torna a distribuição da bactéria nestas áreas diretamente associada a distribuição do vetor. Por esta razão, três situações epidemiológicas diferentes podem ser observadas no Brasil, segundo Kessler e Shenck (1998):

- 1- Áreas livres da doença, onde as condições climáticas são desfavoráveis ao desenvolvimento do carrapato durante a maior parte do ano, a exemplo do extremo sul do Rio Grande do Sul;
- 2- Áreas de instabilidade enzoótica, onde o ciclo do carrapato é interrompido durante dois ou três meses devido a condições climáticas adversas, seja por baixas temperaturas ou altas, como se observa nas fronteiras entre Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, e em algumas áreas do nordeste como o sertão da Bahia, Pernambuco e Ceará;
- 3- Áreas de estabilidade enzoótica, onde o desenvolvimento do vetor ocorre durante todo o ano, devido a condições climáticas favoráveis.

De fato, vários pesquisadores têm observado em seus estudos as mesmas condições epidemiológicas observadas por Kessler e Shenck (1998). Oliveira et al. (1992), observaram no semi-árido sergipano, uma soroprevalência para *A. marginale* de 16,3%, o que classifica essa região como uma área de instabilidade enzoótica. No entanto, é importante ressaltar a influência dos bovinos portadores e os dípteros hematófagos na manutenção da situação epidemiológica em algumas áreas, visto que, alguns pesquisadores tem observado condições de estabilidade enzoótica em regiões onde o carrapato *B. microplus* não encontra condições adequadas para o seu desenvolvimento durante todo o ano. Isto pode ser bem exemplificado com o trabalho de Barros et al. (2005), no qual observaram que a condição epidemiológica de *A. marginale*, na região do semi-árido baiano era de estabilidade enzoótica. Resultados semelhantes foram observados por Madruga et al. (1993) na região do Cariri, Estado da Paraíba.

O controle intensivo de carrapatos em algumas regiões, é apontado por alguns pesquisadores como sendo um importante fator criador de áreas de instabilidade enzoótica, no entanto, em estudos recentes, não se detectou associação entre baixos títulos de anticorpos para *A. marginale* e utilização intensiva de acaricidas em uma mesma geração de bovinos (Vieira et al. 2002; Swai et al. 2005).

Nos últimos anos, cada vez mais casos de anaplasmosose têm sido observados em regiões de clima temperado, como o norte da Europa (Hofmann-Lehmann et al. 2004) e Canadá (Donkersgoed et al. 2004). Os motivos pelos quais esses casos tenham ocorrido, muitas vezes são pouco esclarecidos, em outros são atribuídos a transmissão mecânica a partir de animais portadores introduzidos em áreas livres da doença. No entanto esses casos servem como alerta para os riscos do aquecimento global e suas influências na distribuição dos vetores e conseqüentemente na distribuição das doenças, dentre elas a anaplasmosose bovina (Jonsson e Reid, 2000).

1.3 TRANSMISSÃO

A transmissão da bactéria pode ser biológica, mecânica ou transplacentária, cada qual possuindo maior ou menor importância epidemiológica de acordo com a região geográfica. A transmissão biológica de *A. marginale* é feita por carrapatos, e segundo Scoles et al. (2005) é uma forma de transmissão cerca de duas vezes mais eficiente que a transmissão mecânica por *Stomoxys calcitrans*. Aproximadamente 20 espécies já foram descritas como vetores biológicos (Dikmans, 1950). A transmissão por carrapatos pode ocorrer de estágio a estágio (transestadial) ou em um mesmo estágio (intraestadial). A transmissão transovariana ainda é motivo de discussão, embora já tenha sido relatada para *Dermacentor andersoni* (Howell et al. 1941), e recentemente larvas de *B. microplus*, provenientes tanto de pastagens de áreas endêmicas para riquetsia, quanto de teleóginas alimentadas em animais positivos, tenham sido encontradas positivas para *A. marginale* por PCR, o que representa um forte indício de transmissão transovariana (Stich et al. 1989; Shimada et al. 2004). A transmissão intraestadial é realizada principalmente por carrapatos machos, devido a sua longevidade e motilidade entre os bovinos (Kocan et al. 2003). Os carrapatos machos *D. andersoni* e *D. variabilis* têm sido apontados como os principais transmissores biológicos nos Estados Unidos (Kocan et al. 1981; Kocan et al. 1985), *Rhipicephalus simus* na África do Sul (Potgieter e Van Resburg, 1982), *B. annulatus* em Israel, México e América Central (Samish et al. 1993; Guglielmo, 1995) e *B. microplus* na América do Sul (Aguirre et al. 1994).

Segundo estudos de Eriks et al. (1993), os níveis de riquetsemia aos quais os carrapatos são expostos durante sua alimentação nos bovinos, estão diretamente relacionados à proporção de carrapatos infectados com *A. marginale*. Uma forte correlação positiva foi observada entre o nível médio de riquetsemia nos bovinos e o grau de infecção dos carrapatos *D. andersoni* tanto intra-estadial como transestadial. Moura et al. (2003) observaram que riquetsemias de 0,2% foram suficientes para infectar teleóginas de *B. microplus* com *A. marginale*.

A transmissão mecânica de *A. marginale* freqüentemente ocorre via instrumentos contaminados com sangue infectado, tais como agulhas, instrumentos de castração, descorna e tatuagem. A transmissão mecânica por dípteros hematófagos, principalmente os dos gêneros *Tabanus* e *Stomoxys* é uma realidade (Potgieter et al. 1981; Foil, 1989), embora ainda seja contestada por alguns pesquisadores (Kessler, 2001). Essa forma de transmissão tem sua importância epidemiológica enfatizada quando, em áreas consideradas livres de carrapatos vetores, casos clínicos de anaplasmoose bovina são registrados (Guglielmone, 1995; Hofmann-Lehmann et al. 2004). Recentemente, em estudo epidemiológico sobre *A. marginale* na Bolívia, conduzido por Carique Mas et al. (2000), concluiu-se que os tabanídeos foram os principais responsáveis pela soroprevalência de 20,52% da riquetsia naquele país.

A riquetsia pode ser transmitida também por via transplacentária a partir do segundo trimestre de gestação (Zaugg, 1985), e embora incidências de transmissão tão elevadas quanto 15,6% já tenham sido registradas (potgieter e Van Rensburg, 1987), a importância epidemiológica desse tipo de transmissão, assim como a transmissão mecânica, é considerada relevante apenas em regiões de não ocorrência dos vetores biológicos.

1.4 CICLO BIOLÓGICO

1.4.1 Ciclo de *A. marginale* no hospedeiro vertebrado

Em bovinos, os eritrócitos são as únicas células infectadas por *A. marginale*. Os corpúsculos iniciais, adquiridos biológica ou mecanicamente pelo hospedeiro susceptível, após atingirem a corrente sanguínea aderem-se aos eritrócitos,

provavelmente por meio de moléculas adesivas de membrana como a MSP1a (Fuente et al. 2001a), e em seguida promovem a invaginação da membrana eritrócítica até seu total englobamento. No interior dos vacúolos formados pela membrana celular, os corpúsculos iniciais sofrem sucessivas fissões binárias até atingirem um número de quatro a oito novos corpúsculos. O vacúolo contendo os novos corpúsculos desloca-se em direção a periferia do eritrócito, até a fusão do mesmo com a membrana celular, quando os novos corpúsculos iniciais de *A. marginale* são liberados para infectar novos eritrócitos (Ristic e Watrach 1963).

1.4.2 Ciclo de *A. marginale* no hospedeiro invertebrado

O desenvolvimento de *A. marginale* em carrapatos é complexo e coordenado pelo ciclo de alimentação do artrópode (Kocan et al. 2003). Os eritrócitos infectados ingeridos durante o repasto sangüíneo do carrapato são a fonte de infecção para suas células intestinais. Após o desenvolvimento de *A. marginale* no intestino, muitos outros tecidos do carrapato são infectados, incluindo as glândulas salivares, a partir das quais a riquetsia é transmitida para os vertebrados durante a alimentação do carrapato (Kocan et al. 1986; Kocan et al. 1992; Ge et al. 1996). De forma semelhante ao que acontece no hospedeiro vertebrado, *A. marginale* se desenvolve em vacúolos formados pela invaginação da membrana celular das células dos vetores, a primeira forma vista na colônia é a reticulada (vegetativa), que se divide por fissão binária, formando grandes colônias que podem conter centenas de organismos. Esta forma evolui para a forma denominada “corpos densos”, que é a forma infectante e é capaz de sobreviver por um curto período de tempo no meio extracelular (Kocan et al. 2003).

1.5 PATOGENIA DA ANAPLASMOSE BOVINA

Anaplasnose bovina é uma doença hemolítica, na qual os eritrócitos parasitados são retirados da circulação pela ação do sistema reticulo endotelial do hospedeiro. A

doença clínica é mais notável em bovinos, porém outros ruminantes, inclusive selvagens como os bisões e antílopes africanos podem infectar-se tornando-se portadores (Kuttler, 1984). O período de incubação da infecção (período pré-patente) depende do número de organismos da dose infectante, e pode variar de 7 a 60 dias, com média de 28 dias (Gale et al. 1996; Kocan et al. 2003). Após a infecção ser estabelecida, o número de eritrócitos parasitados aumenta exponencialmente, podendo atingir níveis tão elevados quanto 70% (Richey, 1981). Em seguida, as células infectadas são fagocitadas pelo sistema retículo-endotelial bovino, resultando no desenvolvimento de anemia branda a severa e icterícia sem hemoglobinemia e hemoglobinúria. Os sinais clínicos podem também incluir febre, perda de peso, aborto, letargia, diminuição na produção de leite e, freqüentemente, morte (Palmer et al. 1989). Os animais que sobrevivem à fase aguda, desenvolvem infecções persistentes, caracterizadas por baixas riquetsemias que oscilam ciclicamente entre níveis inferiores a 10^4 até 10^7 eritrócitos parasitados por ml de sangue (Eriks et al. 1993). Os animais persistentemente infectados ou portadores são resistentes à doença clínica, entretanto, servem como reservatórios de *A. marginale*, já que são fonte de sangue infectado para transmissão mecânica ou biológica.

Bezerros são menos susceptíveis à infecção por *A. marginale* e, quando infectados, são menos propensos ao desenvolvimento da doença clínica, esse evento ainda não é claramente entendido, porém a influência dos anticorpos colostrais provavelmente têm uma importante função (Madruga et al. 1985; Kocan et al. 2003).

A necropsia freqüentemente revela uma carcaça icterica, vesícula biliar bastante dilatada, fígado, baço e linfonodos também encontram-se dilatados e congestos e hemorragias petequiais na musculatura cardíaca não são incomuns (Galhotra et al. 1977; Ajayi et al. 1978; Young et al. 1977).

1.6 CONTROLE

O grande paradoxo no controle da anaplasnose bovina são os animais persistentemente infectados. Estes, apesar de possuírem uma sólida imunidade contra o desenvolvimento da doença clínica, representam o principal reservatório de infecção para animais susceptíveis, por meio da transmissão mecânica e biológica, e contribuem

para a difusão da anaplasnose. Bovinos infectados com baixos níveis de riquetsemia, são muitas vezes difíceis de serem detectados por meio de distensões sanguíneas coradas. Além disso, bovinos que são tratados com tetraciclina, que reduz a riquetsemia e subsequentemente os títulos de anticorpos, podem mostrar-se sorologicamente negativos para *A. marginale* (Kocan et al. 2000).

Embora os métodos de controle da anaplasnose não tenham variado muito ao longo das últimas décadas, os mesmos variam consideravelmente entre diferentes regiões geográficas (Kocan et al. 2000). Métodos para o controle de *A. marginale* tem incluído o controle de vetores, vacinação e utilização de antibióticos (Quimioterapia) (Kocan et al. 2003).

1.6.1 Controle de vetores

O controle de vetores, principalmente carrapatos, por meio da utilização de acaricidas, requer altos investimentos e, segundo alguns pesquisadores, o seu uso prolongado torna a população bovina susceptível quando a utilização é interrompida ou quando ocorre resistência dos carrapatos aos acaricidas (Gomes, 1998). Além disso o impacto ambiental causado por parte dos acaricidas deve ser considerado (Molloy et al. 2001). Apesar do controle de vetores por meio de acaricidas ser extensivamente utilizado em algumas regiões como a África, em outras, como nos Estados Unidos, são menos utilizadas (Kocan et al. 2000).

O controle de vetores através da manipulação da resposta imune contra os mesmos, tem sido investigada já a alguns anos. Os primeiros avanços no conhecimento da imunidade induzida aos carrapatos foram relatadas por Trager (1939), imunizando cobaias e coelhos com extratos brutos de *D. variabilis*. Em bovinos, o extrato de glândula salivar de *B. microplus* foi capaz de induzir resistência (Brossard, 1976). A purificação do alérgeno 2 (inibidor da enzima proteolítica e da coagulação sanguínea), a partir de larvas de *B. microplus*, quando inoculado em bovinos, demonstrou sucesso parcial na indução de resposta imune, caracterizada pela reação de hipersensibilidade. No entanto, os antígenos ocultos, ou seja, os antígenos derivados de porções dos carrapatos que não estão diretamente expostas no momento do repasto sanguíneo

(Ackerman et al. 1980), foram os que apresentaram melhores resultados. Os antígenos derivados do intestino médio de *B. microplus* propiciaram uma redução de 87% na carga parasitária desse carrapato em bezerros Hereford (Opdebeeck et al. 1988). Os estudos de indução de imunidade contra esses parasitos, passaram pela utilização de extratos brutos dos diferentes estádios dos carrapatos, extratos de glândulas salivares, extratos purificados, extratos de ovos embrionados e antígenos particulados a partir de diferentes tecidos, sendo o derivado do trato digestivo o que induziu melhor proteção (Wikel, 1996; Toro-Ortiz et al. 1997).

1.6.2 Quimioterapia

A quimioterapia mediada por antibióticos, principalmente os do grupo das tetraciclinas, foi testada no controle da anaplasmose em 1950 e até hoje é utilizada extensivamente em algumas partes do mundo, principalmente nos Estados Unidos (Kocan et al. 2000) de forma curativa ou até mesmo profilática. Adicionalmente, ao contrário do que se pensava, a quimio-esterilização promovida pela antibioticoterapia (Thompson et al. 1978), não é alcançada mesmo com a utilização de doses elevadas de tetraciclinas (Coetzee et al. 2005). Logo, embora a utilização de tetraciclinas seja justificável curativamente, os animais continuam como reservatórios da riquetsia. Um outro problema é quanto a forma de administração dos antibióticos aos bovinos, a qual tem sido realizada parenteralmente ou por via oral, por meio da incorporação do medicamento ao alimento dos animais (Kocan et al. 2000). Quando adicionado ao alimento, ou utilizado como suplemento alimentar, dificilmente se obtém uma dosificação homogênea por animal, o que pode favorecer ainda mais o surgimento de cepas resistentes (Kocan et al. 2000). Recentemente foi testada a eficiência da enrofloxacinina contra *A. marginale* em bezerros experimentalmente infectados. Cerca de 12 dias após a administração de 12,5 mg/Kg da droga, observou-se uma redução no percentual de eritrócitos parasitados de 39,13%. No entanto, esse regime de tratamento não foi capaz de promover a eliminação total da riquetsia (Coetzee e Apley, 2006).

1.6.3 Vacinação

A vacinação tem sido a mais econômica e eficaz forma de controle de *A. marginale* em todo o planeta (Palmer, 1989). As vacinas disponíveis atualmente são vivas ou inativadas, todas derivadas de *A. marginale* proveniente de eritrócitos bovinos, o que traz sérios problemas quanto a sua utilização, desde natureza econômica até o risco de transmissão de outros agentes infecciosos. Todas essas vacinas são herança das primeiras tentativas de imunização contra anaplasmoze bovina (premunização), que consistia na inoculação de sangue de bovinos portadores (doadores) nos bovinos que se desejava imunizar (receptores). Todos os tipos de vacinas utilizadas atualmente, induzem uma imunidade protetora que reduz ou previne os sinais clínicos da doença, mas as vacinas não previnem que os animais tornem-se persistentemente infectados com *A. marginale*.

Apesar de ter sido iniciada no começo do século passado, a utilização de vacinas vivas para o controle da anaplasmoze bovina continua bem difundida em diversas partes do mundo. O processo de vacinação envolve a infecção de bovinos via inoculação com eritrócitos parasitados com um isolado menos patogênico de *A. marginale* ou *A. centrale* (Kocan et al. 2000). A utilização de cepas virulentas de *A. marginale* como imunógeno em bovinos requer monitoramento constante dos animais vacinados e tratamento com tetraciclinas aos primeiros sinais de doença clínica. Os bovinos tornam-se persistentemente infectados sem passar pela fase aguda da doença. Essa estratégia de vacinação, também conhecida como método de “infecção x tratamento ou premunização”, tem custos elevados e muitas vezes mostra-se impraticável, principalmente quando um grande número de animais deve ser vacinado (Kocan et al. 2000; Kocan et al. 2003).

Cepas atenuadas da riquetsia também tem sido avaliadas como vacinas vivas contra anaplasmoze em bovinos. As estratégias de atenuação utilizadas tem envolvido desde passagens sucessivas do organismo em ovinos ou cervos, até a irradiação do patógeno com ^{60}Co (Kuttler e Zaugg, 1988; Sharma e Bansal, 1986). Ainda existem muitas controvérsias quanto a eficácia e segurança dessas vacinas. Osorno et al. (1975) consideraram uma vacina com cepa atenuada eficaz e segura para bovinos de qualquer idade ou sexo. Já outros pesquisadores, como Ribeiro et al. (1980), no Brasil e Henry et al. (1983), nos EUA, observaram reações adversas pós-vacinais nos bovinos.

Recentemente, uma cepa de *A. marginale* menos virulenta e que aparentemente não é transmissível por *B. microplus* foi descoberta na Austrália por Bock et al. (2003). A cepa denominada “*Dawn*” vem sendo avaliada como imunógeno naquele país.

Apesar da existência de cepas atenuadas de *A. marginale*, *A. centrale* é a espécie mais utilizada como imunógeno, devido ao fato de ser naturalmente pouco patogênica e promover um grau satisfatório de imunidade cruzada contra *A. marginale*, embora possa causar, eventualmente, doença clínica em bovinos adultos e falha de proteção contra cepas muito virulentas de *A. marginale* (Potgieter e Rensburg, 1983; Brizuela et al. 1998; Sacco et al. 2001). A imunidade cruzada entre as duas espécies de *Anaplasma*, deve-se provavelmente ao compartilhamento de epítomos imunodominantes (Shkap et al. 1991), dentre os quais, epítomos para linfócitos T CD4+ (Shkap et al. 2002). Em um estudo conduzido na Austrália por Bock e de Vos (2001), a utilização da vacina viva com *A. centrale* foi justificada, pois, apesar da resposta dos bovinos vacinados ter sido variada, a proteção contra o desafio com *A. marginale* foi adequada para prevenir a doença clínica na maioria dos casos.

As vacinas mortas ou inativadas, foram desenvolvidas inicialmente nos Estados Unidos na década de 60 (Brock et al. 1965), e, apesar de possuírem algumas vantagens perante as vacinas vivas, não são utilizadas com frequência. Algumas vantagens dessas vacinas sobre as vacinas vivas são: um risco reduzido de contaminação com outros agentes infecciosos, custos de estocagem inexpressivos, e mínimas reações pós-vacinais. Como desvantagens, pode-se citar a necessidade de reforços anuais e o alto custo de purificação dos corpúsculos iniciais de *A. marginale* dos eritrócitos bovinos (Kocan et al. 2003). Além disso, o nível de imunidade conferido pelas vacinas inativadas é menor que o das vacinas vivas (Kocan et al. 2003).

1.7 PERSPECTIVAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVAS E MAIS EFICIENTES VACINAS CONTRA *A. marginale*

Com o advento das técnicas de DNA recombinante e o sucesso no cultivo *in vitro* de *A. marginale* em células de carrapato, novas perspectivas surgiram quanto ao desenvolvimento de novas e mais eficientes vacinas contra anaplasmoose bovina

(Munderloh et al. 1996; Araújo et al. 2003). Associados a isso, um melhor entendimento da resposta imune do hospedeiro contra a riquetsia e um melhor entendimento da biologia da própria riquetsia, principalmente quanto a expressão de suas proteínas de membrana, tem focado as pesquisas atuais nos imunógenos baseados em organismos derivados de cultivo celular e nas proteínas imunodominantes de membrana.

1.7.1 Imunologia da infecção por *A. marginale*

A resposta imune contra *A. marginale*, requer uma eficiente indução de uma resposta do tipo Th1 (T helper 1), mediada principalmente por linfócitos T CD4+, produzindo altos níveis de interferon gama (INF γ), ativando macrófagos e estimulando linfócitos B a produzirem altos níveis de anticorpos da classe IgG2, (Palmer et al. 1999). De fato, a opsonização, fagocitose e morte dos microorganismos, mediada pelos anticorpos IgG2 e macrófagos ativados, parecem ser a peça fundamental para um eficiente controle de *A. marginale* em bovinos. Estudos conduzidos por Buening (1976) e Carson et al. (1976) estabeleceram a correlação entre ativação de macrófagos e controle da riquetsemia. Subseqüentemente, anticorpos dirigidos contra as proteínas principais de superfície de *A. marginale*, foram associados a proteção contra riquetsemia e anemia (Tebele et al. 1991). Os anticorpos contra as proteínas de membrana de *A. marginale* foram associados ainda a redução na infectividade da riquetsia para bovinos e a inibição da aderência da mesma aos eritrócitos (Palmer e McGuire, 1984; McGarey et al. 1994). No entanto a transferência passiva de anticorpos apenas, mostrou-se insuficiente para proteger bovinos contra desafio experimental (Gale et al. 1992), o que reforça a necessidade de uma resposta conjunta mediada por células e anticorpos para o efetivo controle da infecção.

Uma eficiente ativação de linfócitos T CD4+ em bovinos, é fundamental para o controle da riquetsemia por *A. marginale*. Brown et al. (1998a) comprovaram a importância das células T CD4+ e imunoglobulinas da classe IgG2 na resposta imune de bovinos contra anaplasiose. Nesse estudo, bovinos imunizados com membrana externa de *A. marginale* foram protegidos contra desafio homólogo, e a resposta imune desses bovinos foi caracterizada por altos títulos de IgG2 e INF γ . Interferon gama, produzido

por linfócitos T CD4+, é o principal responsável pelo aumento da produção de IgG2 pelos linfócitos B em bovinos (Estes et al. 1994; Estes e Brown, 2002) e ativação de macrófagos para produção de óxido nítrico (NO), que é tóxico para a riquetsia, além de aumentar nestas células a expressão dos receptores *Fc* que aumenta sua capacidade fagocítica (Palmer et al. 1999).

A resposta imune contra *A. marginale*, tem como principais alvos as proteínas de membrana da riquetsia. Diversos epítomos para linfócitos T e B, tem sido identificados em suas proteínas principais de superfície (Brown et al. 2001a, Brown et al., 2001b; Brown et al. 2002; Brown et al. 2004; Abbott et al. 2004; Garcia-Garcia et al. 2004; Barigye et al. 2004).

Brown et al. (2001a) observaram que células mononucleares de bovinos imunizados com MSP1, proliferaram vigorosamente, “in vitro”, em resposta a exposição tanto de isolado homólogo como heterólogo de *A. marginale*. A resposta imune foi dirigida preferencialmente a região carboxi terminal (C-terminal) de MSP1a, que estimulou as células TCD4+ a produzirem altos níveis de INF γ . A resposta humoral, mediada por IgG, também foi dirigida predominantemente a região C-terminal de MSP1a.

Epítomos T, também já foram detectados nas regiões conservadas e hipervariáveis de MSP2. Pelo menos quatro epítomos capazes de desencadear uma resposta de linfócitos T de memória foram identificados na região hipervariável de MSP2 (Brown et al. 2003; Abbott et al. 2004).

Garcia-Garcia et al. (2004) identificaram epítomos B na região amino-terminal (N-terminal) de MSP1a, e Barigye et al. (2004), demonstraram a existência de epítomos B, específicos para IgG2, em proteínas imunodominantes, como MSP2 e MSP1a de um isolado mexicano de *A. marginale*.

Lahmers et al. (2005) demonstraram que linfócitos T $\gamma\delta$ WC1+ proliferaram e secretaram INF γ em resposta a estimulação com extrato de *A. marginale* ou MSP2 apenas. Todos os clones de linfócitos que proliferaram apresentaram o fenótipo $\gamma\delta$ TCR+, WC1+, CD2-, CD3+, CD4-, CD8-, GD3.1+, GD3.5+, GD3.8+. A resposta proliferativa foi restrita ao MHC II, e os clones que responderam fortemente a MSP2 nativa, também responderam a peptídeos sintéticos construídos com base na região C-terminal da proteína nativa. Os linfócitos T $\gamma\delta$, têm sido implicados na resposta imune a muitos vírus, protozoários e bactérias em camundongos e humanos. Em bovinos,

principalmente nos jovens, os níveis circulantes desse tipo de linfócito são bem mais elevados que nos adultos (Wyatt et al. 1994), o que pode indicar o fato pelo qual os bezerras sejam mais resistentes a anaplasiose que os bovinos adultos (Jones et al., 1968).

Semelhantemente a outras riquetsias, como *A. phagocytophilum* e *E. chaffeensis*, é provável que além da variação antigênica, *A. marginale* possua outros mecanismos para evadir-se da resposta imune do hospedeiro. A ausência de genes necessários para a biosíntese de moléculas como lipopolissacarídeo (LPS) e peptidoglicano é um bom exemplo disso (Brayton et al. 2005; Lin e Rikihisa., 2003), uma vez que o reconhecimento dessas moléculas por receptores de reconhecimento padrão como os receptores *Toll-like* do hospedeiro, desencadeia uma forte resposta imune inata contra a riquetsia, a sua ausência então, facilita a adaptação da riquetsia as células dos hospedeiros vertebrados e invertebrados (Rikihisa et al. 2006).

1.7.2 *Anaplasma marginale* proveniente de cultivo celular

Uma das alternativas para imunização contra *A. marginale* é o cultivo *in vitro* dessa riquetsia, o qual constituiria um alternativa econômica, segura e eficaz de produção de antígenos (Waghela et al. 2000). Cultivos de *A. marginale* foram feitos em diversos tecidos com maior ou menor sucesso (Marble e Hanks, 1972; Mazzola et al. 1979; Kessler e Ristic, 1979). No entanto um verdadeiro avanço no cultivo *in vitro* da riquetsia foi obtido apenas quando células de *D. variabilis*, um importante vetor biológico da riquetsia em algumas partes do mundo, foram infectadas e cultivadas com *A. marginale* (Samish et al. 1988; Hidalgo et al. 1989). Posteriormente, desenvolveu-se um sistema de cultivo de *A. marginale* em células IDE8, derivadas de embriões de *Ixodes scapularis* (Munderloh et al. 1996). O ciclo de desenvolvimento da riquetsia na cultura de células, foi similar ao previamente observado em carrapatos naturalmente infectados (Blouin e Kocan, 1998), e a infectividade da riquetsia isolada de cultura, manteve-se tanto para bovinos como para carrapatos (Blouin et al. 1999). As primeiras proteínas de membrana caracterizadas em *A. marginale* (MSP1 a 5), mostraram-se conservadas nos organismos provenientes de cultivo celular, mesmo após sucessivas

passagens (Barbet et al. 1999), o que incentivou os pesquisadores a avaliarem *A. marginale* proveniente de cultura de células de carrapatos como imunógeno para bovinos. Em dois experimentos, um conduzido por Kocan et al. (2001) e o outro por Fuente et al. (2002), os bovinos imunizados com *A. marginale* isolado de cultura de células de carrapatos desenvolveram uma imunidade parcial contra a doença, representada principalmente por uma redução menos acentuada no volume globular, semelhante ao observado com *A. marginale* proveniente de eritrócitos. Um achado interessante foi observado quanto a resposta imune dirigida contra a proteína MSP1, bovinos imunizados com *A. marginale* proveniente de cultura de células de carrapatos, tiveram uma resposta imune humoral direcionada predominantemente contra MSP1b, enquanto nos animais imunizados com a riquetsia isolada de eritrócitos, a resposta humoral foi dirigida preferencialmente a MSP1a (Fuente et al. 2002). Esses achados sugerem que a expressão de MSP1 varia durante a multiplicação da riquetsia nos carrapatos e bovinos. E provavelmente outras proteínas de membrana também sejam diferentemente expressas entre eritrócitos bovinos e carrapatos. Recentemente a expressão diferencial de novas proteínas de membrana de *A. marginale* foi demonstrada. Löhr et al. (2002), observaram que apenas OpAG2 foi expressa em *A. marginale* proveniente de glândulas salivares de *D. variabilis* e *D. andersoni*, enquanto em organismos derivados de eritrócitos bovinos infectados tanto OpAG2 quanto OpAG3 foi detectada por *Western blot*. Mais recentemente, Nöh et al. (2006), não observaram sinal de expressão de OMP11 em células IDE8, apesar de transcritos terem sido observados.

1.7.3 Vacinas derivadas de proteínas de membrana

As proteínas de membrana de *A. marginale* são expostas na superfície da riquetsia, sendo facilmente acessíveis ao sistema imunológico do hospedeiro (Arulkanthan et al. 1999). Evidências iniciais da importância dessas proteínas na resposta imunológica do hospedeiro contra *A. marginale* vieram de experimentos de neutralização da infectividade da riquetsia por soro gerado contra corpúsculos iniciais (Palmer e McGuire, 1984). Os corpúsculos iniciais ou a membrana desses induziram

imunidade protetora em bovinos contra desafio homólogo, refletida por menores riquetsemias e severidade da anemia, quando comparado com controles não imunizados (Montenegro-James et al. 1991; Tebele et al. 1991), e também contra desafio heterólogo (Montenegro-James et al. 1991; Palmer et al. 1994).

Até o presente, vários pesquisadores têm avaliado algumas das proteínas de membrana de *A. marginale* como imunógenos para bovinos.

Tuo et al. (2000), avaliando uma composição vacinal constituída por MSP2 nativa associada a interleucina 12 (IL-12) humana recombinante contra anaplasmosse bovina, observaram respostas proliferativas de linfócitos T de bovinos imunizados, com aumento significativo da produção de IFN- γ e IL-2. Assim como níveis séricos elevados de IgG₁.

Na imunização de bovinos com vacina de DNA contendo gene *msp1b*, clonado no plasmídeo pcDNA3.1, via intramuscular, foi encontrado, após desafio com 10⁴ eritrócitos infectados, que os animais apresentaram proteção parcial, refletida por menor redução no volume globular, quando comparado com o grupo controle não imunizado (Andrade et al. 2004).

Garcia – Garcia et al. (2004), testando MSP1b recombinante, isoladamente ou associada a MSP1a recombinante, em bovinos Holandeses de 12-24 meses, não encontraram diferença significativa no percentual de redução do volume globular dos animais imunizados, comparado ao grupo controle, após desafio com isolado Virgínia de *A. marginale*.

Embora a imunização de bovinos com a membrana externa de *A. marginale* tenha induzido proteção contra a doença clínica (Tebele et al. 2001) associada com altos títulos de IgG2 e proliferação de linfócitos TCD4+ (Brown et al. 1998a). Nenhuma das proteínas principais de superfície (MSPs), isoladamente ou associadas, em suas conformações nativas ou produzidas por meio de DNA recombinante, induziram proteção equivalente a induzida pela membrana total da riquetsia. Essa discrepância na habilidade em induzir proteção, sugere ao menos duas explicações. A primeira é que talvez as proteínas de membrana mais antigênicas ainda não foram identificadas. Uma vez que, alguns clones de linfócitos TCD4+ isolados de bovinos infectados com *A. marginale*, responderam especificamente a proteínas de membrana mas não reconheceram nenhuma das MSPs (MSP1 a 5) previamente conhecidas, indicando a presença de epítomos T em proteínas de membrana ainda não identificadas (Brown et al.

1998a). A segunda explicação é que a combinação dessas proteínas apenas no contexto de membrana são necessárias para induzir proteção. Visto que, algumas das proteínas (MSPs 1 – 5) conhecidas possuem ligações covalentes e não covalentes a membrana da riquetsia, e essa relação pode influenciar a apresentação de importantes epítomos (Brayton et al. 2006).

1.8 PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE *A. marginale*

Na membrana dos corpúsculos iniciais de *A. marginale*, foram identificadas inicialmente seis proteínas principais de superfície (*major surface proteins* – MSPs) MSP1a (105 kDa), MSP1b (100 kDa), MSP2 (36 kDa), MSP3 (86 kDa), MSP4 (31 kDa) e MSP5 (19 kDa) (Palmer e Mcguire 1984; Barbet et al. 1987; Oberle et al. 1988; Tebele et al. 1991; Oberle et al. 1993). Posteriormente, utilizando eletroforese bi-direcional, Riding et al. (2003) identificaram outras proteínas na membrana externa de um isolado Australiano da riquetsia. Com o recente sequenciamento do genoma completo de um isolado (*St Maries*) de *A. marginale* (Brayton et al. 2005), 62 seqüências foram classificadas como proteínas de membrana. As indicações foram feitas com base na semelhança com seqüências gênicas de proteínas de membrana já conhecidas. A maioria das proteínas identificadas foram classificadas em duas grandes superfamílias de proteínas de membrana, superfamílias *mSP1* e *mSP2*, estruturadas em torno dos genes *mSP1* e *mSP2* respectivamente, identificados anteriormente e já bem caracterizadas (Brayton et al. 2005).

Algumas proteínas de membrana, não associadas a nenhuma superfamília, também foram descritas em *A. marginale* (VIRB3, VIRB9 e OMA 87) (Brayton et al. 2005; Lopez et al. 2005; Brayton et al. 2006).

1.8.1 Superfamília *mSP1*

A superfamília *mSP1* contém nove membros e foi estruturada em torno dos genes que codificam o heterodímero MSP1 (*mSP1 α* , *mSP1 β*). Contém também genes para três proteínas com similaridade estrutural a região C-terminal de MSP1a, essas proteínas

foram denominadas proteínas MSP1-like (MLPs 2 - 4), e seus genes estão localizados imediatamente antes do gene *msp1 α* . MLP2 e 4 têm 30% e 37% de homologia respectivamente com a região C-terminal de MSP1a.

Os membros restantes dessa superfamília são os cinco genes *msp1 β* , que incluem dois genes completos (*msp1 β 1* e *msp1 β 2*), e três genes parciais (*msp1 β pg1*, 2 e 3), que provavelmente são pseudogenes (Viseshakul et al. 2000; Brayton et al. 2005). O arranjo dos genes no isolado *St Maries* é similar ao arranjo no isolado da Flórida, no entanto as seqüências gênicas não são similares entre os isolados. As porcentagens de identidade entre os isolados é de 95% para *msp1 β 1*, 77% para *msp1 β 2*, 99% para *msp1 β pg1*, 28% para *msp1 β pg2* e 91% para *msp1 β pg3* (Viseshakul et al. 2000).

1.8.2 Superfamília *msp2*

A superfamília *msp2* foi estruturada em torno dos genes *msp2*, *msp3* e *msp4*, (Brayton et al. 2005), que fazem parte do grupo de antígenos de superfície *pfam* 01617 (Bateman et al. 2004). Essa superfamília contém 56 membros, sendo 16 pseudogenes, 15 proteínas de membrana externa (*outer membrane proteins* – OMPs), três genes associados ao operon de *msp2* (*opag* 1 a 3), 12 cópias do gene *orfx* e 7 cópias do gene *orfy*, além dos genes *msp2*, 3 e 4 (Brayton et al. 2005). Os genes *opag* 1 a 3, apresentam um padrão diferente de expressão. OpAG 2 é expressa em *A. marginale* proveniente de eritrócitos bovinos e células de carrapatos, enquanto OpAG 3 é expressa apenas em eritrócitos bovinos. As OMPs possuem seus genes controlados individualmente por um promotor específico ou em operons, com vários genes regulados por um único promotor. Três desses genes (*omp2*, 3 e 6) provavelmente são pseudogenes clássicos, uma vez que não observou-se transcrito dos mesmos em *A. marginale* derivado de eritrócitos bovinos ou células de carrapatos (Löhr et al. 2002). Transcritos para todos os outros genes *omps*, foram detectados em eritrócitos bovinos infectados, células de *D. andersoni* e células IDE8 (Nöh et al. 2006). A expressão dos genes *omp1*, 4, 7, 8, 9, 10, 11 e 14, já foi detectada em eritrócitos bovinos por meio de *Western blot* com anti-soro específico e espectrometria de massa em diferentes isolados de *A. marginale* (Riding et al. 2003; Lopez et al. 2005; Nöh et al. 2006). OMP1, 4, 7, 8 e 9 foram detectadas

também em *A. marginale* provenientes de células IDE8, apesar do nível de expressão ter sido de 10 a 25 vezes inferior ao nível de expressão na riquetsia derivada de eritrócitos (nöh et al. 2006).

1.8.3 Outras proteínas de membrana e associadas à membrana

Com o completo sequenciamento do genoma de *A. marginale*, algumas seqüências genômicas anotadas e designadas com base na similaridade com outras seqüências previamente descritas, não foram classificadas em nenhuma superfamília. Algumas dessas proteínas (VIRB3, VIRB9, VIRB10), fazem parte do sistema de secreção tipo IV, já descritas em várias bactérias da família *Rickettsiaceae* (Ohashi et al. 2001) e que promove a secreção ou transferência de célula a célula de macromoléculas, proteínas ou complexos de proteína-DNA (Christie e Vogel 2000). Outras, têm sido descritas em poucos estudos. Lopez et al. (2005), combinando técnicas imunológicas, proteômicas e genômicas, descreveu algumas dessas proteínas que foram reconhecidas por IgG2 de bovinos imunizados com membrana de *A. marginale*. Algumas dessas proteínas foram identificadas por meio da homologia com proteínas de outros organismos. Duas seqüências mostraram homologia com proteínas de *E. canis* (AM197 e AM854) e uma seqüência mostrou identidade com uma proteína de *E. chaffensis*. Essas proteínas, apesar de não se conhecer suas funções, induziram a produção de IgG2 em bovinos. Outras proteínas identificadas nesse estudo com funções conhecidas, incluem EF-Tu (*Elongation factor Tu*) (AM254) e PepA citosol amino peptidase (AM956). A identificação de EF-Tu e PepA nesse estudo foi uma surpresa, uma vez que, acreditava-se que essas proteínas fossem citoplasmáticas. No entanto mostrou-se que elas estão ancoradas na membrana da riquetsia e são expostas no meio extracelular (Lopez et al. 2005).

A identificação de novos antígenos na membrana externa de *A. marginale*, reconhecidos IgG2 de bovinos imunes, expande o número de proteínas candidatas a vacina para futuros estudos. Para que uma vacina seja eficaz, é importante que essas proteínas sejam reconhecidas por anticorpos e linfócitos TCD4+ da maioria dos bovinos em uma população vacinada e que essas proteínas sejam conservadas entre diferentes

isolados de *A. marginale*. Muitas dessas proteínas tem sido descritas apenas em isolados Americanos da riquetsia, informações sobre a conservação dessas proteínas em outros isolados não têm sido publicadas.

REFERÊNCIAS

Abbott JR, Palmer GH, Howard CJ, Hope JC, Brown WC 2004. *Anaplasma marginale* major surface protein 2 CD4⁺-T-cell epitopes are evenly distributed in conserved and hypervariable regions (HVR), whereas linear B-cell epitopes are predominantly located in the HVR. *Infect Immun* 72: 7360-7366.

Ackerman S, Floyd M, Sonenshine DE 1980. Artificial immunity to *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) vaccination using tick antigens. *J Med Entomol* 17: 391-397.

Aguirre DH, Gaido AB, Viñabal AE, De Echaide ST, Guglielmone AA 1994. Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different level rickettsaemia. *Parasite* 1: 405-407.

Andersson SG, Zomorodipour A, Andersson JO, Sicheritz-Ponten T, Alsmark UC, Podowski RM, Naslund AK, Eriksson AS, Winkler HH, Kurland CG 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396: 133-140.

Andrade GM, Machado RZ, Vidotto MC, Vidotto O 2004. Immunization of bovines using a DNA vaccine (pcDNA3.1/MSP1b) prepared from the Jaboticabal strain of *Anaplasma marginale*. *Ann NY Acad Sci* 1026: 257-266.

Araújo FR, Madruga CR, Soares CO, Kessler RH 2003. Progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. *Pesq Vet Bras* 23: 139-148.

Arulkanthan A, Brown WC, McGuire TC, Knowles DP 1999. Biased immunoglobulin G1 isotype responses induced in cattle with DNA expressing *msp1a* of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 67: 3481-3287.

Ajayi SA, Wilson AJ, Campbell RSF 1978. Experimental bovine anaplasmosis: clinic-pathological and nutritional studies. *Res Vet Sci* 25: 76-81.

Barbet AF, Palmer GH, Myler PJ, McGuire TC 1987. Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for polypeptide Am105L. *Infect Immun* 55: 2428-2435.

- Barbet AF, Blentlinger R, Yi J, Lundgren AM, Blouin EF, Kocan KM 1999. Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture, tick salivary glands, and cattle. *Infect Immun* 67: 102-107.
- Barigye R, Garcia-Ortiz MA, Ramírez EER, Camarillo SDR 2004. Identificación de antígenos IgG2 específicos en tres cepas mexicanas de *Anaplasma marginale*. *Téc Pec Méx* 42: 219-236.
- Barros SL, Madruga CR, Araújo FR, Menk CF, Almeida MAO, Melo ESP, Kessler RH 2005. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, by enzyme-linked immunosorbent assays. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 513-517.
- Bateman A, Corin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer EL, Studholme DJ, Yeats C, Eddy SR 2004. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 32: 138-141.
- Baumgartner W, Schlerka G, Fumicz M, Stoger T, Awad-Masameh M, Schuller W, Weber P 1992. Seroprevalence survey for *Anaplasma marginale* infection of Austrian cattle. *Zent Vet* 39: 97-104.
- Blouin EF, Kocan KM 1998. Morphology and development of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in cultured *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) cells. *J Med Entomol* 35: 788-797.

- Blouin EF, Barbet AF, Jooyoung Y, Kocan KM 1999. Establishment and characterization of an Oklahoma isolate of *Anaplasma marginale* in cultured *Ixodes scapularis* cells. *Vet Parasitol* 87: 301-313.
- Bock RE, De Vos AJ 2001. Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Aust Vet Journal* 79: 832-839.
- Bock RE, De Vos AJ, Kingston TG, Carter PD 2003. Assessment of a low virulence Australian isolate of *Anaplasma marginale* for pathogenicity and transmissibility by *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol* 118: 121-131.
- Brayton KA, Kappmeyer LS, Herdon DR, Dark MJ, Tibbals DL, Palmer GH, McGuire TC, Knowles DP 2005. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proceed Nat Acad Sci* 102: 844-849.
- Brayton KA, Palmer GH, Brown WC 2006. Genomic and proteomic approaches to vaccine candidate identification for *Anaplasma marginale*. *Exp Rev Vaccines* 1: 95-101.
- Brizuela CM, Ortellado CA, Sanabria E, Torres A, Ortigosa D 1998. The safety and efficacy of Australian tick-borne disease vaccine strains in cattle in Paraguay. *Vet Parasitol* 76: 27-41.

Brock WE, Kliwer IO, Pearson CC 1965. A vaccine for anaplasmosis. *J Am Vet Med Assoc* 147: 948-951.

Brossard M 1976. Relation immunologiques entre bovines et tiques, plus particulièrement entre bovines et *Boophilus microplus*. *Act Trop* 33: 15-36.

Brown WC, Shkap V, Zhu D, McGuire TC, Tuo W, Mcelwain TF, Palmer GH 1998. CD4⁺ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infect Immun* 66: 5406-5413.

Brown WC, McGuire TC, Zhu D, Lewin HA, Sosnow J, Palmer GH 2001a. Highly conserved regions of the immunodominant major surface protein 2 of the genogroup II ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale* are rich in naturally derived CD4⁺ T lymphocyte epitopes that elicit strong recall responses. *J Immunol* 166: 1114-1124.

Brown WC, Palmer GH, Lewin HA, McGuire TC 2001b. CD4⁺ T Lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1 (MSP1); a heteromeric complex of MSP1a and MSP1b; preferentially recognize the MSP1a carboxyl terminus that is conserved among strains. *Infect Immun* 69: 6853-6862.

Brown WC, McGuire TC, Mwangi W, Kegerreis KA, Macmillan H, Lewin HA, Palmer GH 2002. Major histocompatibility complex class II DR-restricted memory CD4+ T lymphocytes recognize conserved immunodominant epitopes of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a. *Infect Immun* 70: 5521-5532.

Brown WC, Brayton KA, Styer CM, Palmer GH 2003. The hypervariable region of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 (MSP2) contains multiple immunodominant CD4+ T lymphocytes epitopes that elicit variant-specific proliferative and INF- γ responses in MSP2 vaccinates. *J Immunol* 170: 3790-3798.

Brown WC, Palmer GH, Brayton KA, Meeus PFM, Barbet AF, Kegerreis KA, McGuire TC 2004. CD4+ T lymphocytes from *Anaplasma marginale* major surface protein 2 (MSP2) vaccines recognize naturally processed epitopes conserved in MSP3. *Infect Immun* 72: 3688-3692.

Caeiro V 1999. General review of tick species present in Portugal. *Parassit* 41: 11-15.

Buening, G.M 1973. Cell mediated immune response in calves with anaplasmosis. *Am J Vet Res* 34: 757-763.

Carrique Mas JJ, Widdowson MA, Cuéllar AM, Ribera H, Walker AR 2000. Risk of babesiosis and anaplasmosis in different ecological zones of Santa Cruz department, Bolivia. *Vet Parasitol* 93: 29-38.

Carson CA, Sells DM, Ristic M 1976. Cutaneous hypersensitivity and isoantibody production in cattle injected with live or inactivated *Anaplasma marginale* in bovine and ovine erythrocytes. *Am J Vet Res* 37: 1059-1063.

Christie PJ, Vogel JP 2000. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trend Microbiol* 8: 354-360.

Coetzee FJ, Apley DM, Kocan KM, Rurangirwa FR, Donkersgoed JV 2005. Comparison of three oxytetracycline regimens for the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infections in beef cattle. *Vet Parasitol* 127: 61-73.

Coetzee JF, Apley MD 2006. Efficacy of enrofloxacin against severe experimental *A. marginale* infections in splenectomized calves. *Vet Ther* 7: 319-328.

Cringoli G, Otranto D, Testini G, Buono V, Giulio GD, Traversa D, Lia R, Rinaldi L, Veneciano V, Puccini V 2002. Epidemiology of bovine tick-borne diseases in southern Italy. *Vet Res* 33: 421-426.

Dikmans, G 1950. The transmission of anaplasmosis. *Am J Vet Res* 11: 5-16.

Donkersgoed JV, Gertonson A, Bridjes M, Rath D, Dargatz D, Wagner B, Boughton A, Knoop D, Walton TE 2004. Prevalence of antibodies to bluetongue virus and

Anaplasma marginale in Montana yearling cattle entering Alberta feedlots: Fall 2001. *Can Vet J* 45: 486-492.

Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Sys Evo Microbiol* 51: 2145-2165.

Eriks IS, Stiller D, Palmer GH 1993. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. *J Clin Microbiol* 31: 2091-2096.

Estes DM, Brown WC 2002. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 90: 1-10.

Estes DM, Closser NM, Allen GK 1994. IFN- γ stimulates IgG₂ production from bovine B cells costimulated with anti- μ and mitogen. *Cell Immunol* 154: 287-295.

Foil LD 1989. Tabanids as vectors of disease agents. *Parasitol Today* 5: 88-96.

Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Kocan KM 2001. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. *Int J Parasitol* 31: 145-153.

Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Saliki JT, Kocan KM 2002. Infection of tick cells and bovine erythrocytes with one genotype of the intracellular ehrlichia *Anaplasma marginale* excludes infection with other genotypes. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 658-668.

Fuente J, Passos LM, Van Den Bussche RA, Ribeiro MFB, Facury-Filho EJ, Kocan KM 2004. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol* 121: 307-316.

Fuente J, Lew A, Lutz H, Meli ML, Hofmann-Lehmann R, Shkap V, Molad T, Mangold AJ, Almazán C, Narajo V, Gortázar C, Torina A, Caracappa S, García-Pérez AL, Barral M, Oporto B, CECI L, Carelli G, Blouin EF, Kocan KM 2005. Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. *Anim Health Res Rev* 6: 75-89.

Gale KR, Leatch G, Gartside M, Dimmock CM 1992. *Anaplasma marginale*: failure of sera from immune cattle to confer protection in passive-transfer experiments. *Parasitol Res* 78: 410-415.

Gale KR, Leatch G, De Vos AJ, Jorgensen WK 1996. *Anaplasma marginale*: effect of challenge of cattle with varying doses of infected erythrocytes. *Int J Parasitol* 26: 1417-1426.

Garcia-Garcia JC, Fuente J, Kocan KM, Blouin EF, Albur T, Onet VC, Saliki JT 2004. Mapping of B-cell epitopes in the N terminal repeated peptides of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and characterization of the humoral immune response of cattle immunized with recombinant and whole organism antigens. *Vet Immunol Immunopathol* 98: 137-151.

Galhotra AP, Gautam OP, Banerjee DP, Chauban HVS, Singh RP, Kalra DS 1977. Pathological changes in bovine anaplasmosis. *Ind Vet Journal* 54: 599-601.

Ge NL, Kocan KM, Blouin EF, Murphy GL 1996. Developmental studies of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) infected as adult using nonradioactive *in situ* hybridization. *J Med Entomol* 33: 911-920.

Guglielmo AA 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet Parasitol* 57: 109-119.

Henry ET, Norman BB, Fly DE, Wichmann RW, York SM 1983. Effects and use of modified live *Anaplasma marginale* vaccine in beef heifers in California. *J Am Vet Med Assoc* 183: 66-69.

Hidalgo RJ, Jones EW, Brown JE, Ainsworth AJ 1989. *Anaplasma marginale* in tick cell culture. *Am J Vet Res* 50: 2028-2032.

Hofmann-Lehmann R, Meli ML, Dreher UM, Gonczi E, Deplazes P, Braun U, Engels M, Schupbach J, Jorger K, Thoma R, Griot C, Stark KDC, Willi B, Schmidt J, Kocan KM, Lutz H 2004. Current infections with vector-borne pathogens associated with fatal hemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland. *J Clin Microbiol* 42: 3775-3780.

Hotopp JC, Lin M, Madupu R, Crabtree J, Angiuoli SV, Eisen J, Seshadri R, Ren Q, Wu M, Utterback TR, Smith S, Lewis M, Khouri H, Zhang C, Niu H, Lin Q, Ohashi N, Zhi N, Nelson W, Brinkac LM, Dodson RJ, Rosovitz MJ, Sundaram J, Daugherty SC, Davidsen T, Durkin AS, Gwinn M, Haft DH, Selengut JD, Sullivan SA, Zafar N, Zhou L, Benahmed F, Forberger H, Halpin R, Mulligan S, Robinson J, With O, Rikihisa Y, Tettelin H. 2006. Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. *Plos genetics* 2: 208-223.

Howell DE, Stiles GW, Moe LH 1941. The fowl tick (*Argas persicus*), a new vector of anaplasmosis. *Am J Vet Res* 4: 73-75.

Jones WE, Kliwer IO, Norman BB, Brock WE 1968. *Anaplasma marginale* infection in young and aged cattle. *Am J Vet Res* 29: 535-544.

Jonsson NN, Reid SWJ 2000. Global climate change and vector borne diseases. *Vet Journal* 160: 87-89.

Kessler RH, Ristic M 1979. *In vitro* cultivation of *Anaplasma marginale*: invasion of and development in noninfected erythrocytes. *Am J Vet Res* 40: 1774-1776.

Kessler RH, Schenk MAM 1998. *Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos*. Embrapa Gado de Corte: Campo Grande, p.157.

Kessler RH 2001. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. *Pesq Vet Bras* 21: 177-179.

Kocan KM, Hair JA, Ewing SA, Stratton LG 1981. Transmission the *Anaplasma marginale* Theyler by *Dermacentor andersoni* stiles and *Dermacentor variabilis* say. *Am J Vet Res* 42: 15-18.

Kocan KM, Barron SJ, Ewing SA, Hair JA 1985. Transmission the *Anaplasma marginale* by adult *Dermacentor andersoni* during feeding calves. *Am J Vet Res* 46: 1565-1567.

Kocan KM, Blouin EF, Barbet AF 2000. Anaplasmosis control past, present, and future. *Ann NY Acad Sci* 916: 501-509.

Kocan KM, Fuente J, Guglielmone AA, Meléndez RD 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin Microbiol Rev* 16: 698-712.

Kuttler KL, Zaugg JL, Johnson LW 1984. Serologic and clinical responses of preimmunized vaccinated and previously infected cattle to challenge exposure by two different *Anaplasma marginale* isolates. *Am J Vet Res* 45: 2223-2226.

Kuttler KL, Zaugg JL 1988. Characteristics of an attenuated *Anaplasma marginale* of deer origin as an anaplasmosis vaccine. *Trop Anim Health Prod* 20: 85-91.

Lahmers KK, Norimine J, Abrahamsen MS, Palmer GH, Brown WC 2005. The CD4+ T cell immunodominant *Anaplasma marginale* major surface protein 2 stimulates $\gamma\delta$ T cell clones that express unique T cell receptors. *J Leuk Biol* 77: 199-208.

- Lin M, Rikihisa Y 2003. *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infect Immun* 71: 5324-5331.
- Liu Z, Luo J, Bai Q, Ma M, Guan G, Yin H 2005. Amplification of 16S rRNA genes of anaplasma species in china for phylogenetics analysis. *Vet Microbiol* 107: 145-148.
- Lopez JE, Siems WF, Palmer GH, Brayton KA, McGuire TC, Norimine J, Brown WC 2005. Identification of novel antigenic proteins in a complex *Anaplasma marginale* outer membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping. *Infect Immun* 73: 8109-8118.
- Lohr CV, Brayton KA, Shkap V, Molad T, Barbet AF, Brown WC, Palmer GH 2002. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 operon associated proteins during mammalian and arthropod infection. *Infect Immun* 70: 6005-6012.
- Marble DW, Hanks MA 1972. A tissue culture method for *Anaplasma marginale*. *Cornell Vet* 62: 196-205.
- Madruga CR, Honer MR, Andreotti MR, Araújo FR, Santarém V 1993. Prevalência de *Anaplasma marginale* em três regiões do estado da Paraíba. In: Congresso Internacional de Medicina Veterinária em língua Portuguesa, 6, Anais, p. 350-352.

Madruga CR, Kessler RH, Gomes A, Schenk MAM, Andrade DF 1985. Níveis de anticorpos e parasitemia de *Anaplasma marginale* em área enzoótica, nos bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. *Pesq Agropec Bras* 20: 135-142.

McGarey DJ, Allred DR 1994. Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. *Infect Immun* 62: 4587-4593.

Molad T, Mazuz ML, Fleiderovitz L, Fish L, Savitsky I, Kriel Y, Leibovitz B, Molloy J, Jongejan F, Shkap V 2006. Molecular and serological detection of *A. centrale* and *A. marginale* infected cattle grazing within an endemic area. *Vet Microbiol* 113: 55-62.

Molloy JB, Bock RE, Templeton JM, Bruyeres PM, Bowles PM, Blight GW, Jorgensen WK 2001. Identification of antigenic differences that discriminate between cattle vaccinated with *Anaplasma centrale* and cattle naturally infected with *Anaplasma marginale*. *Int J Parasitol* 31: 179-186.

Montenegro-James S, James MA, Benitez MT, León E, Baek BK, Guillén AT 1991. Efficacy of purified *Anaplasma marginale* initial bodies as a vaccine against anaplasmosis. *Parasitol Res* 77: 93-101.

- Munderloh UG, Blouin EF, Kocan KM, Ge NL, Edwards WE, Kurtii TJ 1996. Establishment of the tick (Acari:Ixodidae)-borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in tick cell culture. *J Med Entomol* 33: 656-664.
- Moura AB, Vidotto O, Yamamura MH, Vidotto MC, Pereira ABL 2003. Studies on the *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) infection in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) using 'nested' PCR. *Rev Bras Parasitol Vet* 12: 27-32.
- Nöh SM, Brayton KA, Knowles DP, Agnes JT, Dark MJ, Brown WC, Baszler TV, Palmer GH 2006. Differential expression and sequence conservation of the *Anaplasma marginale* msp2 gene superfamily outer membrane proteins. *Infect Immun* 74: 3471-3479.
- Oberle SM, Palmer GH, Barbet AF 1993. Expression and immune recognition of the conserved MSP4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 61: 5245-5251.
- Oberle SM, Palmer GH, Barbet AF, McGuire TC 1988. Molecular size variations in an immunoprotective protein complex among isolates of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 56: 1567-1573.

- Ohashi N, Rikihisa Y, Unver A 2001. Analysis of transcriptionally active gene clusters of major outer membrane protein multigene family in *Ehrlichia canis* and *E. chaffeensis*. *Infect Immun* 69: 2083-2091.
- Oliveira, A. A.; Pedreira, P. A. S.; Almeida, M. F. R 1992. Doenças de bezerro. II Epidemiologia da Anaplasmosose no estado de Sergipe. *Arq Bras Méd Vet Zootec* 44: 377-386.
- Opdebeeck JP, Wong JYM, Jackson LA, Dobson C 1988. Vaccine to protect Hereford cattle tick, *Boophilus microplus*. *Immunol* 63: 363-367.
- Osorno MP, Solana PM, Perez JM, López TR 1975. Study of an attenuated *Anaplasma marginale* vaccine in Mexico. Natural challenge of immunity in an enzootic area. *Am J Vet Res* 36: 631-633.
- Palmer GH, Barbet AF, Cantor GH, McGuire TC 1989. Immunization of cattle with the MSP-1 surface protein complex induces protection against a structurally variant *Anaplasma marginale* isolate. *Infect Immun* 57: 3666-3669.
- Palmer GH, McGuire TC 1984. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *J Immunol* 133: 1010-1015.
- Palmer GH, Munodzana D, Tebele N, Ushe T, McElwain TF 1994. Heterologous strain challenge of cattle immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes. *Vet Immunol Immunopathol* 42: 265-273.

- Palmer GH, Rurangirwa FR, Kocan KM, Brown WC 1999. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitol Today* 15: 281-286.
- Popov VL, Han VC, Chen SM, Dumler JS, Freng HM, Andreadis TG, Tesh RB, Walker DH 1998. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *J Med Microbiol* 47: 235-251.
- Potgieter FT, Van Rensburg L 1982. The effect of incubation and prefeeding of infected *Rhipicephalus simus* nymphae and adults on the transmission of *Anaplasma marginale*. *Ond J Vet Res* 49: 99-101.
- Potgieter FT, Van Rensburg L 1987. The persistence of colostral *Anaplasma* antibodies and incidence of *in utero* transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. *Ond J Vet Res* 54: 557-560.
- Potgieter FT, Sutherland B, Biggs C 1981. Attempts to transmit *Anaplasma marginale* with *Hippobosca rufipes* and *Stomoxys calcitrans*. *Ond J Vet Res* 48: 119-122.
- Rajput ZI, Song-Hua HU, Arijo AG, Habib M, Khalid M 2005. Comparative study of *Anaplasma* parasites in tick carrying buffaloes and cattle. *J Zhejiang Univ Sci* 6: 1057-1062.

- Ribeiro BMF, Reis R, Patarroyo JHS 1980. Avaliação da vacina atenuada de *Anaplasma marginale* em bezerros mantidos em piquetes. *Arq Esc Vet Universidade Federal de Minas Gerais* 32: 251-258.
- Riding G, Hope M, Waltisbuhl D, Willadsen P 2003. Identification of novel protective antigens from *Anaplasma marginale*. *Vaccine* 21: 1874-1883.
- Rikihisa Y 2003. Mechanisms to create a safe haven by members of the family Anaplasmataceae. *Ann New York Acad Sci* 990: 548-555.
- Ristic M, Watrach AM 1963. Anaplasmosis. VI. Studies and a hypothesis concerning the cycle of development of the causative agent. *Am J Vet Res* 24: 267-277.
- Rikihisa Y 2006. *Ehrlichia* subversion of host innate responses. *Curr Opin Microbiol* 9: 95-101.
- Sacco AMS, Kessler RH, Madruga CR 2001. Cepas atenuadas de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma centrale* como imunógenos no controle da tristeza parasitária bovina. *Cien Rural* 31: 849-855.
- Samish M, Pipano E, Hana B 1988. Cultivation of *Anaplasma marginale* from cattle in a *Dermacentor* cell line. *Am J Vet Res* 49: 254-256.

- Samish M, Pipano E, Hadani A 1993. Intrastadial and interstadial transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus annulatus* ticks in cattle. *Am J VetRes* 54: 411-414.
- Scoles GA, Broce AB, Lysyk TJ, Palmer GH 2005. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *J Med Entomol* 4: 668-675.
- Sharma SP, Bansal GC 1986. Immune responses in cattle vaccinated with gamma-irradiated *Anaplasma marginale*. *Ind J Anim Sci* 56: 490-493.
- Shimada MK, Yamamura MH, Kawasaki PM, Tamekuni K, Igarashi M, Vidotto O, Vidotto MC 2004. Detection of *Anaplasma marginale* DNA in larvae of *Boophilus microplus* ticks by polymerase chain reaction. *Proc Nat Acad Sci USA* 102: 95-102.
- Shkap V, Pipano E, McGuire TC, Palmer GH 1991. Identification of immunodominant polypeptides common between *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale*. *Vet Immunol Immunopathol* 29: 31-40.

Shkap V, Molad T, Brayton KA, Brown WC, Palmer GH 2002. Expression of major surface protein 2 variants with conserved T-cell epitopes in *Anaplasma centrale* vaccinates. *Infect Immun* 70: 642-648.

Stich RW, Kocan KM, Palmer GH, Ewing SA, Hair JA, Barron SJ 1989. Transestadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentor variabilis*. *Am J Vet Res* 50: 1377-1380.

Swai ES, French NP, Beauchamp G, Fitzpatrick JL, Bryant MJ, Kambarage D, Ogden NH 2005. A longitudinal study of sero-conversion to tick-borne pathogens in smallholder dairy youngstock in Tanzania. *Vet Parasitol* 131: 129-137.

Tebele N, McGuire TC, Palmer GH 1991. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infect Immun* 59: 3199-3204.

Theiler A. "*Anaplasma marginale* (gen. and spec. nov.). The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease." Report to the Government, Transvaal, South Africa. *Veterinary Bacteriology*, Department of Agriculture (1908-9,1910) v. 7, n. 64.

Toro-Ortiz RD, Vaz IS, Gonzalez JC, Masuda A 1997. Monoclonal antibodies against *Boophilus microplus* and their effects on tick reproductive efficiency. *Vet Parasitol* 69: 297-306.

- Trager W 1939. Further observation on acquired immunity to the tick *Dermacentor variabilis* Say. *J Parasitol* 25: 137-139.
- Tuo W, Palmer GH, McGuire TC, Zhu D, Brown WC 2000. Interleukin-12 as an adjuvant promotes immunoglobulin G and type 1 cytokine recall responses to major surface protein 2 of ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 68: 270-280.
- Vieira MIB, Leite RS, Martins JR, Sacco AMS, Silva JGC 2002. Resposta imune humoral contra *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) em bovinos submetidos a distintas estratégias de controle do carrapato vetor *Boophilus microplus* (Canestrine, 1887). *Rev Bras Parasitol Vet* 11: 71-76.
- Viseshakul N, Kamper S, Bowie MV, Barbet AF 2000. Sequence and expression analyses on a surface antigen gene family of the rickettsia *Anaplasma marginale*. *Gene* 253: 45-53.
- Young MF, Kuttler KL, Adams LG 1977. Experimentally induced anaplasmosis in neonatal isohemolytic anemia-recovered calves. *Am J Vet Res* 38: 1745-1747.
- Waghela SD, Melendy D, Cruz D, Wagner GG 2000. Antigenic analysis of *Anaplasma marginale* grown in bovine erythrocytes co-cultured with bovine endothelial cells. *Vet Parasitol* 94: 133-139.

- Wyatt CR, Madruga C, Cluff C, Parish S, Hamilton MJ, Goff W, Davis WC 1994. Differential distribution of gamma delta T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 40: 187-199.
- Wikel SK 1996. Host immunity to ticks. *Ann Rev Entomol* 41: 1-22.
- Yu XJ, Zhang XF, McBride JW, Zhang Y, Walker DH 2001. Phylogenetic relationships of *Anaplasma marginale* and '*Ehrlichia platys*' to other *Ehrlichia* species determined by GroEL amino acid sequences. *Int J Syst Evolut Microbiol* 51: 1143-1146.
- Zaugg JL 1985. Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation. *Am J Vet Res* 46: 570-572.

ANEXO*Transcrição OMPs *A. marginale*Transcrição de genes para proteínas de membrana de isolados brasileiros de *Anaplasma marginale*

Carlos AN Ramos^{*/+}, Flávio R Araújo^{**}, Ana LAR Osório^{*}, Cláudio R Madruga^{**}

*Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Departamento de Medicina Veterinária, UFMS, Campo Grande, **Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte,¹ EMBRAPA –CNPGC, Campo Grande – MS

Este trabalho demonstra o padrão de transcrição de genes de proteínas de membrana em três isolados brasileiros de *A. marginale* (Rio Grande do Norte, Pernambuco-Zona da Mata e Pernambuco-Sertão). RNA foi purificado a partir de sangue de bovinos infectados experimentalmente com os três isolados de *A. marginale*. Após transcrição reversa, os genes *omp1*, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14; *opag1-3*; *virB3*, 9, 10; *am097*, 197, 254, 854 e 956 foram amplificados por PCR, com *primers* específicos. Detectou-se transcritos para todos os genes analisados, exceto *omp2*, 3 e *opag3* em todos os isolados e do gene *omp7* em um dos isolados estudados. A ausência de transcrito para os genes *opag3* e *omp7* diverge do observado em isolados americanos da riquetsia. Possíveis razões para essas diferenças são discutidas.

Palavras chaves: Transcrição, OMPs, *Anaplasma marginale*, Brazil

* Normas Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz
Apoio financeiro: FUNDECT / CNPq
+ Autor para correspondência: carlosanramos@yahoo.com.br

A anaplasmosose bovina, causada pela riquetsia *Anaplasma marginale*, é uma doença de grande importância econômica que é transmitida principalmente por carrapatos. A riquetsia infecta eritrócitos bovinos, causando anemia severa associada à anorexia, febre, diminuição no ganho de peso e produção de leite, e morte nos casos graves de animais não tratados (Zaugg et al. 1985).

Estudos sobre a resposta imune em animais protegidos contra anaplasmosose indicam que a proteção está associada ao aumento na atividade fagocítica dos macrófagos induzida por interferon gama (INF γ), interleucina 2 (IL-2), IL-12 e fator de necrose tumoral - alfa (TNF α), produzidos por linfócitos T CD4⁺ que ainda estimulam a produção de imunoglobulinas da classe IgG2 contra antígenos de superfície da riquetsia (McGuire et al. 1979; Brown et al. 1998a, Palmer et al. 1999).

O recente sequenciamento do genoma do isolado *St. Maries* de *A. marginale* possibilitou a identificação de 62 genes para proteínas de membrana previamente não conhecidas. A maioria desses genes foram classificados nas superfamílias *msh1* ou *msh2*, e outras não foram associadas a nenhuma superfamília (Brayton et al. 2005; Brayton et al. 2006). A superfamília *msh2* foi criada em torno da seqüência dos genes de *msh2*, 3 e 4, que formam a base de uma família de antígenos de superfície denominada *pfam* 01617 (Vidotto et al. 1994; Bateman et al. 2004). O gene *msh2* é transcrito como parte de um operon, no qual encontram-se genes associados denominados *opags* 1-3 (*operon associated genes*), os quais estão incluídos na família. Na maioria desses genes, ocorre pequena variação durante o curso da infecção em mamíferos, ou entre diferentes isolados americanos da riquetsia (Lohr et al. 2002). Ademais, 14 genes para proteínas de membrana externa (*outer membrane proteins* – *omps*) foram identificadas com similaridades de seqüência com *msh2* e *msh4*. Esses genes estão arranjados isoladamente ou em operons. Três desses genes (*omp2*, 3 e 6)

podem ser pseudogenes, uma vez que não foram detectados transcritos no isolado *St Maries*, todos os outros genes foram transcritos em eritrócitos bovinos infectados com o isolado *St Maries* de *A. marginale* (Nöh et al. 2006). Como os genes da superfamília *msp2* são expressos na superfície bacteriana, o grau de conservação entre isolados de *A. marginale* emerge como uma importante questão. A imunização de bovinos com membrana externa induziu proteção contra a doença após desafio com *A. marginale* (Tebele et al. 1991; Brown et al. 1998a). Notavelmente, proteínas de membrana conservadas entre isolados são alvos para linfócitos T CD4⁺ provenientes de animais vacinados (Brown et al. 1998b). Com isso, a identificação de proteínas de membrana altamente conservadas é uma prioridade para o desenvolvimento de vacinas contra anaplasmose.

Em isolados brasileiros de *A. marginale* é desconhecido se esses genes são transcritos e expressos durante a infecção em hospedeiros mamíferos. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar o padrão de transcrição desses genes em três isolados brasileiros da riquetsia. Para isso, três bezerros Aberdeen Angus foram confirmados livres de *A. marginale* por PCR para *msp5* e Elisa indireto para MSP1a e MSP2 (Araújo et al. 2005). Os bezerros foram inoculados por via subcutânea com estabilizado criopreservado de eritrócitos infectados com isolados de *A. marginale* do Estado do Rio Grande do Norte (RN), e duas microrregiões do estado de Pernambuco, designados Pernambuco – Zona da Mata (PE-ZM) e Pernambuco – Sertão (PE-SE). Os animais foram examinados diariamente para detecção de *A. marginale* por distenções sangüíneas coradas com Giemsa, e o volume globular médio também foi determinado. Para obtenção de altos níveis de riquetsemia, os bezerros foram imunossuprimidos com dexametasona. Por volta do 21º dia pós-inoculação, os bezerros 0581 (isolado RN), 0583 (PE-ZM) e 0588 (PE-SE) apresentaram riquetsemias de 35, 87 e 20%,

respectivamente, quando então procedeu-se a coleta de sangue em tubos heparinizados para posterior extração de RNA total.

A extração de RNA total foi realizada com Trizol Reagent (Invitrogen, EUA) conforme instruções do fabricante. O RNA extraído foi tratado com RQ1 Rnase – Free Dnase (Promega, EUA) por 30 minutos a 37°C seguido da inativação da enzima conforme instruções do fabricante. A transcrição reversa foi feita com sistema Impron II (Promega, EUA) utilizando como *primer* hexameros aleatórios, de acordo com as instruções do fabricante. A detecção de transcritos foi feita por PCR, utilizando-se *primers* específicos para os genes *omp1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14; opag1-3; virB3, 9, 10; am097, 197, 254, 854 e 956* (TABELA). As seqüências desses *primers* foram submetidas ao programa *Blastn* (NCBI), para identificar seqüências homólogas em outros organismos relacionados e em outros genes de *A. marginale*, mas não se observou identidade com escore significativo.

Os parâmetros de amplificação foram 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 60°C por 1 min para os genes *omps1-14, opag2, 3 e virB3*, e 55°C para *opag1, virB9-10, am097, 197, 254, 854 e 956*, e extensão a 72°C também por 1 min, seguida de uma etapa de extensão final a 72°C por 4 min. As reações de PCR foram realizadas a partir de DNA genômico, como controle positivo, cDNA para detecção de transcrito, e RNA total como controle negativo, de cada isolado da riquetsia. Os produtos das PCRs foram separados eletroforeticamente em agarose 1% e corados com brometo de etídio para visualização.

Não se observou transcrito para os genes *omp2, 3 e opag3* (Fig) em nenhum dos isolados analisados. Para o gene *omp7* (Fig) apenas no isolado PE-ZM não foi observado transcrito. Todos os outros genes (Fig) apresentaram transcritos em todos os isolados analisados. As ausências de transcrito para os genes *omp2 e 3* já haviam sido

descritas por nöh et al. (2006), sendo os dois, juntamente com o gene *omp6*, considerados como possíveis pseudogenes. Com relação ao gene *opag3*, sua transcrição assim como sua expressão já foi detectada em eritrócitos infectados com diferentes isolados americanos de *A. marginale* (Lohr et al. 2002) e em um isolado australiano (Riding et al. 2003).

Alguns dos genes que apresentaram transcrito nos isolados brasileiros analisados (*virb9* e *10*, *am097*, *197*, *254*, *854* e *956*) representam possivelmente uma importante fonte de antígenos para preparações vacinais, uma vez que, em estudo conduzido por Lopez et al. (2005), as proteínas de membrana separadas por eletroforese bi-dimensional foram reconhecidas por IgG2 de bovinos vacinados com membrana de *A. marginale*. Ainda nesse estudo, duas dessas proteínas (Am197 e 854) descritas pela primeira vez em *A. marginale*, apresentaram identidade de seqüência com proteínas de *Ehrlichia canis*. Outras, cujo se acreditava serem proteínas citoplasmáticas, como PepA (Am 956) e EF-Tu (Am 254), foram analisadas pelo programa TMHMM e reconhecidas como proteínas ancoradas à membrana externa e expostas no meio extracelular.

Possíveis explicações para ausência de transcritos em alguns genes de isolados brasileiros de *A. marginale* seria, conforme sugerido por nöh et al (2006), que *omp2* e *3* são realmente pseudogenes. No caso de *opag3* (todos os isolados) e *omp7* (no isolado PE-ZM), os níveis de transcrição poderiam ocorrer em níveis muito baixos, não sendo possível detectá-los com a técnica de RT-PCR. A transcrição desses genes poderia ocorrer também apenas em sítios específicos de multiplicação da bactéria, como nos tecidos dos hospedeiros invertebrados, o que não foi o objetivo desse estudo.

A evolução da bactéria com seus hospedeiros invertebrados poderia sugerir também uma possível explicação para as diferenças no padrão de transcrição entre os isolados americanos e os isolados brasileiros analisados, uma vez que, nos Estados

Unidos, a transmissão biológica de *A. marginale* é realizada por carrapatos do gênero *Dermacentor* (KOCAN et al., 1981), enquanto no Brasil o carrapato *Boophilus microplus* é o responsável por esse tipo de transmissão.

Referências

- Araújo FR, Melo VSP, Ramos CAN, Madruga CR, Soares CO, Kessler RH, Almeida NF, Araújo GS, Alves LC, Torres Junior RAA, Fragoso SP, Arauco PRC, Bacanelli G, Oliveira MB, Santos LR 2005. Development of enzyme-linked immunosorbent assays based on recombinant MSP1a and MSP2 of *Anaplasma marginale*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 765-769
- Bateman A, Corin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer EL, Studholme DJ, Yeats C, Eddy SR 2004. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 32: 138-141.
- Brayton KA, Kappmeyer LS, Herndon DR, Dark MJ, Tibbals DL, Palmer GH, McGuire TC, Knowles DP 2005. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 844-849.
- Brayton KA, Palmer GH, Brown WC 2006. Genomic and proteomic approaches to vaccine candidate identification for *Anaplasma marginale*. *Expert Rev Vaccines* 1: 95-101.

Brown WC, Shkap V, ZHU, D, McGuire T C, Tuo W, Mcelwain TF, Palmer GH 1998a.

CD4⁺ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infect Immun* 66: 5406-5413.

Brown WC, Zhu D, Shkap V, McGuire TC, Blouin EF, Kocan KM, Palmer GH 1998b.

The repertoire of *Anaplasma marginale* antigens recognized by CD4⁺ T-lymphocyte clones from protectively immunized cattle is diverse and includes major surface protein 2 (MSP-2) and MSP-3. *Infect Immun* 66: 5414-5422.

Kocan KM, Hair JA, Ewing SA, Stratton LG 1981. Transmission the *Anaplasma marginale* Theyler by *Dermacentor andersoni* stiles and *Dermacentor variabilis* say. *Am J Vet Res* 42: 15-18.

Löhr CV, Brayton KA, Shkap V, Molad T, Barbet AF, Brown WC, Palmer GH 2002.

Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 operon-associated proteins during mammalian and arthropod infection. *Infect Immun* 70: 6005-6012.

Lopez JE, Siems WF, Palmer GH, Brayton KA, McGuire TC, Norimine J, Brown WC

2005. Identification of novel antigenic proteins in a complex *Anaplasma marginale* outer membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping. *Infect Immun* 73: 8109-8118.

McGuire TC, Musoke AJ, Kurtti T 1979. Functional properties of bovine IgG₁ and IgG₂: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. *Immunol* 38: 249-256.

Nöh SM, Brayton KA, Knowles DP, Agnes JT, Dark MJ, Brown WC, Baszler TV, Palmer GH 2006. Differential expression and sequence conservation of the *Anaplasma marginale* msp2 gene superfamily outer membrane protein. *Infect Immun* 74: 3471-3479.

Palmer GH, Rurangirwa FR, Kocan KM, Brown WC 1999. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitol Today* 15: 281-286.

Riding G, Hope M, Waltisbuhl D, Willadsen P 2003. Identification of novel protective antigens from *Anaplasma marginale*. *Vaccine* 21: 1874-1883.

Tebele N, McGuire TC, Palmer GH 1991. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infect Immun* 59: 3199-3204.

Vidotto MC, McGuire TC, McElwain TF, Palmer GH, Knowles DP Jr 1994.

Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*.

Infect Immun 62: 2940-2946.

Zaugg JL 1985. Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage

of gestation. *Am J Vet Res* 46: 570-572.

TABELA

Primers utilizados para amplificação de transcritos de proteínas de membrana de isolados brasileiros de *A. marginale*

Gene	Primer	Seqüência (5' – 3')	Produto (pb)	Gene	Primer	Seqüência (5' – 3')	Produto (pb)
<i>omp1</i>	F	AAGGTCTACGGCTTGGTTACGCTGCGTTGTCTTT	993	<i>omp14</i>	F	GCGTTTAGCCTCCTGT	1215
	R	AGTCTGATACCGCACTCAAACCCAAAATAGTCCAG			R	ATCCGAACCTGATTCTTA	
<i>omp2</i>	F	ATGATTGAGTCTATGGGGGAACAAAAGAGA	735	<i>opag1</i>	F	AGTTGCAGAGCATTTTCCTTG	390
	R	CTGGGTTGAGTGGTGACGGTATGGATA			R	CTAAAAAACCAAAAAAACCGT	
<i>omp3</i>	F	CCTCATTCTGACCTCTACCC	651	<i>opag2</i>	F	TGGTCGGGTTTGTATATGAGT	909
	R	AACCTGATTCTAGTTCTACCC			R	TCAAAGTAACACCCCTTATGCC	
<i>omp4</i>	F	CAGCATATCATTGAATACAGGAGGAAGTCGCTTAT	1218	<i>opag3</i>	F	TGTGGGTTGCACACACTACC	936
	R	GTGGCTAGCCGCTTTGGAGATGTTACCAG			R	CTAAAAACCATCACCAAATGC	
<i>omp5</i>	F	CTGGTGGTGGAGAGTTTGCCTATG	1119	<i>virb3</i>	F	TCGTCCGGTAGCGTAAAGAC	294
	R	AACTCGAGCTTCAGCCCCAGATTG			R	CTACATCACATCGTAAGAATT	
<i>omp7</i>	F	TCTTTTCTGTTGGGTGCGGTTGTA	1191	<i>virb9</i>	F	ATGAATTCTATAAAAACTTGCTTGC	840
	R	CGCGCCTTGACATCTTCCTC			R	TCAAAGCACCGTATTCACTACTTC	
<i>omp8</i>	F	TTTCTGTTGAGCGCGGTTGTAGTT	1200	<i>virb10</i>	F	TTGAGTTTAGGGATGTCAGACG	1338
	R	CGCGCTCTGATATTTCCCTTCA			R	CTACCTACGCACCGCCTC	
<i>omp9</i>	F	TCTTTTCTGTTGAGCGCGGTTGTA	1212	<i>am097</i>	F	ATGAAAAAGGCTTTCATGGTTT	813
	R	GCGTGCCTTGACATCTTCCCTCTC			R	CTACCCACGTCCCCTTCTG	
<i>omp10</i>	F	TTGCTGCGTTGCGACGGTTTC	1263	<i>am197</i>	F	ATGAAAAAGCTTGAGCTTGCTAG	510
	R	GCGAGATTCAACACCCCAAAAGAG			R	CTACTTGGGCTTTCTAGGAGCC	
<i>omp11</i>	F	ATGAGCTTTGTAAAGGTTTCTTGCCGTATC	1059	<i>am254</i>	F	ATGACAGAAGGGAGAAAAGCC	1182
	R	AGCCCGAAGTAAGTATGTCCAT			R	CTACTCCAAAATCTCAGTTATGATAC	
<i>omp12</i>	F	GGATCTATGATGAGGGCAACAAAA	858	<i>am854</i>	F	ATGCTGCATCGTTGGTTAGC	711
	R	CCAATTCCCCTCAAAGTGAGC			R	CTATTCAGGCGCGACCAC	
<i>omp13</i>	F	ATGGTTAAAGCAGGGCAGCATGGTTGAG	1059	<i>am956</i>	F	ATGTGCTATGGTACTCGCATC	1605
	R	CCCCTAGGTAGCTTATATGCACGTCTGAAA			R	TCACTTTTCGTAATACTTCGACACA	

F: primer forward; R: primer reverso

FIGURA

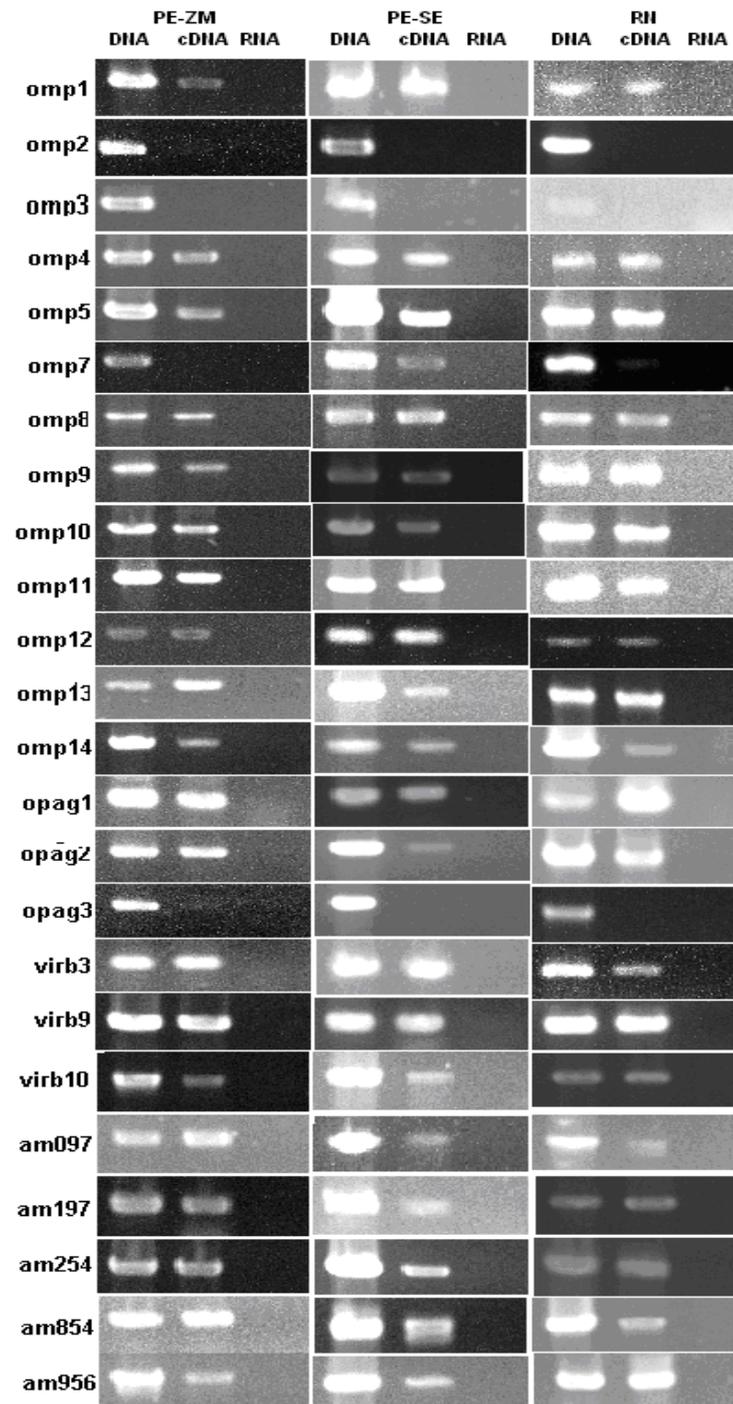


Figura: Detecção de transcritos em eritrócitos infectados com diferentes isolados brasileiros de *A. marginale*.

PE-ZM= Pernambuco – Zona da Mata; PE-SE= Pernambuco – Sertão, RN = Rio Grande do Norte