

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**TESE**

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE *Borrelia*  
*sp* E DE GENES DE *Anaplasma marginale* QUE  
CODIFICAM PROTEÍNAS DE MEMBRANA  
COM POTENCIAL IMUNOGÊNICO**

**Daniel da Silva Guedes Junior**

**2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE *Borrelia* sp E DE GENES DE  
*Anaplasma marginale* QUE CODIFICAM PROTEÍNAS DE MEMBRANA  
COM POTENCIAL IMUNOGÊNICO**

**Daniel da Silva Guedes Junior**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Adivaldo Henrique da Fonseca**

*e Co-orientação do Doutor*  
**Flábio Ribeiro de Araújo**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor em  
Ciências**, no Curso de Pós-Graduação  
em Ciências Veterinárias, Área de  
Concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2010

636.208960  
79G924c

T

Guedes Junior, Daniel da Silva, 1977-  
Caracterização genotípica de  
*Borrelia* sp. e genes de *Anaplasma*  
*marginale* que codificam proteínas de  
membrana com potencial imunogênico /  
Daniel da Silva Guedes Junior - 2010.  
100 f.: il.

Orientador: Adivaldo Henrique da  
Fonseca.

Tese (doutorado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso  
de Pós-Graduação em Ciências  
Veterinárias.

Bibliografia: f. 60-68.

1. Bovino - Infecções - Teses. 2.  
*Borrelia* - Teses. 3. Anaplasmoses -  
Teses. 4. Genes - Teses. I. Fonseca,  
Adivaldo Henrique da, 1953-. II.  
Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DANIEL DA SILVA GUEDES JUNIOR

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**,  
no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em  
Sanidade Animal.

TESE SUBMETIDA À AVALIAÇÃO EM 10/02/2010

Adivaldo Henrique da Fonseca, PhD, UFRRJ  
(Orientador)

Stenio Perdigão Fraga PhD, FIOCRUZ

Carlos Luiz Massard, PhD, UFRRJ

Paulo de Tarso Landgraf Botteon, PhD, UFMG

Jairo Dias Barreira, PhD, FIOCRUZ

*A Deus, pelo dom da vida.*

*“Bendito o homem que confia no Senhor e cuja esperança é o Senhor. Porque ele é como a árvore plantada junto às águas, que estende as suas raízes para o ribeiro, e não receia quando vem o calor, mas a sua folha fica verde; e, no ano de sequeidão não se perturba, nem deixa de dar fruto.” Jr 17:7,8.*

*“Tu a quem tomei desde os fins da terra, e te chamei dentre os seus mais excelentes, e te disse: Tu és o meu servo, a ti escolhi e nunca te rejeitei. Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça. Eis que, envergonhados e confundidos serão todos os que se indignaram contra ti; tornar-se-ão em nada, e os que contenderem contigo, perecerão. Buscá-los-ás, porém não os acharás; os que pelejarem contigo, tornar-se-ão em nada, e como coisa que não é nada, os que guerrearem contigo. Porque eu, o SENHOR teu Deus, te tomo pela tua mão direita; e te digo: Não temas, eu te ajudo. Não temas, tu verme de Jacó, povozinho de Israel; eu te ajudo, diz o SENHOR, e o teu redentor é o Santo de Israel. Eis que farei de ti um trilho novo, que tem dentes agudos; os montes trilharás e moerás; e os outeiros tornarás como a pragana. Tu os padejarás e o vento os levará, e o redemoinho os espalhará; mas tu te alegrarás no SENHOR e te gloriarás no Santo de Israel. Os aflitos e necessitados buscam águas, e não há, e a sua língua se seca de sede; eu o SENHOR os ouvirei, eu, o Deus de Israel não os desampararei. Abrirei rios em lugares altos, e fontes no meio dos vales; tornarei o deserto em lagos de águas, e a terra seca em mananciais de água. Plantarei no deserto o cedro, a acácia, e a murta, e a oliveira; porei no ermo juntamente a faia, o pinheiro e o álamo. Para que todos vejam, e saibam, e considerem, e juntamente entendam que a mão do SENHOR fez isto, e o Santo de Israel o criou.” Is 41:9-20.*

*“Eu irei adiante de ti, endireitarei os caminhos tortuosos, quebrarei a portas de bronze e despedaçarei as trancas de ferro; dar-te-ei os tesouros escondidos e as riquezas encobertas, para que saibas que eu sou o Senhor, o Deus de Israel, que te chama pelo teu nome.” Is 45:2-3.*

Dedico aos meus pais Daniel e Janete, irmãos Victor Hugo e Luciana, Julio César e Bianca, meus sobrinhos Brian, Mariana e Samuel, aos meus avós (*in memoriam*) e meu amor Caroline. Pelo amor, dedicação, compreensão, apoio, e paciência. Muito obrigado!

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Adivaldo Henrique Fonseca e à professora Marília pela convivência e belo exemplo de postura profissional, além do fundamental apoio estrutural para a execução deste trabalho.

Ao orientador e amigo Dr Flávio Ribeiro de Araújo e sua família, pelo apoio incondicional para realização deste trabalho.

Aos meus amigos Charles Passos, Fábio Jorge Moreira, Huarrison Azevedo Santos, pelo companheirismo, cumplicidade, brigas e a amizade que sempre nos uniu.

Aos amigos da Fiocruz João Rezende, Sergio Lourenço, Joyce Brito, Marisa Ribeiro, Ricardo Brum, Igor Barbosa, Ricardo Gonçalves, Carina Canteli, Ana Cristina e aos Chefes Lilia Ribeiro e Darcy Akemi.

A Jania Rezende, Jenevaldo Barbosa, Fabíola Corrêa, Raquel Lisboa e Rafaella Câmara pelo convívio e amizade.

Aos amigos João Telhado, Marta Fernanda Albuquerque, Rosana Botelho, Valéria Moura, pela amizade, companheirismo, conselhos, broncas, apoio incondicional e por me incentivarem e acreditarem em mim.

A amiga Samira Lessa Abdalla pela amizade, companheirismo e apoio durante o nosso convívio.

Aos professores Luís Carlos Reis, Paulo e Rita Botteon, que me apresentaram a Veterinária como pesquisa, que tanto me ensinaram enquanto acadêmico e ainda continuam ensinando.

Aos amigos Dr. Cléber Soares, Dr<sup>a</sup>. Gracia Rosinha, Renato Henrique, Carlos Ramos, Giselle Bacanelli, Thaís Fagundes e toda equipe do laboratório de Biologia Molecular e Sorologia da EMBRAPA Gado de Corte, Campo Grande – MS, pelo total apoio, suporte e ensinamentos que tornaram possível à execução deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro indispensável e ao Curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias por ter permitido a execução deste trabalho.

A minha namorada Caroline pelo apoio, paciência, dedicação e sobre tudo o amor a mim dedicado que possibilitou o nosso sucesso nesta etapa da vida, sem você não seria possível!

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente na execução desta tese.

**MEU MUITO OBRIGADO!**

## BIOGRAFIA

**Daniel da Silva Guedes Junior**, filho de Daniel da Silva Guedes e Janete da Silva Guedes, nasceu em 20 de novembro de 1977, na cidade do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro (RJ), onde cursou o ensino fundamental na Escola Municipal Goiás, ensino médio no Colégio Estadual Visconde de Cairú, concluído em 1994.

No ano de 1998, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), colando grau e obtendo o título de Médico Veterinário em 30 de setembro de 2003.

Durante o período acadêmico realizou estágios na área de Anatomia Animal, Fisiologia Animal e Bacteriologia. Participou ativamente do Projeto Pé na Estrada onde teve a oportunidade de vivenciar a importância da Medicina Veterinária para a população carente dos arredores do *campus* da Universidade. Participou também do Projeto de Controle de Natalidade da População Canina e Felina, incluindo as práticas clínica, cirúrgica e orientação da população quanto à bem estar animal. Foi Bolsista de Iniciação Científica pelo CNPq, de abril de 2001 a agosto de 2003, participando de projetos de Pesquisa no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, onde também foi Bolsista de Aperfeiçoamento Científico do CNPq, de outubro de 2003 a fevereiro de 2004.

Em maio de 2004 foi aprovado no concurso Público para professor substituto das disciplinas Patologia Clínica e Terapêutica Clínica do Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária do Instituto de Veterinária da UFRRJ.

Em março de 2004 ingressou no Curso de Pós Graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ – Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, em nível de Mestrado, onde foi bolsista da CAPES entre março de 2004 até o presente momento. E, nesta data, apresenta e defende esta dissertação como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.



## RESUMO

GUEDES JR, Daniel da Silva. Caracterização genotípica de *Borrelia* sp e de genes de *Anaplasma marginale* que codificam proteínas de membrana com potencial imunogênico. 2010. 100p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

A distribuição geográfica da borreliose bovina é determinada pela dispersão do seu vetor. *Borrelia theileri* é a espécie predominante em bovinos, sendo que *B. burgdorferi* e *B. coriaceae* também foram relatadas causando doença clínica. Portanto, *B. theileri* causa doença leve em bovinos, e ainda é importante pelo seu potencial em ser confundido com a espiroqueta da Doença de Lyme, *B. burgdorferi*, e com agentes do Aborto Epizootico bovino, *B. coriaceae*. No Brasil, assim como em outros países Sul americanos, o agente desta enfermidade ainda não foi isolado prejudicando ainda mais o diagnóstico. O objetivo deste trabalho foi à identificação genotípica da espécie de *Borrelia* sp que acomete bovinos no Brasil. Foram utilizados para extração de DNA, o sangue e carrapatos de bovinos com sorologia positiva ao ELISA indireto com antígeno bruto para *Borrelia burgdorferi*. Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para genes dos grupos *Borrelia burgdorferi* e *B. theileri*: *16S*, *flaA*, *flaB*, *groel*, *hbb*, *recA*, *5s-23s*, *p66*, *rrs*, *rpob* e *glpQ*. Após a reação de PCR, somente os oligonucleotídeos iniciadores *rrs* e *rpob* amplificaram seqüências. A seqüência preditiva de aminoácidos de RRS3 revelou homologia de 99% com *B. hermsii* e *B. duttonii* e a seqüência preditiva de aminoácidos de RPOB demonstrou 67% de homologia com *B. duttonii* e *B. recurrentis*. Isto sugere que a espécie de *Borrelia* presente no Brasil não seja pertencente ao grupo de *B. burgdorferi*.

Pouco se sabe sobre a variabilidade genética dos genes que codificam proteínas de membrana de isolados brasileiros de *A. marginale*. O produto destes genes constitui uma ferramenta importante, pois pode haver polimorfismo antigênico, que pode prejudicar a proteção cruzada entre os isolados e as chances de identificação de candidatos a imunógenos. O objetivo do presente estudo foi determinar o grau de conservação das seqüências destes genes em um isolado brasileiro de *A. marginale* frente aos isolados Saint Maries, Florida e *A. marginale centrale*. Para tanto, oligonucleotídeos foram desenhados para amplificar os genes *omp1*, *omp4*, *omp5*, *omp7*, *omp8*, *omp10*, *omp14*, *omp15*, *sodb*, *opag1*, *opag3*, *virb3*, *am097* (*VirB9-1*), *am956* (*PepA*), *am254* (*ef-tu*), *am854* por PCR. Os genes foram então seqüenciados pelo método de Sanger e as seqüências preditas de aminoácidos alinhadas e a homologia analisada através do programa CLUSTAL W. Com exceção de OMP 7 todas as demais (OMP1, OMP4, OMP5, OMP8, OMP10, OMP14, OMP15, SODB, OPAG1, OPAG3, VIRB3, VIRB9-1, PepA, EF-Tu, AM854) apresentaram níveis de homologia de 92 a 100% entre os isolados de *A. marginale*. Destas, apenas OMP1, OMP5, EF-Tu, VirB3, SODB, VIRB9-1 e AM854 apresentaram homologia superior a 72% em relação a *A. marginale centrale*, o qual confere proteção cruzada contra *A. marginale*.

**Palavras chave:** *A. marginale*, proteínas de membrana, *Borrelia* sp.

## ABSTRACT

GUEDES JR, Daniel da Silva. Caracterização genotípica de *Borrelia* sp e de genes de *Anaplasma marginale* que codificam proteínas de membrana com potencial imunogênico **Genetic characterization of *Borrelia* sp and membrane protein genes of *Anaplasma marginale* with immunogenic potential.** 2010. 100p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

The geographic distribution of bovine borreliosis is determined by the dispersion of its vector. *Borrelia theileri* is the predominant species in cattle, and *B. coriaceae* and *B. burgdorferi* also been reported causing clinical disease. *B. theileri* cause mild disease in cattle, and still is important for its potential to be confused with the spirochete of Lyme disease, *B. burgdorferi*, and agents of epizootic bovine abortion, *B. coriaceae*. In Brazil, as well as in other South American countries, the agent of this disease has not been isolated further confusing the diagnosis. The objective of this study was to identify genotypically *Borrelia* sp that affects cattle in Brazil. DNA extraction, was performed from blood and ticks of cattle with positive serology by indirect ELISA with crude antigen of *Borrelia burgdorferi*. Primers were designed for genes of *Borrelia burgdorferi* and *B. theileri* groups: *16S*, *flaA*, *flaB*, *GroEL*, *hbb*, *recA*, *5s-23s*, *p66*, *rrs*, *rpoB* and *glpQ*. After the PCR reaction, only the primers amplified *rrs* and *rpoB* sequences. The predictive amino acid sequence of RRS3 revealed 99% homology with *B. hermsii* and *B. duttonii* and predictive amino acid sequence of RPOB showed 67% homology with *B. duttonii* and *B. recurrentis*. This suggests that the species of *Borrelia* sp present in Brazil is not owned by group *B. burgdorferi*.

Little is known regarding the genetic variability of genes that encode membrane proteins of Brazilian isolates of *A. marginale*. The products of these genes constitute an important tool, as there may be significant antigen polymorphism, which may damage cross-protection between isolates and the chances of identifying candidate immunogens. The aim of the present study was to determine the degree of conservation of sequences of these genes in a Brazilian isolate of *A. marginale* comparing with Saint Maries and Florida isolates. For this, primers were designed to amplify the genes *omp1*, *omp4*, *omp5*, *omp7*, *omp8*, *omp10*, *omp14*, *omp15*, *sodb*, *opag1*, *opag3*, *virb3*, *am097 (VirB9-1)*, *am956 (PepA)*, *am254 (ef-tu)*, *am854* by PCR. The genes were then sequenced by Sanger method and the predicted amino acid sequences aligned and homology analyzed by the program CLUSTAL W. With the exception of OMP 7 all proteins (OMP1, OMP4, OMP5, OMP8, OMP10, OMP14, OMP15, SODB, OPAG1, OPAG3, VIRB3, VIRB9-1, PepA, EF-Tu, AM854) exhibited homology greater than 92% with other *A. marginale* isolates. However, only OMP1, OMP5, EF-Tu, VirB3, SODB, VIRB9-1 e AM854 showed homology greater than 72% regarding to *A. marginale centrale* which confers cross-protection against *A. marginale*.

**Key words:** *A. marginale*, membrane protein, *Borrelia* sp.

<b>SUMÁRIO</b>	
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Borrelia</i> sp	1
1.2 <i>Anaplasma marginale</i>	2
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 REVISÃO DE LITERATURA – <i>Borrelia</i> sp	5
2.1.1 Taxonomia <i>Borrelia</i> sp	5
2.1.2 Aspectos gerais do genoma	7
2.2 REVISÃO DE LITERATURA – <i>Anaplasma marginale</i>	13
2.2.1 Taxonomia	13
2.2.2 Transmissão	13
2.2.3 Controle de <i>A. marginale</i>	14
2.2.4 Imunidade contra <i>A. marginale</i>	15
2.2.5 Proteínas de superfície principais (MSPs)	17
2.2.6 MSP1	18
2.2.7 MSP2	19
2.2.8 Proteínas externas de membrana (OMPs)	22
2.2.9 Aspectos gerais do genoma	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Pesquisa de anticorpos homólogos a <i>Borrelia burgdorferi</i> por ELISA indireto	27
3.2 Obtenção dos controles negativos para ELISA indireto de <i>B. burgdorferi</i>	27
3.3 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) indireto para anticorpos homólogos a <i>B. burgdorferi</i>	27
3.4 Determinação da linha de corte (cut-off) dos ELISAs para anticorpos homólogos <i>B. burgdorferi</i> .	28
3.5 Biologia molecular	28
3.6 Isolado de <i>A. marginale</i> e <i>Borrelia</i> sp	28
3.7 Extração de DNA total	29
3.8 Oligonucleotídeos iniciadores para detecção de <i>Borrelia</i> sp	29
3.9 Oligonucleotídeos iniciadores para detecção de <i>A. marginale</i>	31
3.10 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	32
3.11 Clonagem dos fragmentos amplificados por PCR	34

3.11.1 Ligação	34
3.11.2 Transformação	34
3.12 PCR de colônia	35
3.13 Pré-inóculo e Mini-preparação de plasmídios	35
3.14 PCR dos plasmídios contendo insertos	35
3.15 Sequenciamento dos plasmídios	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 <i>Borrelia</i> sp	37
4.2 <i>A. marginale</i>	45
5 CONCLUSÕES	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
7 ANEXOS	73
Anexo A - Extração de DNA carrapatos	75
ANEXO B - Artigo enviado para revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz	76

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	
<b>Figura 1</b> - Árvore filogenética derivada da análise do alinhamento de seqüências do gene 16S rDNA de 27 espécies de <i>Borrelia</i> (SCOLES et al., 2001).	8
<b>Figura 2</b> - Árvore filogenética derivada da análise do alinhamento de seqüências do gene flagelina de 13 espécies de <i>Borrelia</i> (SCOLES et al., 2001).	9
<b>Figura 3</b> - Árvore filogenética construída pelo método neighbor-joining baseada em sequencias do gene 16S rRNA de diferentes espécies da ordem <i>Spirochetales</i> (GIL et al., 2005).	11
<b>Figura 4</b> - Árvore filogenética construída pelo método neighbor-joining baseada em sequencias do gene <i>groEL</i> de diferentes espécies da ordem <i>Spirochetales</i> (GIL et al., 2005).	12
<b>Figura 5</b> - Figura esquemática da PCR de padronização realizada para todos os oligonucleotídeos iniciadores desenhados, para escolha da temperatura de anelamento que fornece o melhor padrão de amplificação dos DNAs controle positivo. Gel de agarose 1% corado com Sybr Green <sup>®</sup> . As amostras estão dispostas no gel da esquerda para direita a partir do gel superior na seguinte ordem contínua nas temperaturas 55, 57, 59, 61, 63° C: coluna 1 marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder <sup>®</sup> (Invitrogen); colunas 2 a 6 controle positivo ( <i>B. burgdorferi</i> ) <i>rrs1</i> (664 pb); coluna 7 a 11 controle positivo ( <i>B. anserina</i> ) <i>rrs1</i> (664 pb); coluna 12 a 16 controle positivo ( <i>B. burgdorferi</i> ) <i>rrs4</i> (511 pb); coluna 17 marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder <sup>®</sup> (Invitrogen)coluna 18 a 22 controle positivo ( <i>B. anserina</i> ) <i>rrs4</i> (511 pb); coluna 23 a 27 controle positivo ( <i>B. burgdorferi</i> ) <i>rrs5</i> (541 pb); coluna 28 a 32 controle positivo ( <i>B. anserina</i> ) <i>rrs5</i> (541 pb).	33
<b>Figura 6</b> - Marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder <sup>®</sup> - Invitrogen.	33
<b>Figura 7</b> - Representação esquemática do plasmídeo pGEM <sup>®</sup> -T Easy utilizado para a clonagem dos fragmentos de DNA amplificados por PCR.	34
<b>Figura 8</b> - Gel de agarose 1% relativo aos produtos de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores <i>rrs1</i> (664pb) e <i>rrs3</i> (365 pb) corado com Sybr green <sup>®</sup> (Invitrogen). As amostras estão dispostas no gel da esquerda para direita na seguinte ordem: coluna 1 marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder <sup>®</sup> (Invitrogen); coluna 2 controle negativo da PCR <i>rrs1</i> ; coluna 3 Controle positivo <i>rrs1</i> ; coluna 4 DNA <i>R. (Boophilus) microplus</i> vaca Tieta; coluna 5 controle negativo da PCR <i>rrs3</i> ; coluna 6 controle positivo <i>rrs3</i> ; colunas 7 a 10 DNA sangue bovinos Floresta, Vitória, Bezerro Chita e Tieta.	38
<b>Figura 9</b> - Gel de agarose 1% relativo aos produtos de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores <i>rpoBX</i> (370pb) corado com Sybr Green <sup>®</sup> (Invitrogen). As amostras estão dispostas no gel da esquerda para direita na seguinte ordem: coluna 1 marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder <sup>®</sup> (Invitrogen); coluna 2 Controle positivo <i>rpoB</i> ; coluna 3 extração DNA sangue bovino Tieta; coluna 4 extração DNA sangue bovino Floresta; coluna 5 extração DNA sangue bovino Vitória; colunas 6 extração DNA sangue bovino n° 69; coluna 6 controle negativo de reação.	39
<b>Figura 10</b> - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de fragmento de RRS de isolado proveniente de bovino (B_Brasil) sorologicamente reativo à <i>B. burgdorferi</i> comparado às seqüências de espécies de <i>Borrelia</i> do grupo <i>B. burgdorferi</i> e febre recorrente, disponíveis no Genbank ( <i>B. garinii</i> , <i>B. burgdorferi</i> , <i>B. afzelli</i> , <i>B. hermsii</i> , <i>B. recurrentis</i> , <i>B. turicatae</i> , <i>B. duttonii</i> , <i>B. theileri</i> ).	39

<b>Figura 11</b> - Árvore filogenética obtida através do método neighbor-joining contendo as seqüências de fragmentos de RRS de espécies de <i>Borrelia do grupo B. burgdorferi</i> e febre recorrente disponíveis no Genbank e a seqüência preditiva de aminoácidos de <i>Borrelia</i> isolado Brasileiro (B Brasil), amplificados a partir do oligonucleotídeo iniciador <i>rrs3</i> (112 aminoácidos) DNA proveniente de bovino sorologicamente reativo à <i>B. burgdorferi</i> . Os números nos nós indicam os valores de bootstrap para 1000 réplicas.	41
<b>Figura 12</b> - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de fragmento de RPOB de isolado proveniente de bovino (B_Brasil) sorologicamente reativo à <i>B. burgdorferi</i> comparado às seqüências de espécies de <i>Borrelia do grupo B. burgdorferi</i> e febre recorrente, disponíveis no Genbank ( <i>B. garinii</i> , <i>B. burgdorferi</i> , <i>B. afzelli</i> , <i>B. hermsii</i> , <i>B. recurrentis</i> , <i>B. turicatae</i> , <i>B. duttonii</i> , <i>B. theileri</i> ).	42
<b>Figura 13</b> - Árvore filogenética obtida através do método neighbor-joining contendo as seqüências de fragmentos de RPOB de espécies de <i>Borrelia do grupo B. burgdorferi</i> e febre recorrente disponíveis no Genbank e a seqüência preditiva de aminoácidos de <i>Borrelia</i> isolado Brasileiro (B Brasil), amplificados a partir do oligonucleotídeo iniciador <i>rrs3</i> (112 aminoácidos) DNA proveniente de bovino sorologicamente reativo à <i>B. burgdorferi</i> . Os números nos nós indicam os valores de bootstrap para 1000 réplicas.	45
<b>Figura 14</b> - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de OPAG1, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.	46
<b>Figura 15</b> - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de OPAG3, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.	47
<b>Figura 16</b> - Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína OPAG3 dos isolados de <i>A. marginale</i> AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.	47
<b>Figura 17</b> - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de OMP1, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.	48
<b>Figura 18</b> - Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína OMP1 dos isolados de <i>A. marginale</i> AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.	48
<b>Figura 19</b> - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de OMP4, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.	49
<b>Figura 20</b> - Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína OMP4 dos isolados de <i>A. marginale</i> AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.	49
<b>Figura 21</b> - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de OMP5, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.	50
<b>Figura 22</b> - Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína OMP5 dos isolados de <i>A. marginale</i> AMBR,	50

AMSM, AMFL, AMCE.	
<b>Figura 23</b> - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de OMP7, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.	51
<b>Figura 24</b> – Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína OMP7 dos isolados de <i>A. marginale</i> AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.	51
<b>Figura 25</b> - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de OMP8, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.	52
<b>Figura 26</b> – Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína OMP8 dos isolados de <i>A. marginale</i> AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.	52
<b>Figura 27</b> - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de OMP10, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.	53
<b>Figura 28</b> – Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína OMP10 dos isolados de <i>A. marginale</i> AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.	53
<b>Figura 29</b> - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de OMP14, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.	54
<b>Figura 30</b> – Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína OMP14 dos isolados de <i>A. marginale</i> AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.	54
<b>Figura 31</b> - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de OMP15, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.	55
<b>Figura 32</b> - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de PEPA, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.	56
<b>Figura 33</b> – Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína PEPA dos isolados de <i>A. marginale</i> AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.	57
<b>Figura 34</b> - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de EF-Tu, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.	58
<b>Figura 35</b> – Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína EF-Tu dos isolados de <i>A. marginale</i> AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.	58
<b>Figura 36</b> - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de SODB, demonstrando	59

homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.	
<b>Figura 37</b> – Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína SODB dos isolados de <i>A. marginale</i> AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.	59
<b>Figura 38</b> - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de VIRB9-1, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.	60
<b>Figura 39</b> – Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína VIRB9-1 dos isolados de <i>A. marginale</i> AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.	60
<b>Figura 40</b> - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de VIRB 3, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.	61
<b>Figura 41</b> – Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína VIRB 3 dos isolados de <i>A. marginale</i> AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.	61
<b>Figura 42</b> - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de AM854, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.	62
<b>Figura 43</b> – Fig.1. Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína AM854 dos isolados de <i>A. marginale</i> AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.	62



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Seqüências de oligonucleotídeos iniciadores (O.I.), tamanho do produto amplificado, temperatura de anelamento (TA) e região do genoma de <i>B. burgdorferi</i> B31.	29
<b>Tabela 2:</b> Seqüências de oligonucleotídeos iniciadores (O.I.), tamanho do produto amplificado, temperatura de anelamento (T.A.) e região do genoma de <i>B. burgdorferi</i> amplificado. Seqüências de oligonucleotídeos iniciadores baseados principalmente no genoma completo de <i>Borrelia hermsii</i> DAH (referência no genbank 314723) (grupo <i>B. burgdorferi</i> bactérias incultiváveis). O O.I. <i>p66 4</i> refere-se ao genoma completo de <i>B. recurrentis</i> (referência no genbank 412418), e os O.I. <i>p66 5</i> , <i>glpq2</i> e <i>glpq3</i> baseiam-se no genoma de <i>B. turicatae</i> (referência no genbank 314724).	30
<b>Tabela 3:</b> Seqüência de oligonucleotídeo iniciador utilizado para amplificação parcial do gene <i>rpoB</i> nos estudos de LEE et al. (2000), região correspondente ao genoma completo de <i>B. burgdorferi</i> ZS7 (referência no genbank 445985).	31
<b>Tabela 4:</b> Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos genes de <i>A. marginale</i> primers confeccionados utilizando as seqüências do genoma disponíveis no GenBank do isolado Saint Maries (referência no genbank 234826).	31
<b>Tabela 5:</b> Porcentual de homologia determinado entre a seqüência preditiva de aminoácidos de um fragmento de RRS (112 aas) amplificado a partir de amostra de DNA de sangue de bovino com sorologia positiva para <i>B. burgdorferi</i> comparado às seqüências de espécies de <i>Borrelia</i> do grupo <i>B. burgdorferi</i> e febre recorrente. Dados gerados a partir do programa CLUSTAL W.	40
<b>Tabela 6:</b> Porcentual de homologia determinado a partir da comparação entre as seqüências preditivas de aminoácidos de um fragmento de RRS das espécies de <i>Borrelia</i> do grupo <i>B. burgdorferi</i> e febre recorrente ( <i>B. garinii</i> , <i>B. burgdorferi</i> , <i>B. afzelli</i> , <i>B. hermsii</i> , <i>B. recurrentis</i> , <i>B. turicatae</i> , <i>B. duttonii</i> , <i>B. theileri</i> ). Dados gerados a partir do programa CLUSTAL W.	40
<b>Tabela 7:</b> Porcentual de homologia determinado entre a seqüência preditiva de aminoácidos de um fragmento de RPOB (123 aas) amplificado a partir de amostra de DNA de sangue de bovino com sorologia positiva para <i>B. burgdorferi</i> comparado às seqüências de espécies de <i>Borrelia</i> do grupo <i>B. burgdorferi</i> e febre recorrente. Dados gerados a partir do programa CLUSTAL W.	42
<b>Tabela 8:</b> Porcentual de homologia determinado a partir da comparação entre as seqüências preditivas de aminoácidos de um fragmento de RPOB (123 aas) das espécies de <i>Borrelia</i> do grupo <i>B. burgdorferi</i> e febre recorrente ( <i>B. garinii</i> , <i>B. burgdorferi</i> , <i>B. afzelli</i> , <i>B. hermsii</i> , <i>B. recurrentis</i> , <i>B. turicatae</i> , <i>B. duttonii</i> , <i>B. theileri</i> ). Dados gerados a partir do programa CLUSTAL W.	43
<b>Tabela 9:</b> Homologia apresentada pelas seqüências de aminoácidos do isolado brasileiro de <i>A. marginale</i> com as seqüências AMSM, AMFL e AMCE.	45

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Borrelia* sp

Nas últimas décadas fatores econômicos, demográficos, sociais e ambientais têm contribuído para emergência de doenças infecciosas. Estes patógenos emergentes correspondem a agentes infecciosos que são responsáveis por doenças as quais têm aumentado nos últimos 20 anos ou a incidência irá provavelmente ser potencializada em um futuro próximo. O diagnóstico de patógenos infecciosos foi uma das principais prioridades anunciada pelos centros de controle e prevenção de doenças e a Organização Mundial de Saúde (BERKELMAN apud RENESTO et al., 2000).

Atualmente, existem 13 genoespécies de *Borrelia* globalmente descritas e reconhecidas incluindo *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bissettii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. andersonii*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. japonica*, *B. spielmanii*, *B. sinica* e recentemente reconhecida *Borrelia californiensis* (RUDENKO et al., 2009).

O gênero *Borrelia* foi classificado usando 16S RNAr e *flaB* em dois grupos principais: Doença de Lyme e febre recorrente (LIN et al., 2003). Este último inclui espécies responsáveis pela febre recorrente em humanos na América (*B. Hermsii*, *B. Parkeri* e *B. Turicatae*) e no sul da Europa e da África (*B. duttonii*, *B. hispanica* e *B. crocidurae*). Os principais vetores das espécies do grupo da febre recorrente são os carrapatos moles da família *Argasidae*, enquanto que o piolho humano (*pediculus humanus*) transmite *B. recurrentis*. Porém, outras espécies de *Borrelia* transmitidas por carrapatos da família *Ixodidae* foram classificadas como mais próximas do grupo Febre recorrente *B. lonestari* e *B. miyamotoi* (GIL et al., 2005).

A distribuição geográfica da borreliose é universal, porém a bactéria ainda não foi isolada na América do Sul, África e Austrália (YOSHINARI e MANTOVANI, 2006). Atualmente, sabe-se que a borreliose de Lyme é uma zoonose transmitida por carrapatos infectados com diferentes microorganismos do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato, constituído por três espécies de espiroquetas: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (Estados Unidos, Eurásia), *Borrelia afzelii* e *Borrelia garinii* encontradas na Europa. Esta diversidade etiológica, explica a existência de variabilidade clínica, como o predomínio de queixas cutâneas e articulares nos Estados Unidos, e das neurológicas na Europa e Ásia (STEERE, 2001).

Até o último levantamento da casuística brasileira realizado em 2000, haviam sido publicados 73 casos diagnosticados no Brasil, permitindo o delineamento do perfil epidemiológico, clínico e sorológico da Doença de Lyme no país. Outras centenas de casos oriundos de praticamente todas as regiões geográficas do país já foram diagnosticados (YOSHINARI e MANTOVANI, 2006).

Yoshinari e Mantovani (2006), definiram os conceitos básicos da ocorrência clínica da Doença de Lyme e suas variantes em diferentes regiões do mundo. A Doença de Lyme clássica de ocorrência no Hemisfério Norte é entendida como enfermidade infecciosa causada por *B. burgdorferi* sensu lato, transmitido por carrapatos do complexo *Ixodes ricinus*, que inclui *I. dammini* e *I. pacificus* nos EUA, *I. ricinus* na Europa e *I. persulcatus* no leste europeu e Ásia.

A Doença de Lyme símile americana ou doença de Masters, encontrada no Sul dos Estados Unidos, é uma doença infecciosa causada pela *B. lonestari*, geneticamente semelhante a espiroqueta bovina *B. theileri*, incultiváveis em meio BSK e transmitidas por carrapatos do gênero *Amblyomma*, que causam lesão isolada de pele semelhante ao eritema migrans (YOSHINARI e MANTOVANI, 2006).

A Síndrome infecto-reacional Lyme-símile presente no Brasil, definida como doença infecciosa emergente transmitida por carrapatos do gênero *Amblyomma*, causada por múltiplos microorganismos de comportamento latente, que causam manifestações clínicas semelhantes às observadas na Doença de Lyme (YOSHINARI e MANTOVANI, 2006).

A necessidade para a caracterização rápida e específica destes agentes infecciosos estimulou o desenvolvimento de novos testes moleculares biológicos, onde a reação da polimerase em cadeia (PCR) é a principal técnica para detecção e identificação de genes de agentes infecciosos (RENESTO et al., 2000).

O objetivo deste estudo foi à caracterização genotípica de *Borrelia* sp a partir de sangue e carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de animais sorologicamente positivos através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), para identificação da espécie de *Borrelia* presente em bovinos no Brasil.

## 1.2 *Anaplasma marginale*

*Anaplasma marginale* é uma riquetsia transmitida por carrapatos que causa anaplasmose em bovinos e outros ruminantes. São organismos intracelulares obrigatórios sendo encontrados exclusivamente dentro de vacúolos envoltos por membranas no citoplasma de eritrócitos de hospedeiros (DUMLER et al., 2001). Infectam mamíferos ou aves, e replicam-se em vacúolos parasitóforos, na membrana do citoplasma de células da medula óssea ou de origem hematopoiéticas. Os membros da família Anaplasmataceae compartilham cápsulas comuns; então, acredita-se que estes organismos se ligam às células dos hospedeiros via proteínas externas de membrana e não por fagocitose, mas dependem da atividade da transglutaminase, o qual é requerida para endocitose receptor-mediada (RIKIHISA, 2003).

*A. marginale* ocorre em regiões tropicais e subtropicais do mundo (RIDING et al., 2003), sendo transmitido principalmente por carrapatos ixodídeos (KOCAN et al., 2003; RIKIHISA, 2003). Mais de 20 espécies de carrapato foram citadas como vetores biológicos (DIKMANS, 1950), sendo que no Brasil, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o único vetor biológico identificado (KESSLER e SCHENK, 1998).

A riquetsemia da anaplasmose pode variar amplamente em animais cronicamente infectados (ERIKS et al., 1989), refletindo no ciclo de multiplicação da riquetsia, com a emergência de variantes antigênicas não reconhecidas pelo sistema imune hospedeiro (KIESER et al., 1990). Os eritrócitos infectados são fagocitados por macrófagos, principalmente no baço, resultando em anemia de branda a severa, e icterícia sem ocorrência de hemoglobinemia ou hemoglobinúria. Os sinais clínicos incluem febre, perda de peso, aborto, letargia e morte, principalmente em animais acima de dois anos (KOCAN et al., 2003). Os animais que sobrevivem a esta fase permanecem persistentemente infectados, com baixas riquetsemias cíclicas, não detectáveis microscopicamente, servindo como reservatórios para transmissão por carrapatos (KIESER et al., 1990; ERIKS et al., 1993).

Ainda não se conhece completamente, como os níveis flutuantes de patógenos podem influenciar a capacidade dos animais infectados cronicamente servirem como reservatório para transmissão a vetores, assim como, os números de patógenos presentes nestes carrapatos infectados. Se os níveis de riquetsemia dos bovinos se mantiverem baixos durante muito tempo resultando em transmissão ineficiente aos carrapatos, a importância dos animais como reservatório será pequena. Entretanto, se os bovinos forem capazes de manter eficientemente a transmissão para os carrapatos, então, o controle deve ser concentrado nos animais cronicamente infectados (ERIKS et al., 1993).

As medidas de controle da anaplasmose variam de acordo com a localização geográfica e incluem principalmente três formas. A primeira trata-se da redução da população de vetores através do uso de acaricidas, que não é prático em algumas áreas e, previne

parcialmente contra a transmissão, pois esta pode ocorrer tanto pelo vetor biológico, quanto mecanicamente pelos insetos hematófagos e fômites contaminados. A administração de antibióticos como as tetraciclínas, é a medida preventiva mais freqüentemente utilizada nos Estados Unidos, sendo dispendiosa e ainda há o risco de seleção de isolados resistentes. A vacinação é uma medida de controle econômica e efetiva que pode ser dividida em dois tipos principais: Vacinas vivas e mortas. Ambas são capazes de conferir imunidade protetora aos animais, reduzindo ou prevenindo casos clínicos da doença, porém, não evita que os animais se tornem cronicamente infectados, servindo como reservatório de *Anaplasma*, e fonte de infecção para vetores, contribuindo para a disseminação da doença (KOOCAN et al., 2003c).

As vacinas vivas produzidas a partir de eritrócitos infectados de animais portadores, devem ser conservadas refrigeradas ou congeladas, o que constitui uma desvantagem, além do curto prazo de validade. Por conterem organismos vivos, constituem potencial risco para o desenvolvimento de doença clínica em animais adultos e vacas prenhes, e de transmissão de outros patógenos veiculados pelo sangue dos animais doadores, no caso da premonição (KESSLER e SCHENK, 1998).

As vacinas mortas derivadas de culturas de células de embriões de carrapato, são as mais novas opções para a prevenção da anaplasiose. O desenvolvimento do ciclo em cultura de células acontece similarmente ao que ocorre em carrapatos naturalmente infectados (KOOCAN et al., 2003 C). As seis MSPs encontradas em isolados de eritrócitos demonstraram estar conservados em isolados de cultura de células e as composição antigênica se manteve a mesma após sucessivas passagens (BARBET et al., 1999).

O sucesso de novas vacinas para anaplasiose usando tecnologias moleculares dependerá da capacidade em mimetizar ou redirecionar a resposta hospedeira durante infecções naturais ou bloqueio da infecção de células hospedeiras (KOOCAN et al., 2003 C).

O sequenciamento do genoma completo de *A. marginale* isolado Saint Maries, propiciou a determinação do tamanho de 1.197.687 pares de base e conteúdo de 49% Guanina e Citosina, possibilitando ainda saber que este genoma codifica 949 seqüências preditivas e a identificação de 62 genes que codificam proteínas de membrana anteriormente desconhecidas pela comunidade científica. Destas, 49 pertencem à superfamília *mSP1* ou *mSP2*. Dessa forma, pelo menos 13 seqüências codantes foram atribuídas como OMPs (proteínas externas de membrana) por identidade a outras previamente definidas e não estão contidos nestas superfamílias. Também foram identificados 15 genes que apresentaram identidade às superfamílias *mSP2-4* denominados *omp 1-15* (BRAYTON et al., 2005). 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 (RAMOS et al., 2007).

O sequenciamento do genoma completo de *A. marginale centrale* por Herndom et al. (2009) permitiu a comparação entre os genomas de *A. marginale* e foi possível perceber muitas diferenças entre os isolados. O tamanho do genoma de *A. marginale centrale* é maior que o do isolado Saint Maries (1.206.806 pares de base), possuindo 925 seqüências codantes preditas, o que é inferior ao isolado Saint Maries, 19 pseudogenes e 37 Rna transportadores. Possui 10 genes que não estão presentes nos isolados americanos e não apresenta 18 genes presentes nestes isolados. Como a imunidade contra *A. marginale* pode ser induzida pela imunização com complexos de proteína externa de membrana purificada (NOH et al., 2006), as OMPs conservadas entre os isolados americanos e *A. marginale centrale* devem ser os melhores candidatos a antígenos vacinais (HERNDOM et al., 2009).

Com o sequenciamento dos isolados de *A. marginale* isolado Saint Maries, Flórida e *A. marginale centrale* torna-se importante o conhecimento do genoma do isolado brasileiro, ou pelo menos dos genes que codificam proteínas de membrana destes isolados em relação ao presente no Brasil, para que sejam avaliados candidatos a antígenos vacinais capazes de produzir imunidade impedindo ou minimizando os prejuízos relacionados à doença clínica.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a conservação de genes que codificam proteínas de membrana do isolado brasileiro Pernambuco – Zona da Mata de *A. marginale* e comparar os resultados a a *A. marginale centrale* e *A. marginale* isolados Saint Maries e Flórida, avaliando dessa forma possíveis candidatos a imunógenos comuns entre os isolados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 REVISÃO DE LITERATURA – *Borrelia* sp

#### 2.1.1 Taxonomia *Borrelia* sp

O gênero *Borrelia Swellengrebel, 1907*, foi assim denominado em homenagem a A. Borrel. Os microrganismos deste gênero possuem o formato helicoidal com 3 a 10 espiras e medem de 0,2 a 0,5  $\mu\text{m}$  por 3 a 30  $\mu\text{m}$ . Este organismo tem protoplasma cilíndrico envolto pela membrana celular, da qual partem flagelos, possui externamente outra membrana contendo diversas proteínas de superfície, e não possui túbulos citoplasmáticos (KRIEG & HOLT, 1984, BARBOUR & HAYES, 1986).

Como membro da ordem Spirochaetales, família Spirochaetaceae, estas bactérias distinguem-se morfológicamente dos demais gêneros, desta família, por serem maiores, possuírem maior número de flagelos periplasmáticos (15 a 20) e menor número de espiras (PFISTER *et al.*, 1994, QUINN *et al.*, 1994). *Borrelia* sp são espiroquetídeos simbióticos de carrapatos e piolhos, que podem ser transmitidos a aves e mamíferos, que são normalmente hospedeiros acidentais e atuam como reservatório amplificador. O gênero *Borrelia* é muito pleomórfico e pode ser observado em amostras de sangue e urina animal, hemolinfa e tecidos de carrapatos, cultura *in vitro* entre outros (BENNETT, 1995). Para observação em esfregaço sanguíneo são principalmente utilizados métodos de impregnação por prata, Giemsa e/ou Romanowsky. Em se tratando de amostras de sangue fresco e cultura, o microrganismo pode ser observado em microscopia de campo-escuro ou contraste de fase (QUINN *et al.*, 1994).

A multiplicação de *Borrelia theileri* ocorre predominantemente no carrapato e em menos intensidade no sangue bovino. A maior parte dos estudos sobre *B. theileri* em carrapatos, foram desenvolvidos no *B. microplus*. Somente a fase de ninfa transmite a espiroqueta para o bovino, apesar da transmissão transovariana ocorrer e os espiroquetídeos podem ser encontrados em larvas 72 horas após serem colocadas em bovinos. *B. theileri* também pode ser transmitida pela inoculação de sangue total fresco de bovinos infectados para não infectados (SMITH *et al.*, 1985).

Nos ruminantes, segundo Wells *et al.* (1993), a Borreliose de Lyme promove aumento de volume articular, mialgia, febre, laminite, queda de produção e aborto. Na América do Norte a soroprevalência da Borreliose de Lyme em bovinos assintomáticos pode chegar a 75%, no Japão está em torno de 25%, na Austrália a prevalência não foi avaliada, pois em animais os casos são raros.

YOSHINARI *et al.* (1989), publicaram o primeiro artigo de revisão sobre Borreliose em língua portuguesa, quando alertaram a classe médica sobre a possibilidade da existência desta enfermidade no Brasil. O perfil da Borreliose de Lyme foi caracterizado no Brasil por YOSHINARI *et al.*, (1997), tendo sido relatado a ocorrência de aproximadamente 30 casos em humanos, quando foi discutido a clínica, o diagnóstico sorológico, tratamento e a epidemiologia com o envolvimento de cães, bovinos, animais silvestres e carrapatos.

A distribuição geográfica da borreliose bovina é determinada pela dispersão do seu vetor. *B. theileri* é a espécie predominante em bovinos, sendo que *B. burgdorferi* e *B. coriaceae* também foram relatadas causando doença clínica. Portanto, *B. theileri* causa doença leve em bovinos, e ainda é importante pelo seu potencial em ser confundido com a espiroqueta da Doença de Lyme, *B. burgdorferi*, e com agentes do Aborto Epizoótico bovino, *B. coriaceae*.

*B. theileri*, assume um papel importante porque pode ser transmitida entre bovinos e outros herbívoros sem induzir sinais clínicos de infecção mesmo em bovinos

esplenectomizados (ISHIKAWA, 1996), sendo assim, o diagnóstico de borreliose pode ser complicado especialmente pelas reações cruzadas entre *B. burgdorferi* e *B. theileri* (ROGERS, *et al.*, 1999).

WELLS *et al.* (1993) constataram maior especificidade e sensibilidade do teste ELISA indireto em relação ao teste de Imunofluorescência indireta (IFI). Também observaram que a soropositividade a *B. burgdorferi* pelo teste ELISA, não teve associação com a soropositividade para 6 sorotipos de *Leptospira interrogans*. E constataram que altos títulos de anticorpos contra *B. burgdorferi* associados a sintomas de claudicação.

ROGERS *et al.* (1999) ressaltou a importância de se tomar cuidado na distinção entre as várias espécies que causam doença em bovinos por causa das reações cruzadas relacionadas às provas sorológicas. Este relato foi obtido através de estudo onde bovinos infectados com *B. theileri* produziram anticorpos que reagiram cruzadamente com *B. burgdorferi* e *B. coriaceae* ao teste de imunofluorescência indireta, usando antígenos de células inteiras dos três organismos. A reação cruzada é provavelmente ligada, em parte, a um antígeno flagelar de 41 KDa, comum às espécies, que foi detectado no teste de imunofluorescência indireta.

WELLS *et al.* (1993) relataram a maior sensibilidade e especificidade do ELISA indireto para *B. burgdorferi* comparado a Imunofluorescência indireta em seu estudo em gado de leite. Afirmando ainda que a concordância entre o ELISA e o Western blotting como o desejado para um teste diagnóstico. Entretanto, o último teste não deve ser padrão satisfatório por causa das suas limitações incluindo interpretação, confiabilidade e custo. Tendo ainda falhas no o diagnóstico de doença de Lyme humana e deve ser substituído por outros ensaios no futuro (BERARDI *et al.* 1988).

Estudos conduzidos por FONSECA *et al.* (1996), indicaram que de 513 amostras de soro bovino analisadas pelo teste ELISA indireto 372 (72,51%) apresentaram anticorpos IgG contra *B. burgdorferi* com título entre 1/400 e 1/1600, 141 (27,49%) foram negativos. A maior percentagem de animais soropositivos foi observado no grupo proveniente do município de Alegre, Estado do Espírito Santo. Neste município foi verificado um bezerro com claudicação e outro com aumento de volume da articulação rádio-carpiana ambos da mesma propriedade e com sorologia positiva no teste ELISA. Nesta região também foram identificados casos humanos com suspeita clínica e sorologia positiva (ELISA e “Western blotting”) reforçando a possibilidade de se tratar de uma área de risco para Borreliose de Lyme com chance de ser causada pelo mesmo agente da borreliose em animais.

Teste ELISA indireto realizado em 150 amostras de soros de cães aparentemente saudáveis indicaram que 30 (20%) reagiram positivamente, das quais 20 (13,34%) apresentaram títulos de 1:400, quatro (2,66%) a 1:800 e seis (4,00%) com título de 1:1600; totalizando 120 (80%) amostras negativas (SOARES *et al.*, 2000).

Recentemente, borrelias incultiváveis têm sido incriminadas como potenciais causadores da Doença de Lyme símile (SMITH & ROGERS, 1998). No Brasil, assim como em outros países Sul americanos, o agente desta enfermidade ainda não foi isolado prejudicando ainda mais o diagnóstico (CICERONI *et al.*, 1994). São necessários cuidados na interpretação de resultados sorológicos especialmente no caso de bovinos, que são animais acometidos por outras espécies como *B. theileri* e *B. coriaceae* transmitidas por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Ornithodoros spp*, respectivamente (BENXIU & COLLINS, 1994). O estudo de borrelias potencialmente zoonóticas incluindo *B. theileri*, é, portanto, relevante à saúde de ambos, animais e humanos.

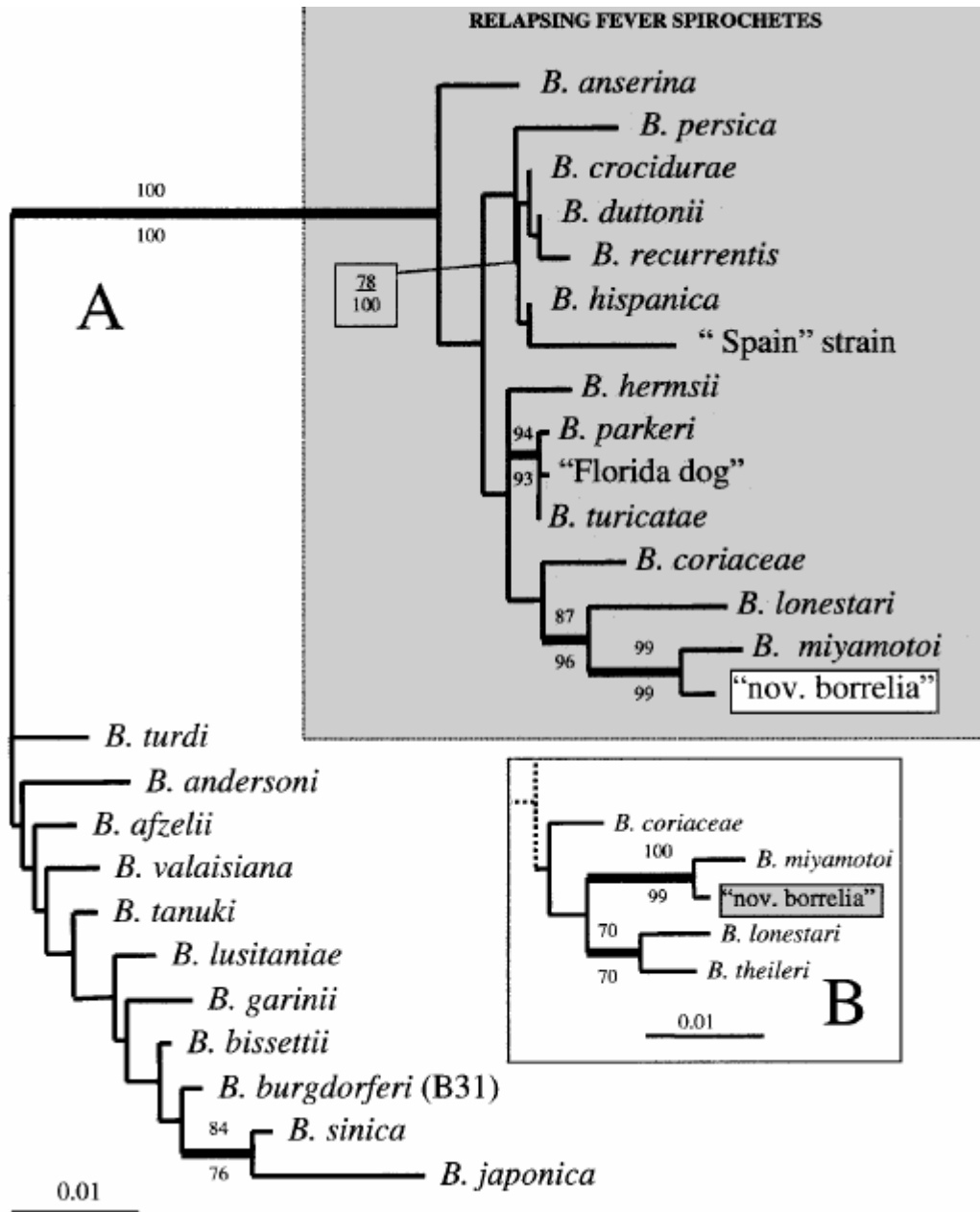
### 2.1.2 Aspectos gerais do genoma

Rich et al., (2001) relataram que dados de filogramas baseados nos genes *fla* e 16S rDNA demonstraram que *B. theileri*, o agente de *Amblyomma*, e *B. miyamotoi* formam um grupo monofilético mais relacionado a dois grupos de espiroquetas transmitidas por argasídeos. Considerando a seqüência de DNA do gene *fla*, estas *Borrelia* spp. formam um grupo irmão monofilético às diversas espiroquetas relacionadas à febre recorrente. O grau de similaridade de seqüências entre o agente de *Amblyomma* e *B. theileri* é similar aquele entre diferentes isolados de *B. hermsii*.

Scoles et al. (2001), fizeram uma reconstrução filogenética baseada nas seqüências 16S rDNA e flagelina. Porém as seqüências de 16S mostraram ser limitadas para estudos filogenéticos, mas permitiu a separação dos taxos de *B. burgdorferi* sensu lato do grupo da febre recorrente. Relataram ainda que a reconstrução baseada na seqüência completa do gene flagelina de todos os taxos de espiroquetas (ainda não disponível), contribuiria para um melhor entendimento da relação sistemática deste grupo de organismos.

As seqüências 16S rDNA não são muito informativas filogeneticamente para os taxos de *Borrelia*, desta forma, a maior parte dos ramos têm pouco respaldo (SCOLES et al., 2001). A reconstrução filogenética realizada pelos mesmos autores mostrou, que o espiroquetídeo se trata de um novo genótipo no gênero *Borrelia* pertencente ao grupo febre recorrente se agrupando com *B. miyamotoi* e *B. lonestari*. Quando esta análise foi repetida com um alinhamento menor (887 pb) para 16S rDNA, *B. theileri* e *B. lonestari* foram agrupadas em algo que parece ser um grupo irmão da linhagem *B. miyamotoi* (Figura 1).



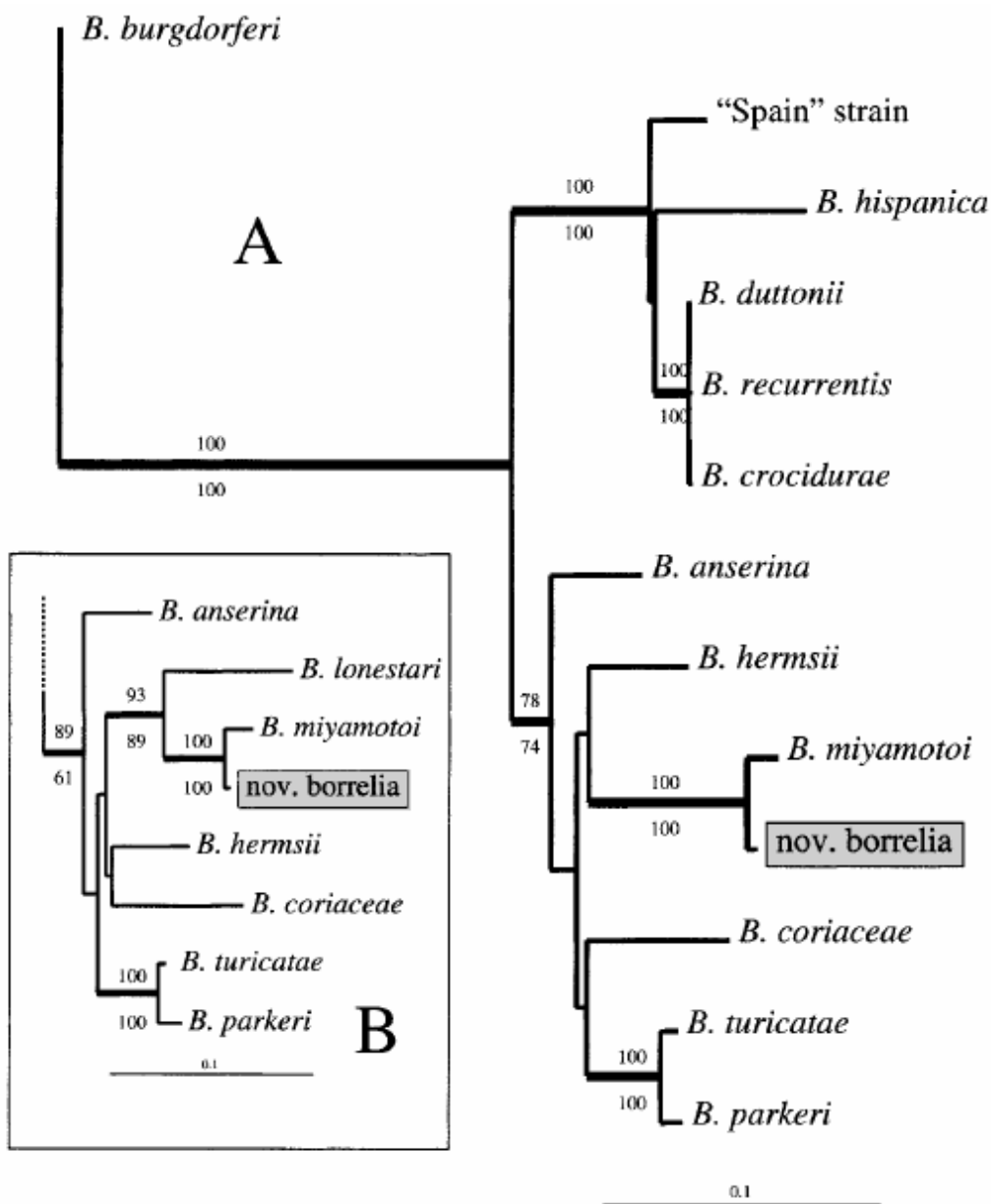


**Figura 1:** Árvore filogenética derivada da análise do alinhamento de seqüências do gene 16S rDNA de 27 espécies de *Borrelia* (SCOLES et al., 2001).

Os estudos de Scoles et al. (2001), indicam que o grupo febre recorrente se divide em duas clades principais, a primeira inclui somente espiroquetas de febre recorrente do velho mundo, e o segundo agrupa espécies do novo mundo com a nova *Borrelia* recentemente descoberto, associado a espécies de *Ixodes*. Esta parece ser mais relacionada a *B. miyamotoi* proveniente de *I. persulcatus* descrita por FUKUNAGA e KOREKI (1995) no Japão. Os estudos de Scoles et al. (2001), indicam que o grupo febre recorrente se divide em duas clades principais, a primeira inclui somente espiroquetas de febre recorrente do velho mundo, e o segundo agrupa espécies do novo mundo com o novo espiroquetídeo recentemente descoberto, associado a espécies de *Ixodes* (Figura 2). Este parece ser mais relacionada a *B.*

*miyamotoi* proveniente de *I. persulcatus* descrita por FUKUNAGA e KOREKI (1995) no Japão.

O sequenciamento do genoma completo e parcial de algumas espécies do grupo *B. burgdorferi* como : *B. burgdorferi* ([AE000783](#)), *B. garinii* ([CP000013](#)) (Glöckner et al., 2004), *B. afzelli* ([CP000395](#)), e grupo febre recorrente: *B. recurrentis* ([CP000993](#)) (LESCOT et al., 2008), *B. duttonii* ([CP000976](#)) (LESCOT et al., 2008), *B. turicatae* ([CP000049](#)), *B. hermsii* ([CP000048](#)), *B. theileri* gene *rpob* (EU164538.1), *B. theileri* gene *rrs* (DQ872186.1) estão norteando os estudos para a identificação de novas espécies de *Borrelia* e ampliando a cada dia o diagnóstico das enfermidades transmitidas por este agente em animais e humanos, fornecendo subsídios para elucidar a epidemiologia das diferentes espécies de borrelia e suas particularidades.



**Figura 2:** Árvore filogenética derivada da análise do alinhamento de seqüências do gene flagelina de 13 espécies de *Borrelia* (SCOLES et al., 2001).

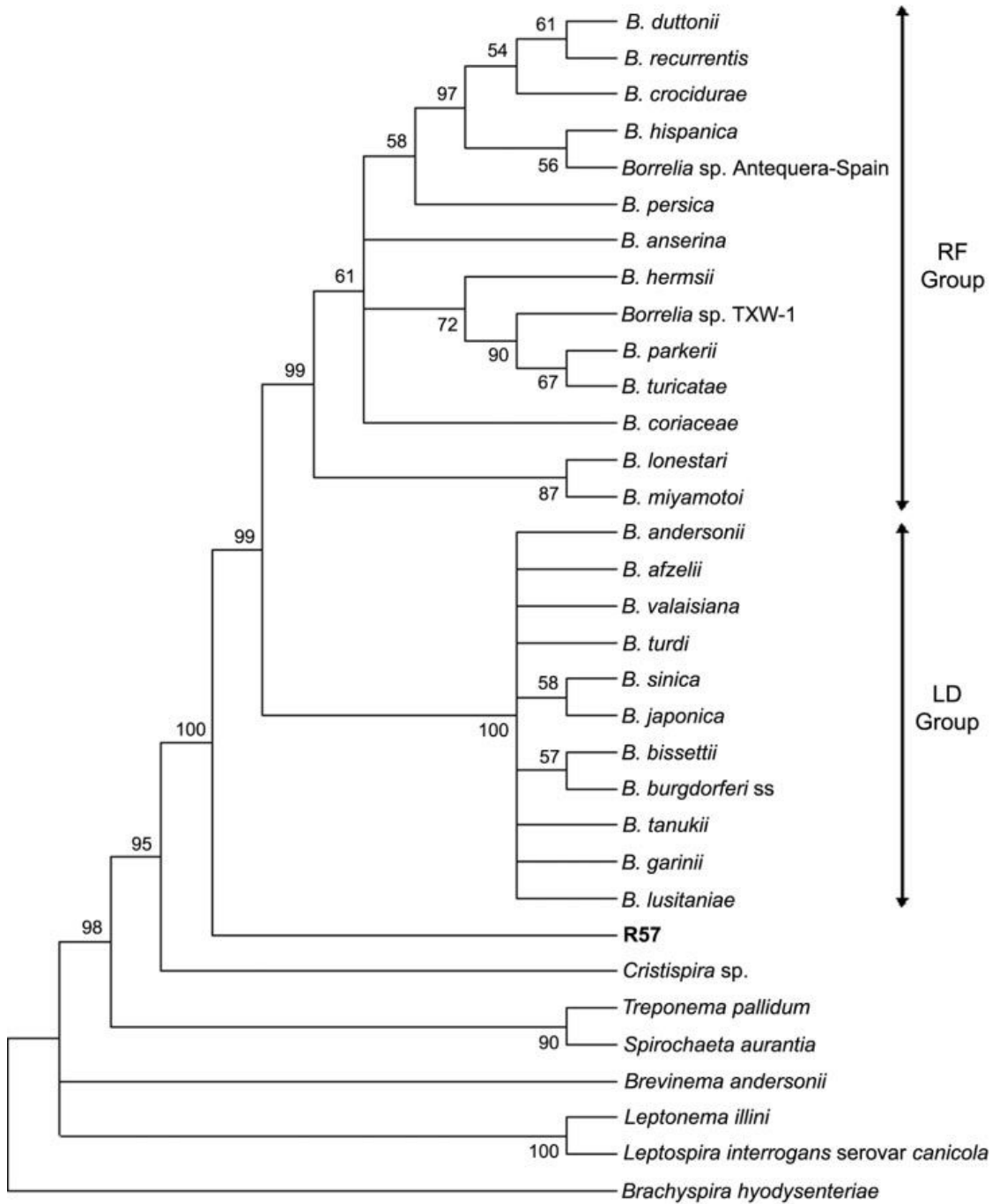
O genoma da bactéria *B. burgdorferi* B31, o agente etiológico da doença de Lyme, contém um cromossomo linear de 910.725 pares de base e aproximadamente 17 plasmídios

lineares e circulares que combinados possuem um tamanho maior que 533.000 pares de base. O cromossomo contém 853 genes que codificam um grupo de proteínas para replicação de DNA, transcrição, translação, metabolismo de transporte e energia, porém, não apresenta genes para reações de biossíntese. O metabolismo limitado de *B. burgdorferi* reflete a evolução convergente por diminuição de genes a partir de progenitores mais evoluídos. A maior parte dos 430 genes de 11 plasmídios diferentes não possuem função definida e o significado biológico de múltiplos genes codificadores de plasmídios não está claro, entretanto, eles devem estar relacionados à variação antigênica e evasão da resposta imune (FRASER et al., 1997).

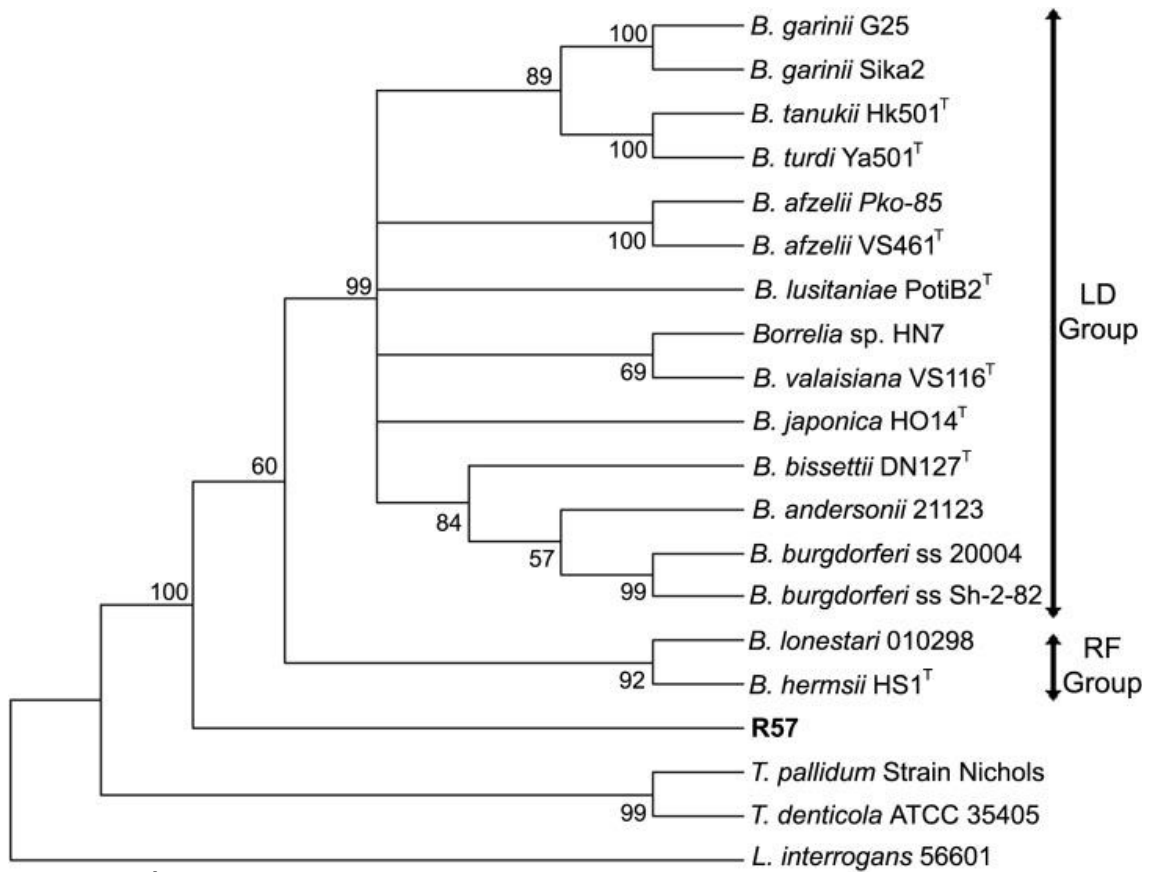
Os genomas fragmentados de *B. recurrentis* e *B. duttonii*, possuem 1.242.163 e 1.574.910 pares de base respectivamente, e contém um plasmídios único e linear de 23 kb. *B. recurrentis* apresentou 20,4% de redução no tamanho do genoma e parece ser um isolado de *B. duttonii*, com um genoma decadente, possivelmente devido ao acúmulo de erros genômicos induzidos pela perda dos genes *recA* e *mutS*. Acompanhado a este fato, aumento no número de genes danificados e uma redução da capacidade codante, incluindo lipoproteínas expostas na superfície e fatores de virulência. A análise da seqüência ancestral reconstruída comparada a *B. recurrentis* e *B. duttonii* foi consistente com a evolução acelerada observada em *B. recurrentis*. A adaptação de patógenos transmitidos por piolhos responsáveis pela maior parte das epidemias foi associada com a rápida redução do genoma. A correlação entre perda de genes e aumento da virulência de *B. recurrentis* assemelha-se àquela de *Rickettsia prowazekii*, com ambas espécies sendo derivadas de isolados menos virulentos (LESCOT et al., 2008).

Gil et al. (2005) determinaram a posição taxonômica do isolado R57 utilizando seqüências dos genes 16S rRna e *groEL* em duas árvores filogenéticas (Figuras 3 e 4), que incluíram membros representativos da ordem Spirochaetales, membros dos grupos *B. burgdorferi* sensu lato e febre recorrente. A posição do isolado R57 se manteve estável em ambas as árvores sendo agrupado mais próximo do gênero *Borrelia*, porém, em um grupo diferente das outras espécies de *Borrelia* estudadas. Espiroquetídeos similares ao deste isolado estão amplamente distribuídos entre pequenos mamíferos em áreas do nordeste da Espanha, produzindo infecção disseminada que envolve a pele, cérebro, e trato urinário, e acredita-se induzir a produção de anticorpos que reagem cruzadamente com *B. burgdorferi*.

MADUREIRA, (2008) fizeram a primeira descrição genotípica de isolado brasileiro de *B. theileri* no Brasil, também realizaram o primeiro relato de espécie de *Borrelia* diferente de *B. theileri* infectando *R. (Boophilus) microplus* e confirmação da presença de espiroquetídeo do gênero *Borrelia* causando borreliose de Lyme-simile no Brasil.



**Figura 3:** Árvore filogenética construída pelo método neighbor-joining baseada em sequências do gene 16S rRNA de diferentes espécies da ordem *Spirochetales* (GIL et al., 2005).



**Figura 4:** Árvore filogenética construída pelo método neighbor-joining baseada em sequencias do gene *groEL* de diferentes espécies da ordem *Spirochetales* (GIL et al., 2005).

## 2.2 REVISÃO DE LITERATURA – *Anaplasma marginale*

### 2.2.1 Taxonomia

O gênero *Anaplasma* está incluído no Super-reino Bacteria, Filo Proteobacteria, Classe Alphaproteobacteria, Ordem Rickettsiales, Família Anaplasmataceae. As características descritivas do gênero *Anaplasma* foram alteradas para inclusão do gênero *Ehrlichia*. Dessa forma, são classificados como membros do gênero *Anaplasma*, 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, parasitam células hematopoiéticas, maduras ou imaturas, particularmente células mielóides e neutrófilos, em sangue periférico ou tecidos, freqüentemente em órgãos ricos em fagócitos mononucleares de hospedeiros mamíferos como o baço, fígado e medula óssea (POPOV et al., 1998).

O reagrupamento de alguns gêneros nas famílias Anaplasmataceae e Rickettsiaceae foi baseada em estudos que incluíram o seqüenciamento do gene 16SrRNA e do operon groESL, análises antigênicas, características biológicas, incluindo tipo de célula infectada no hospedeiro, potenciais vetores, hospedeiros mamíferos com e sem sinais clínicos evidentes de infecção, e distribuição geográfica (DUMLER et al., 2001).

Levando-se em consideração estes estudos, foram inseridos na família Anaplasmataceae os microrganismos intracelulares obrigatórios, que infectam vacúolos citoplasmáticos das células do hospedeiro incluindo eritrócitos, células retículo-endoteliais, células fagocíticas derivadas da medula óssea, células endoteliais e de insetos, helmintos e tecidos reprodutivos de artrópodes. Fazem parte dessa família os gêneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Wolbachia* e *Neorickettsia*, com similaridades de 96,1%, 97,7%, 94,9% e 94,9% respectivamente (DUMLER et al., 2001).

No gênero *Anaplasma*, atualmente, estão incluídos os três patógenos de ruminantes, *A. marginale*, descrito inicialmente por Theiler (1910) na África do Sul, *A. marginale 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 distintas.

O gênero *Aegyptianella* compreende parasito de ave que até pouco tempo estavam sediados provisoriamente neste grupo devido a similaridades fenotípicas com espécies de *Anaplasma*, no entanto, recentemente teve sua classificação confirmada como pertencente ao gênero *Anaplasma*, com base em análises de seqüências gênicas de *Ae. pullorum* (RIKIHISA et al., 2003), embora ainda não tenha sido formalmente renomeada como gênero *Anaplasma* (DE LA FUENTE et al., 2005).

### 2.2.2 Transmissão

*A. marginale* (THEILER, 1910) pode ser transmitido pelos carrapatos *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (América, África e Austrália), *Dermacentor andersoni*, *D. variabilis* e *D. occidentalis* (América do Norte) e, provavelmente, outros carrapatos como *Rhipicephalus simus*, na África do Sul e por insetos hematófagos dos gêneros *Tabanus*, *Stomoxys*, *Haematobia*, *Psorophora* e, provavelmente, outros. O período de incubação da anaplasmosose é de 21 a 35 dias, concorrendo com a manifestação de sintomas clínicos. Este período pode

variado, também, de acordo com a taxa de inoculação e sensibilidade do hospedeiro (KESSLER e SCHENK, 1998).

Os carrapatos podem transmitir patógenos tanto transestadialmente, quando se infecta, e depois transmite o patógeno durante os sucessivos ciclos de vida ou, intraestadialmente quando se infecta e transmite o patógeno dentro do mesmo ciclo de vida (ERIKS et al., 1993). A transmissão dessa riquetsia, além de por carrapatos, também pode ser realizada por dípteros hematófagos e por fômites contaminados (BARBET, 1995). Animais que sobrevivem à infecção aguda têm uma resposta imune efetiva que tanto elimina a infecção quanto reduz a riquetsemia para níveis baixos, microscopicamente indetectáveis, tornando-se uma infecção crônica (FRENCH et al., 1998).

Na fase aguda da doença, os níveis da riquetsia são superiores a  $10^5$  eritrócitos infectados por mL de sangue e podem ser facilmente detectados por exame microscópico de esfregaço de sangue (THEILER, 1910).

A infecção crônica por *A. marginale* é caracterizada por seqüenciais e microscopicamente indetectáveis ciclos de riquetsemia, sendo que em cada ciclo há novas variantes antigênicas de *mSP2*, os quais são similares a polimorfismo genômico contribuindo para evasão da resposta imune hospedeira fazendo a manutenção da infecção crônica (FRENCH et al., 1998 e 1999).

O tamanho e consistência dos ciclos sugerem que a recorrência da infecção está ligada à variação antigênica contínua pelo organismo, seguida de desenvolvimento de resposta imune primária pelo hospedeiro (ALLEMAN et al., 1997).

A identificação de isolados geográficos que não são transmitidos por carrapatos tem influência no controle da anaplasmose. Em regiões onde estes isolados são endêmicos, o controle deve ser direcionado para prevenção da transmissão mecânica por fômites contaminados por sangue infectado e insetos picadores e em segundo plano o combate aos vetores (DE LA FUENTE et al., 2001b).

Noh et al., (2008), sugerem que a transição da bactéria do eritrócito para a célula do carrapato é acompanhada por remodelamento da superfície de *A. marginale*, diminuindo o número de proteínas nos complexos expressos na superfície das células de carrapato. As causas atribuídas a este fato são: a diminuição da expressão protéica, diminuição na exportação de proteínas para a superfície da bactéria, ou alteração na exibição ou disfarce das proteínas na superfície por outras moléculas impedindo o acesso a reagentes cross-linking.

### 2.2.3 Controle de *A. marginale*

A riquetsemia em animais infectados cronicamente com *A. marginale*, flutua de maneira cíclica em período maior que 24 semanas, durante os quais, os organismos não são microscopicamente detectáveis. Os níveis flutuantes de patógenos influenciam a capacidade de indivíduos com infecção crônica, servirem como reservatórios da doença para transmissão a vetores bem como o número de organismos presentes nestes vetores. Desta forma, deve-se enfatizar o controle de animais infectados cronicamente (ERIKS et al., 1993).

As estratégias de controle atualmente utilizadas, baseiam-se no uso de acaricidas juntamente com vacinas que protegem contra doença clínica, mas não previnem a infecção persistente. As estratégias focadas no controle apenas da infecção aguda, servem unicamente para diminuir a incidência de novas infecções, portanto, devem incluir a restrição da transmissão de *A. marginale* de indivíduos infectados cronicamente para carrapatos, que pode ser obtido através da associação de alguns métodos. O uso de quimioterapia ou vacinas serve para diminuir o número de indivíduos cronicamente infectados, bloqueando a transmissão a carrapatos pela restrição da infecção, ou replicação do patógeno dentro do carrapato. Os acaricidas, têm sido amplamente utilizados na tentativa de controlar a população de vetores,

sendo caro e podendo levar a resistência dos carrapatos aos produtos, além de ser prejudicial ao ambiente (ERIKS et al., 1993).

Em relação à taxa de infecção em *Dermacentor andersoni*, Eriks et al. (1993) relataram que machos adultos são extremamente eficientes em infectar-se e a partir de bovinos cronicamente infectados. Dessa forma, estratégias que objetivem diminuir o número de machos adultos disponíveis para o repasto poderiam diminuir a transmissão. Isto pode ser obtido, através do uso de ferormônios como os de fixação-agregação, para atrair os carrapatos adultos para armadilhas que contenham acaricidas, eliminando a necessidade da custosa aplicação nos bovinos.

A anaplasmose é particularmente importante nas regiões de instabilidade enzoótica, nas quais, há um grande percentual de animais susceptíveis à infecção por *A. marginale* (ARAÚJO et al., 2003). Nesta situação, a maioria dos animais não se infecta nos primeiros meses de vida, quando são menos susceptíveis a essa infecção (MADRUGA et al., 1985). Em áreas de estabilidade enzoótica, populações de animais que são introduzidos, provenientes de áreas livres de carrapato ou, de rebanhos sob controle intensivo de carrapatos e, bezerros na faixa etária de 30 a 120 dias com baixa imunidade apresentam risco de anaplasmose (MADRUGA et al., 1984).

A exclusão da infecção entre *Anaplasma* spp, é um mecanismo imunológico, que resulta em infecção de um único isolado geneticamente definido, contribuindo para localização geográfica dos isolados com genótipo e, características antigênicas distintas, o que pode ajudar a elucidar melhor a epidemiologia da anaplasmose. Portanto, infecções por *A. marginale centrale* poderiam prevenir os bovinos de serem infectados com *A. marginale*, bem como fornecer imunoproteção devido à infecção crônica. Genótipos diferentes de *A. marginale* são mantidos dentro de um rebanho em área de endemicidade por eventos de transmissão independente (DE LA FUENTE et al., 2002c).

Contrastando com os estudos de DE LA FUENTE et al., (2002c), Palmer et al., (2004), foram os primeiros a identificar a superinfecção com dois isolados de *A. marginale* genotipicamente diferentes, mas relacionados à proteína MSP1 $\alpha$ . Relataram ainda que o fato pode ser comum dentro de uma região onde o organismo é endêmico 64% dos animais inoculados com o isolado vacinal vivo *A. marginale centrale*, foram subseqüentemente infectados por transmissão natural de *A. marginale* e albergam ambos os organismos.

Freqüentemente, animais carregam um isolado somente, apesar da presença e transmissão de isolados genotipicamente distintos dentro de uma população (PALMER et al., 2004). Este fato corrobora com a prevenção da superinfecção com um segundo isolado, seguindo o desenvolvimento de um amplo repertório de variantes de respostas imune MSP2 específicas, contra o primeiro isolado de *A. marginale*. Como conseqüência deste fato, somente isolados com repertórios do pseudogene *msp2* marcadamente diferentes, são capazes de escapar da resposta imune hospedeira, podendo ser capazes de induzir superinfecção, devido à falta de resposta imune cruzada. Mas, se o repertório do pseudogene é similar no segundo isolado infectante, então, as variantes MSP2 que são apresentadas serão reconhecidas pelo hospedeiro e a infecção debelada (RODRÍGUEZ et al., 2005).

#### **2.2.4 Imunidade contra *A. marginale***

Uma forma econômica e eficiente de controle da anaplasmose bovina é a vacinação. Métodos de imunização tradicionais, que utilizam *A. marginale* ou *A. marginale centrale* provenientes de eritrócitos infectados, também apresentam limitações em seu uso, como efeitos adversos em algumas categorias de animais (vacas prenhes, animais adultos), possibilidade de veiculação de agentes patogênicos (no caso da premunicação), sensibilização de vacas contra grupos sanguíneos e conseqüente isoeritrólise neonatal em bezerros



(BRIZUELA et al., 1998; KESSLER e SCHENK, 1998), razões pelas quais, estudos para o desenvolvimento de novos imunógenos são necessários.

Estudos têm demonstrado que após imunização com DNA simples, o antígeno é naturalmente processado e apresentado em moléculas do complexo de histocompatibilidade principal classe I e II, induzindo uma ampla gama de respostas imune incluindo a produção de anticorpos, CD4, CD8 (DUMLER et al., 2001, apud, KANO et al., 2008).

O uso de vacinas vivas para o controle da anaplasmose, envolve a infecção do animal, pela inoculação de eritrócitos infectados com isolados de baixa patogenicidade. A estratégia de vacinação inclui: infecção e tratamento, vacinas vivas contendo isolados atenuados de *A. marginale* e vacinas vivas contendo *A. marginale centrale* que é menos patogênico (KOCAN et al., 2003).

O uso de vacinas mortas confere vantagens como: o baixo risco de contaminação com agentes infecciosos indesejáveis; estocagem barata, reações adversas pós-inoculação mínimas. As desvantagens das vacinas mortas incluem: a necessidade de reforços anuais; o alto custo de purificação de *A. marginale* a partir de eritrócitos; a falta de proteção cruzada entre isolados separados geograficamente. A imunidade protetora conferida pelas vacinas mortas é freqüentemente menor que a conferida pelas vacinas vivas (KOCAN et al., 2003).

Os candidatos a vacinas serão avaliados pela variação entre isolados de *A. marginale* e o potencial para estimular uma resposta imune tipo I em bovinos imunizados contra isolados múltiplos de *A. marginale*. A identificação de candidatos vacinais apropriados não é uma tarefa simples. Entretanto, MSP1 nativo é capaz de estimular resposta imune protetora, a incapacidade de MSP1 recombinante induzir níveis comparáveis de proteção sugerem que a relação dessas proteínas na membrana pode ser um fator importante na indução de resposta imune protetora. Algumas das MSPs conhecidas são ligadas à membrana por ligações covalentes e não-covalentes e esta relação pode influenciar a apresentação de importantes epítomos. Vacinas multivalentes podem ser necessárias para reposta protetora efetiva, portanto, combinações apropriadas de proteínas/epítomos deverão ser exploradas juntamente com métodos de apresentação apropriados (BRAYTON et al., 2006).

Outro tipo de vacina morta inclui o sistema de cultura de células derivada de embriões de carrapatos *Ixodes scapularis*. BARBET et al. (1999), sugerem que a cultura de células pode servir como fonte de *A. marginale*, mantendo as MSPs conservadas mesmo após sucessivas passagens. As culturas podem ser usadas ainda para testar a estabilidade e diversidade antigênica durante as passagens em bovinos e carrapatos, para determinar se os antígenos de importância biológica são expressos seletivamente em *A. marginale* oriundo de carrapatos, para desenvolver sistemas de transformação e nocaute de genes para descobrir a função do gene de riquetsia, novos agentes terapêuticos, e para o desenvolvimento de reagentes diagnósticos melhores e vacinas.

As pesquisas atuais são baseadas em estudos para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes e seguras, a partir de proteínas de membrana oriundas de corpúsculos iniciais de *A. marginale*, que são expostas na superfície da riquetsia, sendo facilmente acessíveis ao sistema imunológico do hospedeiro (ARAÚJO et al., 2003).

O sucesso de novas vacinas contra *Anaplasma* usando tecnologias moleculares vai depender de sua capacidade de mimetizar e/ou redirecionar a resposta hospedeira durante infecções naturais ou bloquear infecção de células hospedeiras (KOCAN et al., 2003). Segundo Van Den Hurk et al. (2001), o uso de DNA é promissor para o desenvolvimento de vacinas porque podem produzir imunidade duradoura e um amplo espectro de resposta imune celular e humoral e pode ser usado simultaneamente contra diversos agentes em uma mesma vacinação. Estudos realizados por Kocan et al., (2003c) corroboram o fato sugerindo que, pode ser feita à modulação da magnitude e direcionamento da resposta imune pela co-administração de citocinas codificadas por plasmídios e antígenos. A vacina ideal será aquela

capaz de prevenir infecção bem como induzir resposta imune. A possibilidade de bloqueio da infecção é um objetivo importante, entretanto, nenhum antígeno capaz de fazê-lo foi identificado até o momento a partir do patógeno ou do carrapato.

Kocan et al., (2001), afirmaram que as diferenças na expressão e estrutura protéica entre o crescimento de riquetsias em células de carrapato e eritrócitos bovinos são cruciais para o desenvolvimento de formulações vacinais capazes de prevenir a infecção e transmissão de patógenos.

Alguns estudos sugerem que anticorpo contra o antígeno recombinante MSP1a reduz a infectividade para *Dermacentor variabilis* (DE LA FUENTE et al., 2003 d). As vacinas atuais não previnem infecção, e bovinos cronicamente infectados são os principais reservatórios de *A. marginale* servindo como fonte de infecção para transmissão mecânica e biológica por carrapatos (KOCAN et al., 2003).

Estudos sugerem que preparações de membrana de superfície externa são adequadas à imunização contra *A. marginale*. Tentativas para o desenvolvimento de vacinas que produzam imunidade protetora usando proteínas de superfície conhecidas não têm obtido sucesso. Por essa razão, novas proteínas de superfície têm sido pesquisadas para abordagem genômica e proteômica. A disponibilidade de seqüências genômicas permite novas abordagens nas pesquisas para candidatos vacinais (BRAYTON et al., 2006).

Blouin et al., (2000) estabeleceram com sucesso um sistema de cultivo de *A. marginale* em células de *Ixodes scapularis* a partir de um isolado de uma vaca naturalmente infectada de Oklahoma. Este isolado proveniente de cultura era infectante e produziu anaplasiose clínica no gado, mantendo inalteradas as características de infectividade e das proteínas principais de superfície em passagens contínuas por quatro anos. O sistema de cultivo de *A. marginale* fornece uma fonte da riquetsia sem os custos da manutenção de animais e livre de membrana de eritrócitos e problemas associados como a isoeritrolise neonatal. Uma vez estabelecida e confirmada ser livre de outros organismos, o isolado de *Anaplasma* cultivado pode ser mantido livre de vírus e outros patógenos bovinos os quais podem estar presentes no sangue coletado de bovinos. Isolados recentes de campo usados como imunógenos também podem produzir imunidade em bovinos que é similar àquela resultante de infecção natural. Tebele e Palmer, (1991) relataram que a variabilidade de MSPs entre isolados fortalece o potencial do sistema de cultivo de *A. marginale* proveniente de *Ixodes*. A vacinação usando membrana de *A. marginale* confere proteção contra desafio homólogos, mas não heterólogos.

### **2.2.5 Proteínas de superfície principais (MSPs)**

Foram identificadas seis proteínas principais de superfície (MSPs) de *A. marginale* derivadas de eritrócitos bovinos e foram consideradas conservadas em organismos oriundos de carrapatos e cultura de tecidos. MSP1a, MSP4 e MSP5, são proteínas de genes únicos e não variam antigenicamente durante a multiplicação do agente. Por sua vez, MSP1B, MSP2 E MSP3 são provenientes de famílias de multigenes e podem variar antigenicamente principalmente em bovinos cronicamente infectados (BARBET et al., 2001). MSPs estão envolvidas em interações com ambos hospedeiros vertebrados e invertebrados e, por este motivo, também parece envolver mais rapidamente do que outros genes nucleares, pois estão sujeitas a pressão de seleção exercida pelo sistema imune hospedeiro (DE LA FUENTE et al., 2001).

Nos últimos anos, os estudos sobre imunização contra *Anaplasma* concentraram-se na obtenção de frações antigênicas. Bovinos imunizados com corpúsculos iniciais ou membrana destes apresentaram significativa redução da anemia e da riquetsemia (MONTENEGRO-JAMES et al., 1991; TEBELE et al., 1991; RODRIGUÉZ et al., 2000).

A administração de plasmídios que codificam MSPs de *A. marginale* em camundongos Balbi C produziu melhor resposta do que administração de plasmídios individuais o que sugere para estudos futuros que vacinas com múltiplos epítomos de DNA devem ser avaliadas na proteção bovina contra o desafio da anaplasmose (KANO et al., 2008). Arulkanthan et al., (1999), demonstraram que o uso de vacinas plasmidiais codificadoras de MSP1a induziram a soroconversão antígeno específica em camundongos e bovinos sugerindo que MSP1A expressada em plasmídios e nativa, compartilham epítomos de linfócitos B, dessa forma, as vacinas de DNA fornecem um método para direcionar o fenótipo da resposta imune hospedeira.

A natureza variável das MSPs previamente caracterizadas por Riding et al., (2003), impediu as tentativas para desenvolver uma vacina de sub-unidade contra *A. marginale*. Enquanto as MSPs são imunodominantes e podem estimular uma resposta imune protetora, não se tem obtido sucesso, nas tentativas para produzir uma vacina protetora contra um espectro de variantes imunologicamente distintas, enquanto o progresso rumo a identificação de epítomos protetores conservados é baixo. A descoberta de antígenos conservados em *A. marginale* é importante para a produção de uma vacina de sub-unidade contra o patógeno, a partir do princípio que, qualquer vacina deve proteger contra uma ampla gama de variantes antigênicas (HOPE et al., 2004).

### 2.2.6 MSP1

MSP1 é um heterodímero composto de dois polipeptídios não relacionados estruturalmente: MSP1a e MSP1b. MSP1a é codificado por *mSP1a* e está envolvido na adesão a eritrócitos bovinos e células de carrapatos, e transmissão de *A. marginale* por *Dermacentor* spp. (DE LA FUENTE et al., 2001a). MSP1b é codificado por pelo menos dois genes, *mSP1β1* e *mSP1β2* (BOWIE et al., 2002) e foi sugerido ser uma adesina para eritrócitos bovinos mas provou-se não ser uma adesina para células de carrapato (DE LA FUENTE et al., 2001b). O peso molecular de MSP1a varia de tamanho entre isolados de *A. marginale* por causa de diferentes números de repetições em tandem de 29 aminoácidos (DE LA FUENTE et al., 2003a).

É possível que a associação entre MSP1a e MSP1b na superfície do complexo de proteínas permite ao patógeno se ligar mais efetivamente ao eritrócito e/ou componente da célula do carrapato. MSP1a poderia ser uma subunidade essencial no reconhecimento do receptor da célula do carrapato, enquanto a ligação ao receptor do eritrócito poderia ser primariamente mediada por MSP1b ou por ambas subunidades proteicas através da ligação de componentes eritrocitários distintos. O papel diferencial de MSP1a e MSP1b na adesão as hemácias confere maior relevância ao complexo MSP1 na multiplicação de *A. marginale* no hospedeiro mamífero e o carrapato vetor, provavelmente como parte do processo de invasão (DE LA FUENTE, 2001b).

Os resultados obtidos por DE LA FUENTE et al., (2001 b), usando cultura de células de carrapato denominadas IDE8 corroboram os achados de KOCAN et al., (1981) usando células de intestino de *Dermacentor variabilis* machos. Estudos microscópicos confirmaram a adesão de MSP1a em eritrócitos, células IDE8 e células intestinais de *D. variabilis* e a adesão de MSP1b somente a eritrócitos, confirmando a validade do sistema de cultivo de células IDE8 como modelo para estudo de patógenos do gênero *Ehrlichia* (DE LA FUENTE, 2001b). A infecção das células intestinais por *A. marginale* é o primeiro sítio de infecção em carrapatos e inicia o desenvolvimento do ciclo. Se não houver adesão e infecção das células intestinais não haverá infecção das glândulas salivares e posterior transmissão ao hospedeiro bovino. Desta forma, a adesão de MSP1a as células intestinais é requerida para infecção, multiplicação e transmissão de *A. marginale* por *Dermacentor* spp. A capacidade de adesão

de MSP1a foi avaliada em células derivadas de duas espécies de carrapato *I. scapularis* e *D. variabilis*, sugerindo que estes achados podem ser aplicados a outras espécies de carrapatos (DE LA FUENTE, 2001b).

Alterações no genótipo de *msp1a* dentro de uma mesma árvore genética são possíveis assim como aquelas que ocorrem no pseudogene *mcp2*. A população se mantém a mesma enquanto o genótipo *mcp1a* pode mudar. Dentro de um rebanho, isolados com genótipos de *mcp1a* idênticos ou similares contêm o repertório do pseudogene *mcp2* idêntico, enquanto isolados com genótipos de *mcp1a* muito diferentes têm o repertório do pseudogene *mcp2* diferente. A associação entre o genótipo de *mcp1a* e o repertório do pseudogene *mcp2* é um fenômeno localizado dentro de um rebanho ou em populações muito relacionadas (RODRÍGUEZ et al., 2005).

Palmer et al. (1989) constataram que a imunização de bovinos com MSP1 nativa promoveu proteção contra isolados homólogos e heterólogos, demonstrando que apesar da variação de tamanho presente entre os diferentes isolados, há conservação dos epítopos de proteção cruzada.

A imunização de bovinos com MSP1 nativa promove a resposta humoral com produção de anticorpos contra MSP1, MSP1a ou MSP1b que inibem a ligação de *A. marginale* aos eritrócitos, neutralizando assim a invasão das riquetsias às células do hospedeiro (MCGAREY et al., 1994). DE LA FUENTE et al., (2003b), relataram que MSP1a não deve ser usado como um marcador para caracterização geográfica de isolados de *A. marginale* e provavelmente reflete o histórico da movimentação do gado em determinada região. E, acrescentam que a pressão seletiva em MSP1a é consistente com sua função biológica e sugere que esta proteína pode ser útil como candidata a vacina.

DE LA FUENTE et al., (2004b), citam que interações patógeno-vetor poderiam influenciar a presença de seqüências repetidoras de MSP1a em isolados da América Latina, desta forma, a interação entre *B. microplus* e *A. marginale* poderia influenciar o agrupamento dos isolados latino-americanos de *A. marginale* em uma chave separada dos isolados Norte Americanos, os quais, são transmitidos principalmente por *Dermacentor* spp. Em regiões tropicais, as condições climáticas favorecem ao ciclo de vida de dípteros hematófagos, os quais são conhecidos como eficientes vetores mecânicos de *A. marginale*. A caracterização do isolado brasileiro de *A. marginale* não transmitido por *B. microplus* sugerindo um papel para transmissão mecânica na epidemiologia de *A. marginale* no Brasil (GONÇALVES RUIZ et al., 2002 apud DE LA FUENTE et al., 2004b).

## 2.2.7 MSP2

A estrutura de MSP2 que é similar entre algumas espécies de *Anaplasma* pode ser responsável, em parte, pela proteção cruzada induzida pela vacinação por *A. centrale*. Proteínas como MSP4 e MSP5 que são conservadas antígenicamente entre *A. marginale centrale* e *A. marginale*, também podem ser requeridas para mimetizar a proteção induzida pela vacina viva de *A. marginale centrale* ou pela imunização com membranas externas purificadas (MOLAD et al., 2004).

As proteínas de membrana MSP2 e MSP3 de *A. marginale*, são altamente variáveis durante a infecção, resultante de eventos de conversões seqüenciais de genes que dão origem a variantes estruturais e antigênicas expressas de sítios únicos de expressão (Brayton et al., 2002).

A superfamília MSP2 é constituída por *mcp2*, *mcp3* e *mcp4*; sendo as duas últimas tendo pouca homologia de seqüência com *mcp2*. A superfamília MSP2 possui sete pseudogenes; sendo transcrita como parte de um operon de quatro genes, os três genes restantes foram chamados de genes operon associados (*opags 1-3*) e são incluídos na família. *Mcp2* é expresso por *A. marginale* no eritrócito bovino e no intestino e glândula salivar do carrapato. Existem

15 genes ainda não caracterizados com homologia de seqüência aos membros centrais da superfamília MSP2-4 sendo designados OMP1-15. Doze desses genes OMP são organizados em três grupos representando quatro operons, com os três genes restantes ocorrendo singularmente (BRAYTON *et al.*, 2005).

Dentro do genoma de *A. marginale*, há sítios simples de expressão para ambos *msp2* e *msp3*; entretanto, há pseudogenes múltiplos funcionais distribuídos pelo cromossomo que servem como molde para conversão para dar origem a variantes da camada de superfície de *msp2* e *msp3* (BRAYTON *et al.*, 2005). Essas variantes que escapam à resposta de anticorpos acreditam-se serem críticas para a longa persistência dos organismos dentro dos hospedeiros mamíferos imunocompetentes (FRENCH *et al.*, 1999).

A expressão diferencial de genes entre a infecção no hospedeiro vertebrado e invertebrado é um tema comum em patógenos transmitidos por artrópodes, refletindo as necessidades especializadas para invasão, sobrevivência e replicação em cada hospedeiro (LÖHR *et al.*, 2002).

Clones de *A. marginale* MSP2 relatados por French *et al.* (1999), possuem uma região hipervariável central única flanqueada por regiões N e C terminais altamente conservadas. Porém, a estrutura das variantes de MSP2 expressas durante riquetsemia persistente é muito similar àquelas definidas pela seqüência de genes que codificam a proteína MSP2 da erliquiose granulocítica humana. A variação da proteína MSP2 de *A. marginale* definida por 17 transcritos expressos durante o ciclo de riquetsemia ocorre somente em uma região central única da proteína. As regiões semivariável e N e C terminal variável definidas pela análise de genes que codificam homólogos de MSP2 no genogrupo I *Ehrlichiae* (*E. chaffeensis*, *E. canis*, e *C. ruminantium*) não foram detectadas em nenhum dos variantes de MSP2 de *A. marginale*.

A proteína externa de membrana MSP2 é codificada em um RNA transcrito policistrônico em estágios eritrocitários de *A. marginale*. Havendo um polimorfismo no sítio de expressão genômico para este transcrito policistrônico *msp2* e evidencia para rearranjo genético durante infecção persistente. A disponibilidade do sítio de expressão pode permitir a determinação das variantes de 4 MSP2 expressas a partir deste sítio durante a transmissão cíclica de *A. marginale* entre carrapatos e bovinos. Estes dados fornecem uma base molecular possível para a persistência de *A. marginale* e pode permitir a identificação de mecanismos similares de variação em outros patógenos relacionados ao gênero *Ehrlichia*. Diversos patógenos devem usar mecanismos de expressão de proteína de superfície similares para evasão da resposta imune do hospedeiro e causar infecções crônicas (ALLEMAN *et al.*, 2001).

A análise de um sítio de expressão policistrônico de *msp2* em *A. marginale* proveniente de cultura, glândula salivar de carrapatos, e bovinos com infecção aguda ou crônica revelam a conservação das seqüências entre os estágios da isolado de Oklahoma na maior parte dos sítios de expressão incluindo as regiões flanqueadoras 5' - 3'. A exceção é a região hipervariável central de MSP2 que, é muito polimórfica entre populações de *A. marginale*. Mesmo polimórficas, estas seqüências variantes principais não variam nas passagens em culturas, estágios agudos de infecção eritrocitária, e glândulas salivares de carrapatos porém, variam em infecções crônicas em hospedeiros bovinos. Estas mudanças na estrutura de um sítio de expressão para uma proteína externa de membrana principal e imunoprotetora tem implicações no desenvolvimento de vacinas contra *A. marginale* e patógenos relacionados (BARBET *et al.*, 2001).

Brown *et al.* (2001) demonstraram a presença de múltiplos epítomos de linfócitos Th naturalmente processados nas regiões N e C terminal de MSP2 que são estruturalmente conservados entre o genogrupo II de *Ehrlichia*, são reconhecidos pelos bovinos como diferentes haplotipos de complexos de histocompatibilidade principais tipo II. Este fato poderia explicar a dominância sorológica desta proteína para humanos e animais infectados

pelo genogrupo II de Ehrlichia ou, com membros relacionados do grupo I: *E. chaffeensis*, *E. canis* e *Cowdria ruminantium* (JONGEJAN et al., 1989). Durante a infecção persistente quando organismos antigenicamente variantes emergem seqüencialmente, uma forte resposta de linfócitos Th diretamente contra epítomos não variáveis em MSP2 poderia fornecer uma acelerada aporte de linfócitos B levando a rápida produção de anticorpos variante-específicos. Esta resposta em combinação com a produção de interferon  $\gamma$ , hipoteticamente controla a riquetsemia para níveis baixos observados durante a fase crônica.

De La Fuente e Kocan (2001) demonstraram que a pressão seletiva exercida pela resposta imune adquirida de bovinos em glândulas salivares cronicamente infectadas de *Dermacentor variabilis* não influencia o surgimento de mais populações de seqüências de *mSP2* heterogêneas e de variantes de MSP2. Sendo que estas variantes devem ser influenciadas por outros fatores do hospedeiro vertebrado ou carrapato. Alguma homogeneidade ocorre entre seqüências de MSP2 na população de *A. marginale* em um estágio da multiplicação parasitária. O padrão do desenvolvimento de *A. marginale* em carrapatos é diferente de protozoários como *Theileria* e *Babesia* spp, no qual as glândulas salivares infectadas são descolonizadas quando os parasitos são transmitidos ao hospedeiro vertebrado durante o repasto. Porém, não se sabe se as infecções crônicas de glândulas salivares são totalmente devido à multiplicação da *Ehrlichiae* dentro destas ou se resulta do constante movimento de organismos de células intestinais e outros tecidos para as glândulas salivares.

A caracterização do antígeno ANA 29 mostrou que o cDNA codifica para um antígeno não caracterizado previamente, que não apresenta homologia significativa com qualquer outra proteína hipotética de bactérias ou outros organismos conhecidos no banco de dados. E não foram encontrados homólogos deste gene em *Ehrlichia canis* ou *Cowdria ruminantium* por PCR, ou hibridização Southern. A presença de homólogos deste gene em isolados de *A. marginale* e *A. centrale*, mas ausentes em *Ehrlichia*, sugere que o gene é único e conservado para espécies de *Anaplasma*. A imunização com o antígeno ANA 29 induz a resposta imune protetora contra o desafio de *A. marginale*. A anaplasmosose é uma doença que freqüentemente pode ser exacerbada pela vacinação apesar de o mecanismo ainda não estar claro, mas pode estar ligado a antígenos inapropriados ou resposta imunológica inapropriada. Desta forma, a proteção pode ser definida como uma redução na parasitemia, hemólise e mortalidade (HOPE et al., 2004).

*Operon associated genes (opag) 1 e 3* são componentes da superfamília MSP2 e sua função permanece desconhecida. A observação de que genes estruturais de bactérias são freqüentemente organizados em grupos que codificam proteínas as quais têm funções relacionadas (Lewin 2000 apud Lohr et al. 2002), sugere que a proteína OPAG participe de interações na membrana de *A. marginale*. Não é conhecido se o gene *opag 1* é expresso em pequena quantidade, ou não é expresso. *Opag 3* é expresso somente dentro do eritrócito durante riquetsemia aguda. A expressão diferencial de proteínas de membrana externa dentro de um mesmo operon, é um achado novo em bactérias transmitidas por carrapatos, e a regulação da expressão deve ser amplamente aplicável para entender como o patógeno se adapta as transições de hospedeiros (Lohr et al. 2002).

Nos estudos de Noh et al., (2008), Am 778 foi originalmente anotada como sendo uma proteína hipotética codificada por um locus que também codifica Am 779 e 780. Estas últimas proteínas também foram identificadas em complexos de proteínas de superfície de *A. marginale* isolado de eritrócitos. Ge et al., (2007) citam que todas as três proteínas são expressas na superfície e seus genes são altamente conservados entre os gêneros da família *Anaplasmataceae*, incluindo *A. phagocytophilum*, *E. canis*, *e. chaffeensis*, *E. ruminantium* e *Wolbachia* spp.

Os complexos de proteínas expressas na superfície de *A. marginale* isolados de eritrócitos induzem imunidade protetora igual àquela produzida por membranas externas purificadas (NOH et al., 2008).

O genoma do isolado norte-americano Saint Maries de *A. marginale* foi clonado em cromossomo artificial bacteriano, seqüenciado e anotado apresentando 1.197.687 pares de bases (pb) (BRAYTON et al., 2005). Um dos aspectos mais relevantes da análise genômica de *A. marginale* foi a descoberta de novas proteínas de membrana da riquetsia. Pela anotação do genoma do isolado americano, poucas seqüências puderam ser classificadas como codificantes para proteínas de membrana externa (*outer membrane protein* - OMP). E a maioria delas, estava inserida nas superfamílias MSP1 e MSP2 (BRAYTON et al., 2006). Na superfamília MSP2, foram identificadas 14 seqüências codificantes para proteínas de membrana externa (*outer membrane proteins*-OMPs). Com exceção de *omp2*, *omp3* e *omp6*, os quais são provavelmente pseudogenes, os demais *omps* são transcritos em eritrócitos bovinos infectados com *A. marginale*, no intestino e glândula salivar de carrapato, e em linhagem celular IDE8 de carrapato. OMPs 1, 4, 7, 8, 9 e 11 são expressos como proteínas em eritrócitos bovinos infectados com *A. marginale*. No entanto, em células de carrapato, a expressão das proteínas OMPs 1, 4, 7, 8, 9 é reduzida e, no caso de OMP11, ausente (NOH et al., 2006).

### 2.2.8 Proteínas externas de membrana (OMPs)

A função das Proteínas externas de membrana (OMPs) tem sido amplamente estudadas e pouco se sabe a respeito da sua influência na imunidade. Vários estudos em vacinas têm sido direcionados a OMPs específicas tendo um sucesso limitado quando comparado às imunizações utilizando-se bactérias inteiras ou membranas externas intactas, pelo fato das OMPs serem maiores que os haptenos, porém, podem não apresentar epítomos de linfócitos T suficientes para induzir resposta ou não ser suficientemente apresentado por MHC classe II. OMPs que sabidamente contenham múltiplos epítomos de linfócitos T podem atuar como carreadores de outras OMPs as quais são antígenos fracos de linfócitos T, dessa forma, a MSP1b1 que é um fraco antígeno, quando associada a MSP1a que é rica em epítomos T, tem efeito imunogênico significativo levando a altos níveis de produção de anticorpos contra MSP1b1 (MACMILLAN et al., 2008).

Para se entender completamente a natureza de proteção das membranas externas de *A. marginale*, é importante determinar a complexidade das interações entre proteínas de membrana e como os complexos influenciam na imunidade (MACMILLAN et al., 2008).

Imunizações com preparações de OMP têm demonstrado conferir proteção contra *A. marginale* (BROWN et al., 1998a). A imunização com membranas externas purificadas induz a proteção contra infecção aguda de *A. marginale* e doença, e uma abordagem proteômica e genômica recentemente identificou 21 proteínas dentro dos imunógenos de membrana externa além das principais proteínas de superfície MSP1 a MSP5.

A proteína leucil aminopeptidase (PepA) e o fator de alongação Tu (EF-Tu) anteriormente, foram classificados como proteínas citoplasmáticas, mas, após análise *in silico* pelo programa TMHMM, foram reconhecidas como proteínas ancoradas à membrana externa e expostas ao meio extracelular (Lopez et al., 2005). Leucil aminopeptidase, é uma enzima que promove a quebra de ligações peptídicas por hidrólise em vias metabólicas de aminoácidos.

O sistema de secreção tipo IV (TFSS) transporta macromoléculas através da membrana de forma ATP dependente, sendo relacionado ao sistema de conjugação em bactérias gram negativas (NIU et al., 2006). TFSS é um dos poucos grupos de genes sintênicos entre todos os rickettsiales seqüenciados sugerindo que a coordenação da expressão destes genes é crítica (HOTOPP et al., 2006). É possível, que a expressão de TFSS seja

regulada e associada à sobrevivência em bactérias intracelulares obrigatórias (NIU et al., 2006). Pela sua localização na superfície, natureza altamente conservada, e exigência a sobrevivência intracelular, proteínas TFSS de bactérias gram negativas são alvos coerentes para investigação imunológica (LOPEZ et al., 2007).

Dentre as proteínas recentemente descobertas estão as proteínas do sistema de secreção tipo IV (TFSS) VirB9-2, VirB10, fator de alongação termo instável (EF-Tu) e proteína conjugal de transferência (VirB9-1). Em outras bactérias gram negativas, proteínas do TFSS formam canais que facilitam a secreção de moléculas, e são necessárias à sobrevivência celular. Os três tipos de proteínas TFSS são altamente conservadas como proteínas ortólogas em *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffensis* e *Ehrlichia canis*. O reconhecimento das proteínas dos antígenos de TFSS por Células T CD4 e por IgG2 de bovinos imunizados com a fração de membrana externa de proteção fornece uma razão para incluir estas proteínas no desenvolvimento de vacinas contra *A. marginale* e patógenos relacionados (LOPEZ et al., 2007).

Proteínas do sistema de secreção tipo IV (TFSS), presentes em membranas externas de bactérias, são altamente conservadas entre isolados geograficamente distintos de *A. marginale* e imunogênicas para bovinos que possuem mesmo MHC classe II. Estes fatores indicam o potencial das proteínas TFSS no desenvolvimento de vacinas para *A. marginale* (LOPEZ et al., 2007).

O fator de alongação termo instável (EF-Tu), é uma enzima pertencente à família das hidrolases, envolvida na síntese protéica, exercendo a função de alongação da cadeia durante a síntese de polipeptídeos no ribossomo. Ramos et al. (2007), avaliaram o padrão de transcrição de diversos genes para proteínas de membrana de *A. marginale* entre elas EF-Tu, e após análise, esta foi classificada como uma proteína associada à membrana (LOPEZ et al. 2005). Araújo et al. (2008) e Lopez et al. (2008) expressaram *ef-tu* em *Escherichia coli* e a proteína recombinante foi capaz de induzir a resposta proliferativa de linfócitos T e títulos de IgG2 superiores aos de IgG1, comprovando possuir capacidade imunoestimulatória desejada.

Bovinos infectados experimental ou naturalmente por VirB9-2, VirB10 e EF-Tu, membros do TFSS obtêm uma resposta humoral específica que pode ser detectada por ELISA com proteínas recombinantes, provando que estas proteínas são imunogênicas. Os epítomos são conservados entre isolados heterólogos de *A. marginale* (Rio Grande do Norte e Alagoas). Ambas características são importantes para o desenvolvimento de imunógenos, principalmente em países com dimensões continentais como o Brasil. O reconhecimento de VirB9-2, VirB10 e EF-Tu por anticorpos a partir de bovinos infectados com isolados homólogos e heterólogos, e por IgG2 de bovinos naturalmente infectados com esta riquétisia suporta a inclusão destas proteínas no desenvolvimento de vacinas contra *A. marginale*. (ARAÚJO et al., 2008).

As superóxido desmutases (SOD) também faz parte do TFSS e, são metaloenzimas que têm a função de catalizar a reação de dismutação  $O_2 \rightarrow H_2O_2 \rightarrow O_2$ . Existem outros tipos de SODs, os quais podem ser distinguidas pelo metal presente no sítio ativo (ex: MnSOD, ZnSOD). Ohashi et al. (2002), afirmaram que o gene *sodB* de *Anaplasma* e *Ehrlichia* spp, provavelmente codifica uma FeSOD. Ferro SODs e Manganês SODs são conhecidas por defender as células bacterianas de oxigênio reativo, gerado a partir do metabolismo bacteriano, e proteger o DNA de danos oxidativos.

A função de VIRB3 não é bem definida, porém, Berger e Christie (1994), estabeleceram em seus estudos que *virb3* e *virb5* são genes essenciais de virulência. *VirB9-1* é ortólogo a VirB9-2 (MCLEOD et al., 2004) sendo responsável pela transferência de complexos proteína-DNA e macromoléculas entre células (LOPEZ et al., 2007).

A proteína codificada pelo gene *am854* foi analisada pelo software TMHMM, sendo classificada como proteína de membrana por Lopez et al. (2005). Neste mesmo experimento,



relataram ainda que AM854 é uma lipoproteína associada a um peptidoglicano, que também faz parte dos componentes estruturais da membrana externa e que possui homologia com proteínas relacionadas a *Ehrlichia canis* quando submetidas ao BLAST.

Dentro da superfamília MSP2, foram identificados ainda 15 OMPs (*outer membrane proteins*), com seqüências similares a *msp2* e/ou *msp4*. Estes genes podem ser agrupados isoladamente ou em estruturas semelhantes a um operon (Brayton et al. 2006). Dentro deste grupo, *omp2*, *omp3*, e *omp6*, provavelmente são pseudogenes, já que seus transcritos não foram detectados nos estágios eritrócíticos de diferentes isolados de *A. marginale* (NOH et al. 2005; RAMOS et al. 2007).

As OMPs 4, 7, 10 e 14 são proteínas que permanecem com função indefinida em *A. marginale*, sendo designados membros da superfamília MSP2, pela homologia de seqüências aos antígenos de superfície da família pfam01617 (BRAYTON et al. 2005). Porém, estas OMPs, são alvos de anticorpos induzidos pela imunização de bovinos com membrana externa purificada e, especificamente por altos títulos de IgG2, que está associada à imunidade protetora (LOPEZ et al. 2005).

O isolado vacinal AMCE possui em seu genoma, os genes *omp1*, *omp4*, *omp5*, *omp7*, *omp9*, *omp10*, *omp11*, *omp12*, *omp13* e *omp14* (Genbank CP001759). Herndon et al. (2009), afirmaram que a família das *omps* 1-15 presentes nos isolados americanos de *A. marginale sensu stricto* é reduzida em AMCE, tendo as OMPs 7-9 colapsadas em uma única região codante, e os homólogos OMPs 2, 3, 6 e 15 estão ausentes.

A incorporação de múltiplos epítomos na imunização com DNA consiste de um novo método para aumentar a imunogenicidade e proteção do animal vacinado como comparado a vacinas de um epítomo (KANO et al., 2008).

A expressão diferencial de *A. marginale omp1*, *omp4*, *omp7*, *omp8*, *omp9*, e *omp11* entre tipos celulares parece ser pelo menos em parte regulado transcricionalmente. A quantidade destas *omps* expressas em células de carrapato IDE8 estão marcadamente menores que nos eritrócitos (NOH et al., 2006). Estas OMPs podem ter um papel na indução da imunidade protetora após a imunização com membrana externa purificada de *A. marginale* (BROWN et al., 1998b). Nenhuma das MSPs anteriormente identificadas induziram imunidade consistente (PALMER et al., 1988). As OMPs 4, 7, 10 e 14 tem sido identificadas recentemente como alvo de anticorpos induzidos pela imunização de gado com membranas externas purificadas e, especificamente, por altos títulos de IgG2, o qual é associado com imunidade protetora (BROWN et al., 1998a). As OMPs expressas devem ter um papel importante na manutenção da conformação original da membrana, como esta, em *A. marginale*, é composta por proteínas com amplas uniões covalentes e não covalentes intra e intermoleculares (VIDOTTO et al., 1994).

O conhecimento que estas OMPs são relativamente invariantes e são expressas dentro de eritrócitos infectados, suporta investigações a respeito de sua importância na imunidade e relevância para o desenvolvimento de vacinas (NOH et al., 2006).

Os genes *omp1-14* são altamente conservados durante todo ciclo de infecção, incluindo bezerros com infecção aguda e crônica, glândula salivar do carrapato, e no bezerro infectado subsequente a transmissão feita pelo repasto do carrapato. Este alto grau de conservação é mais relacionado a *Ehrlichia* sp do que *msp2* e *msp3* de *A. marginale* (NOH et al., 2006).

A disponibilidade da seqüência do genoma completo da isolado St. Maries de *A. marginale* permite novas pesquisas para a identificação de OMPs ainda não descritas no complexo de imunógenos de membranas externas, além de possibilitar a comparação da conservação de seqüência de proteínas entre diferentes isolados. A imunização de bovinos com OMP de *A. marginale* purificadas, induz a completa proteção contra infecção que está associada com a secreção de interferon gama mediada por linfócitos T CD4+ e título de

anticorpos imunoglobulina G2 (IgG2). Baseado nas afirmações citadas acima, Lopez et al., (2005), através de uma abordagem proteômica e genômica identificaram novas OMPs utilizando anticorpos IgG2 de animais vacinados com estas OMPs. *A. phagocytophilum* contém proteínas altamente similares a MSP2 de *A. marginale* e pesquisas sobre proteínas de *A. marginale* no BLAST identificadas no estudo de Lopez et al., (2005), indicaram que algumas têm homologia com proteínas de *A. phagocytophilum* e espécies do gênero *Ehrlichia*.

### 2.2.9 Aspectos gerais do genoma

A análise do genoma das bactérias tem definindo rotas metabólicas, que podem ser testadas para descoberta de novos antibióticos, e mistérios como o percentual significativo de genes que na maioria dos genomas bacterianos, não estão relacionados com nenhum outro gene identificado. A identificação destes genes bacterianos desconhecidos e suas funções podem ajudar a entender os mecanismos de sobrevivência das bactérias como parasitas obrigatórios, levando a novas pesquisas para o controle de patógenos especialmente quando o metabolismo for mais bem entendido. A maioria das bactérias parasitas obrigatórios tem genoma muito pequeno e presume-se que retém somente as funções mais importantes para sobrevivência e propagação (PALMER, 2002).

A diminuição do tamanho do genoma acredita-se ser resultado de redução evolutiva, e o patógeno de hoje é derivado de um precursor com genoma maior. Organismos que possuem um estilo de vida endossimbiótico estão em risco. As atividades de genes nucleares homólogos podem conferir genes do endossimbionte descartáveis e como consequência eles se tornam vulneráveis a supressão por mutação. A consequência do acúmulo dessas mutações será a inativação e eventual deleção de genes não essenciais. Estes, e outros genes, podem ter sido deletados, quando um genoma ancestral viveu primeiramente em uma célula nucleada. Quando genes essenciais à vida livre são perdidos, o endossimbionte torna-se um residente obrigatório de seu hospedeiro (ANDERSSON et al., 1998).

As bactérias com genoma pequeno sofrem redução progressiva em seus genomas e ainda assim mantêm a capacidade de infectar, sobrevivência, e replicação para causar doença nos animais. Notavelmente, devotam um alto percentual de seus genomas a famílias parálogas de moléculas polimórficas de superfície. Enquanto a maioria dos genes duplicados foram deletados, numerosas cópias de genes que codificam proteínas de membrana polimórficas são mantidos. A pressão seletiva para manutenção desses genes parece ser o sistema imune hospedeiro, que tende a manter a capacidade genética de expressar diversos grupos de moléculas antígenicamente polimórficas. A geração de resposta imune adaptativa a epítopos expostos na superfície da membrana externa resulta em eliminação do patógeno (PALMER, 2002).

Seqüências genômicas podem ser excluídas por um mecanismo mais abrupto, que consiste na recombinação intracromossomial em seqüências duplicadas, os quais podem resultar na deleção de seqüências intervenientes, a perda da duplicação de seqüência e o rearranjo da seqüência flanqueada (ANDERSSON et al., 1998).

Muitas espécies da ordem Rickettsiales são bactérias intracelulares obrigatórias com exigências nutricionais específicas, e necessitam ser cultivadas em linhagens celulares eucarióticas, o que dificulta a obtenção de grande quantidade de DNA para o sequenciamento do genoma completo (COLLINS et al., 2005).

O pequeno genoma de *A. marginale* (1.197.687 pares de bases) permitiu que Brayton et al. (2005) usassem cromossomos artificiais bacterianos (BAC) para obter a seqüência genômica sem a purificação do organismo a partir da célula hospedeira. Reportando, desta maneira, o genoma completo de *A. marginale* isolado *St. Maries*, originalmente isolado de um animal com anaplasmosse aguda. O genoma circular completo deste isolado, possui conteúdo

G+C de 49,8%, que é pouco comum em organismos intracelulares obrigatórios, que em sua maioria é baixo. O genoma possui uma alta densidade de genes codificadores (86%), típico de bactérias intracelulares adaptadas que têm um conteúdo codificador mínimo para manutenção da vida em nichos particulares. O genoma de *A. marginale* isolado Saint Maries codifica 949 seqüências de DNA codificantes, com uma média de 1.077 pares de base, incluído oito seqüências codificantes anotadas, como domínios Open Reading Frame (ORF), os quais podem ser pseudogenes clássicos. O genoma deste isolado contém um único operon de genes RNA ribossomais, que parecem ser típicos da ordem *Rickettsiales* e 37 genes de RNA transportadores, representando 20 aminoácidos. Apesar de 162 seqüências codificadoras foram preditas contendo peptídeos sinalizadores, poucas seqüências puderam ser atribuídas à membrana externa. Ocorrem também poucos pseudogenes, definidos como cópias inativas de genes funcionais. Foram identificadas 62 proteínas de membrana externa (OMP), o que já era esperado para um genoma pequeno (BRAYTON et al., 2005).

No ano de 2009, o sequenciamento do genoma de *A. marginale centrale* foi relatado por Herndom et al., ter 1.206.806 pares de base em seu cromossomo circular, com 925 seqüências codificantes preditas, 19 pseudogenes, 37 tRNAs e um grupo único de genes RNA ribossomais e 10 genes não encontrados nos isolados Saint Maries e Flórida. O sequenciamento deste genoma é de fundamental importância para o desenvolvimento de vacinas devido à imunidade conferida pela vacinação com esse isolado ser suficiente para prevenir o desenvolvimento de doença clínica em bovinos (PIPANO, 1995), portanto, os epítomos cruciais para o desenvolvimento de imunidade devem ser conservados.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Pesquisa de anticorpos homólogos a *Borrelia burgdorferi* por ELISA indireto

A primeira etapa do estudo compreendeu a produção de antígeno de *B. burgdorferi* para realização dos testes ELISA indireto, sendo realizada no laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ. O antígeno foi preparado em meio BSK-H completo segundo metodologia descrita por ISHIKAWA (1997), sendo utilizada como referência *B. burgdorferi stricto sensu* isolado G39/40 de origem americana, mantida no Laboratório de Integração Artrite e Microrganismo, Departamento de Reumatologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Centro de Referência para Borreliose de Lyme no Brasil e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Natalino Hajime Yoshinari.

Foram coletadas 400 amostras de sangue de bovinos oriundos do município de Vila do Café (ES), e de setores da UFRRJ como: Fazendinha, bovino de leite e reprodução. A partir das amostras de sangue, foi extraído o soro e realizado o teste ELISA indireto para presença de anticorpos homólogos à *B. burgdorferi*. Os animais que se apresentaram positivos ao ELISA, tiveram os carrapatos encontrados fixados em seu corpo coletados para posterior extração de DNA e PCR.

O soro controle positivo foi obtido a partir da inoculação experimental de uma bezerra fêmea de 50 dias de idade, sadia, pesando 36 Kg de peso vivo, originário do setor de reprodução animal, Instituto de Zootecnia, da UFRRJ (GUEDES JR, 2006).

### 3.2 Obtenção dos controles negativos para ELISA indireto de *B. burgdorferi*

Os soros utilizados como controles negativo foram gentilmente cedidos pelo Dr. Flávio Ribeiro de Araújo, Pesquisador do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, EMBRAPA, Campo Grande, MS.

### 3.3 Ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto para anticorpos homólogos a *B. burgdorferi*

Os experimentos referentes ao Elisa indireto para detecção de anticorpos homólogos a *Borrelia burgdorferi* foram realizados no laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ, no município de Seropédica - RJ.

As amostras de soros coletadas foram analisadas através do ensaio ELISA indireto padronizado por ISHIKAWA (1996). Para a sensibilização da placa Costar (3590), o antígeno foi diluído em tampão Coating buffer pH = 9,6, na concentração de 15 µg/mL, sendo mantida em câmara úmida à 4°C “over night”. A placa foi bloqueada com gelatina a 1% em PBS tween 20 0,05%, pH 7,4 e incubada por 1 hora em temperatura ambiente. Os soros testes, controles negativos e positivo foram diluídos à concentração de 1:400 em PBS tween 20 0,05% pH=7,4, e incubada por 1 hora em temperatura ambiente. Foi utilizado o conjugado anti-IgG bovino ligado a fosfatase alcalina (Sigma Chemical) diluído 1:1000 em PBS tween 20 0,05%, sendo incubada por 1 hora em temperatura ambiente, após o qual, foi adicionado à placa o substrato para-nitro-fenil-fosfato de sódio (PNPP – Sigma Chemical) diluído em tampão glicina pH=10,5 na concentração de 1mg/mL. Em todas as fases do ensaio foi utilizado 200µL de solução por poço e antes de cada etapa a placa foi lavada 3 vezes com PBS Tween 20 0,05%. Estas permaneceram a temperatura ambiente até a revelação e momento de leitura em espectrofotômetro para microplacas de 96 orifícios (Microplate

Reader model 550, Bio-Rad Laboratories), utilizando filtro para comprimento de onda de 405nm (GUEDES JR, 2006).

### **3.4 Determinação da linha de corte (cut-off) dos ELISAs para anticorpos homólogos *B. burgdorferi*.**

Os pontos de corte para os ensaios foram determinados segundo metodologia descrita por Frey et al. (1998), utilizando a distribuição t-Student, sendo a fórmula matemática expressa como o desvio-padrão multiplicado por um fator que é baseado no número de controles negativos e no intervalo de confiança:

$$\text{Cutoff} = \bar{X} + \text{SD} \cdot t \sqrt{1 + (1/n)}$$

Em que:

$\bar{X}$  : Média das leituras dos soros controles negativos

SD : Desvio-padrão

t : valor para a distribuição t, baseado em n e no percentual de nível de confiança desejado.

n : número de controles negativos.

Para cada placa, o ponto de corte foi calculado com 12 soros controle negativos, sendo o nível de confiança de 99,0% e valor de t igual a 2,829, segundo tabela com valores para t-distribuição para cálculo de ponto de corte (FREY *et al.*, 1998).

Os bovinos que apresentaram reatividade sorológica foi coletado sangue e os carrapatos presentes nos animais. Este material foi devidamente identificado e armazenado a temperatura de -20°C.

### **3.5 Biologia molecular**

Os experimentos referentes ao diagnóstico molecular foram realizados no laboratório de Biologia Molecular e Imunologia da área de Sanidade Animal da Embrapa Gado de Corte, no município de Campo Grande-MS, sob orientação do Dr Flávio Ribeiro de Araújo.

### **3.6 Isolado de *A. marginale* e *Borrelia* sp**

Foi utilizado o isolado brasileiro de *A. marginale* Pernambuco - Zona da Mata (AMBR), o qual estava mantido na forma de estabilizado de sangue infectado com 10% de glicerol, em nitrogênio líquido.

Como controles positivos das reações de PCR foi utilizado o isolado americano de *B. burgdorferi* G39/40, mantida em meio BSK em nitrogênio líquido no Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ, cedidas gentilmente pelo Dr. Natalino Hajime Yoshinari, professor da USP. E o isolado brasileiro de *Borrelia anserina* mantida por sucessivas passagens em galinhas, gentilmente cedida por Labruna (UFMG).

### 3.7 Extração de DNA total

Os bovinos que apresentaram sorologia positiva ao ELISA para *B. burgdorferi* com densidades ópticas próximas às do controle positivo, foram escolhidos para coleta de sangue e de carrapatos para extração de DNA. O protocolo utilizado para a extração de DNA de carrapatos está relatado no anexo A.

A extração do DNA genômico das culturas de *B. burgdorferi* e *B. anserina* utilizadas como controle positivo das reações de PCR, sangue de bovinos positivos a sorologia para *B. burgdorferi* e do isolado de *A. marginale* Pernambuco - Zona da Mata foram realizadas, com o auxílio do Kit comercial Easy-DNA (Invitrogen®) segundo recomendação do fabricante. A concentração do DNA extraído e a razão da absorbância 260/280 foram determinadas em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific®).

### 3.8 Oligonucleotídeos iniciadores para detecção de *Borrelia* sp

Primeiramente foram desenhados 12 oligonucleotídeos iniciadores baseados em genes do grupo *B. burgdorferi lato sensu* considerados conservados entre as espécies deste grupo (Tabela 1). Posteriormente, foram desenhados mais 20 oligonucleotídeos iniciadores, desta vez baseados em genes do grupo *B. theileri* (Tabela 2). Também foi utilizado um par de oligonucleotídeos iniciadores para o gen *rpoB* referenciado por LEE et al., (2000) (Tabela 3).

**Tabela 1:** Seqüências de oligonucleotídeos iniciadores (O.I.), tamanho do produto amplificado, temperatura de anelamento (TA) e região do genoma de *B. burgdorferi* B31.

GENE	O. I.	SEQÜÊNCIA (5' - 3')	PRODUTO (pb)	T.A. (°C)	REGIÃO
<i>16s 1</i>	F	GAGGTGATCCAGCCGCACTTTCCAGTA	734	60	444585 - 445318
	R	GTCTACGCTGTAACGATGCACACTTGGTG			
<i>16s 2</i>	F	CCAAGTGTGCATCGTTTACAGCGTAGACTA	826	57	445291 - 446116
	R	ATAACGAAGAGTTTGATCCTGGCTTAGAAC			
<i>fla A 1</i>	F	TTTTGCTCAAGAGACTGATGGATT	692	52	705630 - 706321
	R	TTGAAACTCTAAAAGCCTTAAATCTCATT			
<i>fla A 2</i>	F	CATCTGCTATGATTATGCCACCATTTA	844	52	705977 - 706821
	R	GCTGCCCT(G/A)AATATTCATCAATAGTATC			
<i>fla B</i>	F	AATAC(A/G)TCAGCTATTAATGCTTCAAGAAATAA	899	52	147746 - 148644
	R	ACAACCTCATCTGTCATTGTAGCATCTTTTAT			
<i>groel 1</i>	F	TTAGTGGCGTTGAAAAATTATCCAATG	532	52	688536 - 689068
	R	TTGCATACCCTCAACATAAGAAATCGTA			
<i>groel 2</i>	F	ACTACGATTTCTTATGTTGAGGGTATGC	416	52	689039 - 689454
	R	ATAGTTTTAGCCTGTCCAAGTTGCTCAA			
<i>groel 3</i>	F	CAACTTGGACAGGCTAAAA	656	52	689432 - 690087
	R	CCACCAGAAGTATTTTTCTCT			
<i>hbb</i>	F	GCTGCTAGAAAGCGAATAATTCATAAAA	641	52	237406 - 238046
	R	TTGCCCTTCAAATTCCTTCTACTATTAA			
<i>recA</i>	F	AGCTTGCAAGAGTTCAAATAG	839	52	126502 - 127340

	R	TTTTTGATTAAATTATGCTTAA			
<i>ospA</i>	F	TTGGAATAGGTCTAATATTAGCCTTAAT	800	52	9408 - 10207
	R	AAAGCGTTTTTAA(T/G)TTCATCAAGT			
<i>5s-23s</i>	F	CCAGTTATCCTGCCAAGGGTAA	289	52	435243 - 435531
	R	AGCGAATAAGAGCTTAACTTCTGTGTT			

**Tabela 2:** Seqüências de oligonucleotídeos iniciadores (O.I.), tamanho do produto amplificado, temperatura de anelamento (T.A.) e região do genoma de *B. burgdorferi* amplificado. Seqüências de oligonucleotídeos iniciadores baseados principalmente no genoma completo de *Borrelia hermsii* DAH (referência no genbank 314723) (grupo *B. burgdorferi* bactérias incultiváveis). O O.I. *p66 4* refere-se ao genoma completo de *B. recurrentis* (referência no genbank 412418), e os O.I. *p66 5*, *glp2* e *glp3* baseiam-se no genoma de *B. turicatae* (referência no genbank 314724).

GENE	O. I.	SEQUENCIA (5' - 3')	PRODUTO (PB)	T.A. (°C)	REGIÃO
<i>p66 1</i>	F	TGAAGG(A/T/G)GAAAAAGAATCATG	491	49	636106 - 636596
	R	TTTT(A/G)TCTGAACCTTAAAGTGA(A/T)C			
<i>p66 2</i>	F	TTTTCTATACTTGGACACATCTC	668	49	636081 - 636748
	R	TCTAC(C/T)CCAGCTTTTAGATATA			
<i>p66 3</i>	F	AAGATAATAAG(C/A)AAGGTCTTA	216	45	336984 - 337200
	R	TTTTTGATATGGATTCTAAA			
<i>p66 4</i>	F	AAAGCAATTTGATCCAGTAAGCAATAAGC	577	54	648648 - 649224
	R	ATTAAGGGTTCCTAGCATATGAGCACCTAC			
<i>p66 5</i>	F	GACGGTGAACAAGAATCATG	512	49	633426 - 633937
	R	TCTAC(C/T)CCAGCTTTTAGATATA			
<i>rrs 1</i>	F	TTCGCTTGTAGATGAGTCTGCGTCTTATTA	664	62	447935 - 448598
	R	AGGCGGCACACTTAACACGTTAGCT			
<i>rrs 2</i>	F	GCTTCGCTTGTAGATGAGTC	664	54	447937 - 448600
	R	GCGGCACACTTAACACGT			
<i>rrs 3</i>	F	AGTACCGAAGCTAACGTGTT	365	58	447603 - 447967
	R	ATAAGGGCCATGATGATTTG			
<i>rrs 4</i>	F	GCTTGTAGATGAGTCTGCGTCTTATTAG	511	57	448085 - 448595
	R	TTCGCCTCTGGTATTCTTCCTGATA			
<i>rrs 5</i>	F	TCCTGGTGTAAAGGGTGAATCTGTTGATA	541	59	447596 - 448136
	R	CCAGGACATAAGGGCCATGATGATTTGAC			
<i>rpob 1</i>	F	AGAAAATTGCAA(A/G)AGATAGAATGTC	257	53	405290 - 405546
	R	TCTACCATAATGCGTATAATGAACA			
<i>rpob 2</i>	F	TGGTGA(A/G)TTGCTTACAAATATA	301	49	405293 - 405593
	R	ACCATAATGGGTATAATGCACATC(C/T)CTTAC			
<i>glp2 1</i>	F	ACAAA(A/G)GATAATATTCTGTTAT	752	47	249541 - 250292
	R	TCTACTTTGCTTT(A/G)TTGAATA			

<i>glpQ 2</i>	F	TATGGCATAAACAACAAGGTAAAGATAT	443	54	249183 - 249625
	R	TAGGCCATCTATTTTAGCTTGATTA			
<i>glpQ 3</i>	F	ATTGCCTGTCAGAATGAAA	484	558	248708 - 249191
	R	TATGCCATAAGGGTTTTT			
<i>fla b 1</i>	F	GCTTGGAATGCAACCTG	517	47	148064 - 148580
	R	TGCTTGTGCAATCATAGC			
<i>fla b 2</i>	F	TGATCATAAATCATAATACGTCAGCTATA	462	54	148567 - 149028
	R	GTTGCATTCCAAGCTCTTCAG			
<i>16s 1</i>	F	TGAGTAACGCGTGGATAATCTGC	626	60	448085 - 448710
	R	TTCGCCTCTGGTATTCTTCCTGATA			
<i>16s 2</i>	F	GGTGAATCTGTTGATATCAGGAAGAATAC	527	59	447598 - 448124
	R	AGGACATAAGGGCCATGATGATTTGA			
<i>16s</i>	F	TCTGCCTACGAGATGGGGATAACTATTAG	589	55	448104 - 448692
	R	CTGATATCAACAGATTCCACCCTTACACCA			

**Tabela 3:** Seqüência de oligonucleotídeo iniciador utilizado para amplificação parcial do gene *rpoB* nos estudos de LEE et al. (2000), região correspondente ao genoma completo de *B. burgdorferi* ZS7 (referência no genbank 445985).

GENE	O. I.	SEQUENCIA (5' - 3')	PRODUTO (PB)	TA (°C)	REGIÃO
<i>rpoB</i> X	F	GATGATATTGACCATTTAGG	369	45	402948 - 403316
	R	TTCAGGGGTTTCAATAGGAC			

### 3.9 Oligonucleotídeos iniciadores para detecção de *A. marginale*

A amplificação *in vitro* do DNA de *A. marginale* isolado Pernambuco Zona da Mata, foi realizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores que estão listados na tabela 1, e estes, foram desenhados para amplificação de genes completos, baseados na seqüência do genoma do isolado Saint Maries de *A. marginale* disponível no Genbank, a maior parte deles tendo sido primeiramente utilizados por Ramos et al., (2007).

**Tabela 4:** Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos genes de *A. marginale* primers confeccionados utilizando as seqüências do genoma disponíveis no GenBank do isolado Saint Maries (referência no genbank 234826).

GENE	O.I.	SEQUÊNCIA (5' - 3')	PRODUTO (pb)	REGIÃO
<i>Omp 1</i>	F	AAGGTCTACGGCTTGGTTTACGCTGCGTTGCTTT	977	1027576 - 1025552
	R	AGTCTGATACCGCACTCAAACCCAAAATAGTCCAG		
<i>Omp 4</i>	F	CAGCATATCATTGAATACAGGAGGAAGTCGCTTAT	1128	1040447 - 1041574
	R	GTGGCTAGCCGCTTTGGAGATGTTACCAG		



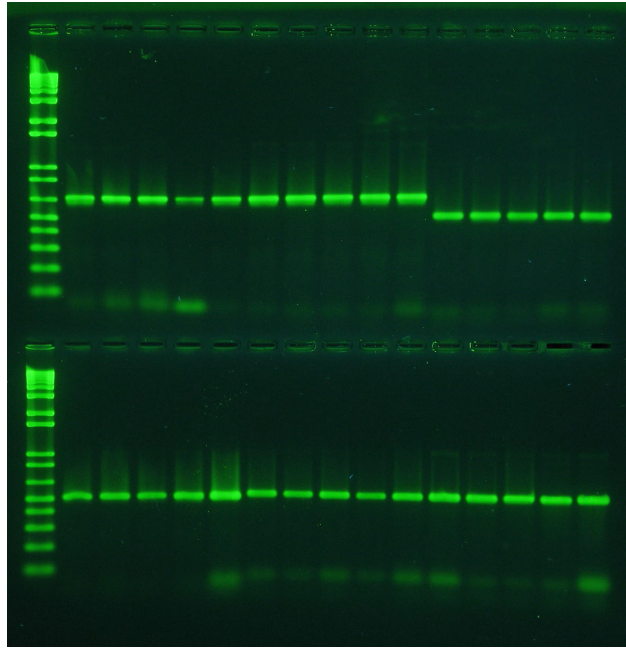
<i>Omp 5</i>	F	CTGGTGGTGGAGAGTTTGCCTATG	1112	1041985 - 1043096
	R	AACTCGAGCTTCAGCCCCAGATTG		
<i>Omp 7</i>	F	TCTTTTCTGTTGGGTGCGGTTGTA	1121	1088542 - 1089662
	R	CGCGCCTTGACATCTTCCTC		
<i>Omp 8</i>	F	TTTCTGTTGAGCGCGGTTGTAGTT	1127	1089797 - 1090923
	R	CGCGCTCTGATATTTCCCTTTCA		
<i>Omp 10</i>	F	TTGCTGCGTTGCGACGGTTTC	1202	1092307 - 1093508
	R	GCGAGATTCAACACCCCAAAGAG		
<i>Omp 14</i>	F	GCGTTTAGCCTCCTGTT	1207	63058 - 64247
	R	ATCCGAACCTGATTCTTA		
<i>Omp 15</i>	F	GAATTCACGCATATACCTTGGCTCACCGTT	422	900095 - 900516
	R	GAATTCCTATATTGCGTAGCCCCGAAGGATGCTGAGA		
<i>Am 097</i>	F	ATGAAAAAGGCTTTCATGGTTT	813	77775 - 78587
	R	CTACCCACGTCCCCTTCTG		
<i>Am 197</i>	F	ATGAAAAAGCTTGAGCTTGCTAG	510	166838 - 167347
	R	CTACTTGGGCTTTCTAGGAGCC		
<i>Am 254</i>	F	ATGACAGAAGGGAGAAAGCC	1182	832189 - 833370
	R	CTACTCCAAAATCTCAGTTATGATAC		
<i>Am 854</i>	F	ATGCTGCATCGTTGGTTAGC	711	789000 - 789710
	R	CTATTCAGGCGCGACCAC		
<i>Am 956</i>	F	ATGTGCTATGGTACTCGCATC	1605	876183 - 877787
	R	TCACTTTTCGTAATACTTCGACACA		
<i>Opag1</i>	F	AGTTGCAGAGCATTTTCCTTG	390	1030618 - 1031007
	R	CTAAAAAACCAAAAAAACCGT		
<i>Opag 3</i>	F	TGTGGGTTGCACACACTACC	936	1028730 - 1029665
	R	CTAAAAACCATCACCAAATGC		
<i>Virb 3</i>	F	TCGTCCGGTAGCGTAAAGAC	294	752143 - 752436
	R	CTACATCACATCGTAAGAATT		
<i>SodB</i>	F	TCACACACCCGCGGTTTCAAGCCT	664	752533 - 753196
	R	TCCGCTGCGCAGTTGGTATACAT		

### 3.10 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

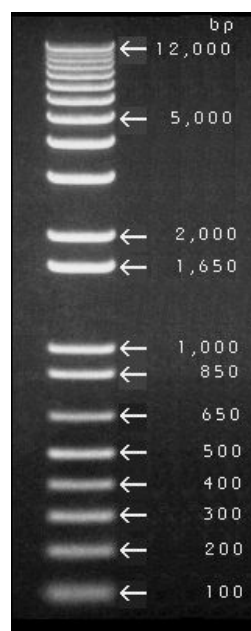
A reação de PCR foi preparada para volume final de 20µL contendo 10mM de tris-HCl (pH 8,5), 50mM de KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25mM de cada dNTPs, 100ng de cada oligonucleotídeo iniciador (senso e anti-senso), 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 100 ng de DNA genômico. Foi preparada uma reação para cada gene, e estas foram levadas ao termociclador da marca Mastercycler personal-Eppendorf®.

A reação de PCR foi definida pelos parâmetros de amplificação os quais foram: desnaturação inicial à 94°C por 4 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto (para as reações de amplificação de *A. marginale*), 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 água miliQ como controle negativo.

Todas as reações foram padronizadas para cada oligonucleotídeo iniciador, testando várias temperaturas para determinação de melhor temperatura de anelamento (Figura 5). Os produtos das PCRs foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% utilizando o marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder® - Invitrogen (Figura 6) e corados com Sybr Green® para visualização dos amplicons.



**Figura 5:** Figura esquemática da PCR de padronização realizada para todos os oligonucleotídeos iniciadores desenhados, para escolha da temperatura de anelamento que fornece o melhor padrão de amplificação dos DNAs controle positivo. Gel de agarose 1% corado com Sybr Green<sup>®</sup>. As amostras estão dispostas no gel da esquerda para direita a partir do gel superior na seguinte ordem contínua nas temperaturas 55, 57, 59, 61, 63° C: coluna 1 marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder<sup>®</sup> (Invitrogen); colunas 2 a 6 controle positivo (*B. burgdorferi*) *rrs1* (664 pb); coluna 7 a 11 controle positivo (*B. anserina*) *rrs1* (664 pb); coluna 12 a 16 controle positivo (*B. burgdorferi*) *rrs4* (511 pb); coluna 17 marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder<sup>®</sup> (Invitrogen)coluna 18 a 22 controle positivo (*B. anserina*) *rrs4* (511 pb); coluna 23 a 27 controle positivo (*B. burgdorferi*) *rrs5* (541 pb); coluna 28 a 32 controle positivo (*B. anserina*) *rrs5* (541 pb).

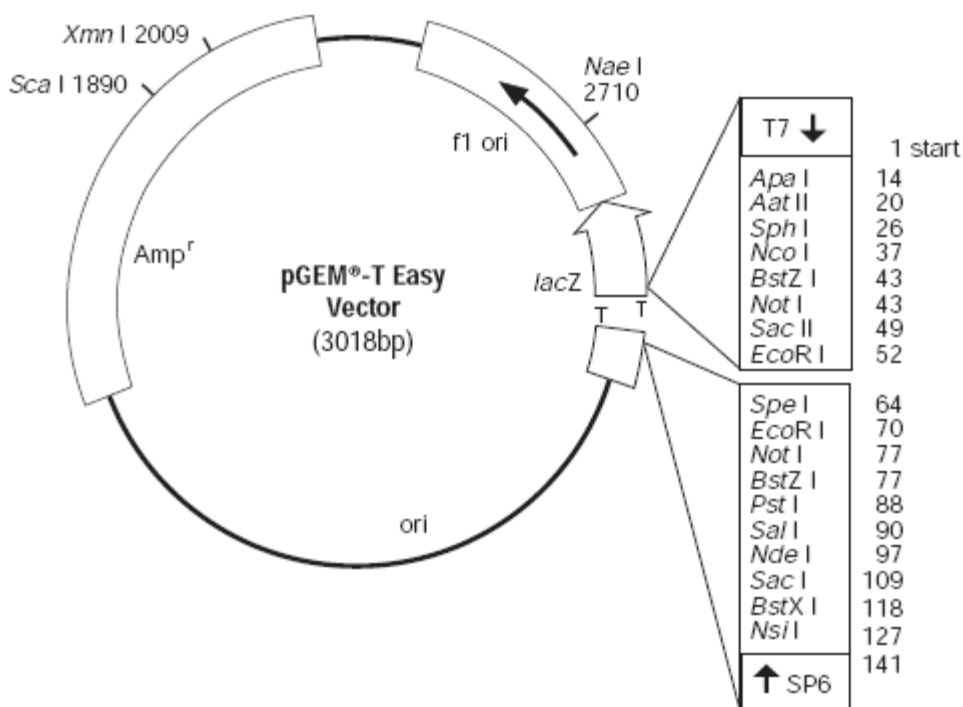


**Figura 6:** Marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder<sup>®</sup> - Invitrogen.

### 3.11 Clonagem dos fragmentos amplificados por PCR

#### 3.11.1 Ligação

Os fragmentos de DNA amplificados a partir de PCR de *A. marginale* e *Borrelia* sp foram inseridos em plasmídeo pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector (Promega) (Figura 7), e o mix das reações foi preparado segundo as proporções: 1 µL de plasmídeo, 3µL do produto de PCR, 1 µL da enzima T4 ligase, 5µL do tampão ligase 2X. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por uma hora em gelo.



**Figura 7:** Representação esquemática do plasmídeo pGEM<sup>®</sup>-T Easy utilizado para a clonagem dos fragmentos de DNA amplificados por PCR.

#### 3.11.2 Transformação

As ligações (vetor-inserto) de cada gene foram utilizadas na transformação de células competentes de *E. coli* TOP 10 (Invitrogen<sup>®</sup>) preparadas no Laboratório de Biologia Molecular (Embrapa Gado de Corte).

A reação de transformação consistiu da adição de 10µL da ligação para cada fragmento de gene amplificado às células *E. coli* TOP 10 (Invitrogen<sup>®</sup>), sendo homogeneizado levemente, e incubado em gelo por 30 minutos. A inserção dos plasmídeos ligados aos fragmentos amplificados dos genes de *A. marginale* nas células competentes foi realizado através de choque térmico de 30 segundos em banho-maria a 42°C e após este, 1 minuto e 30 segundos no gelo. Os tubos contendo as células transformadas foram adicionados de 900 µL de meio Luria–Bertani (LB) em capela de fluxo laminar e posteriormente, incubadas à 37°C, sob agitação horizontal por 1 hora. Após a incubação, as células transformadas foram semeadas em placas de Petri, contendo meio LB ágar adicionado de 100

µg/mL de ampicilina, com auxílio de uma alça de Drygalsky, sendo então incubadas por 12 horas a 37°C para o crescimento das colônias bacterianas.

### 3.12 PCR de colônia

Para identificação dos clones bacterianos que continham os insertos de interesse foi realizado PCR de colônia, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores respectivos para os genes. A PCR de colônia foi preparada seguindo os mesmos parâmetros da PCR convencional, substituindo o DNA por 1 clone bacteriano. Foram realizadas 10 reações de PCR, escolhendo aleatoriamente 10 colônias de cada placa específica de cada gene, aos quais, foram repicadas para uma nova placa de LB agar ampicilina. Os parâmetros de temperatura para programação do termociclador foram os mesmos da PCR convencional, alterando somente a desnaturação inicial a 94°C para 10 minutos.

Posteriormente os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e corados com Sybr green (Invitrogen<sup>®</sup>) para visualização dos amplicons.

### 3.13 Pré-inóculo e Mini-preparação de plasmídios

As colônias positivas para a presença do inserto foram cultivadas (pré-inóculo) em 10 mL de caldo LB. Os plasmídeos foram purificados usando o kit comercial Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), segundo orientação do fabricante.

### 3.14 PCR dos plasmídios contendo insertos

Para assegurar que os plasmídios obtidos após a extração das bactérias continham os insertos de interesse, foi realizado a PCR dos mesmos. Cada reação foi preparada segundo os parâmetros anteriormente descritos, com os oligonucleotídeos iniciadores específicos de cada gene e, utilizando como DNA 1 µL da preparação plasmidial. Posteriormente os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e corados com Sybr green (Invitrogen<sup>®</sup>) para visualização dos amplicons.

### 3.15 Sequenciamento dos plasmídios

Posteriormente a PCR, os plasmídios que continham os insertos de interesse foram submetidos ao seqüenciamento. As reações de seqüenciamento foram realizadas conforme recomendações do fabricante com BigDye Terminator (Applied Biosystems<sup>®</sup>). As seqüências gênicas foram obtidas com seqüenciador automático modelo ABI 3130 (Applied Biosystems<sup>®</sup>). Foram realizados quatro seqüenciamentos para cada gene, dois com o oligonucleotídeo iniciador M13 senso e dois com o oligonucleotídeo iniciador M13 anti-senso. Os genes foram montados e a seqüência consenso gerada com o auxílio do software Sequencher v.4.1.4 (Gene Codes). A busca por homologia foi realizada pelo algoritmo BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), comparando as seqüências obtidas com os seguintes isolados de *A. marginale*: Saint Maries (AMSM) (Genbank CP000030), Flórida (AMFL) (CP001079) e *A. marginale centrale* (AMCE) (CP001759).

A predição das seqüências de aminoácidos dos genes foram obtidas com o software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) e posteriormente o alinhamento múltiplo entre as seqüências foi realizado com o algoritmo CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) e BOXSHADE 3.21 ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)).

As árvores filogenéticas foram construídas pelo método de neighbor-joining com 1000 réplicas de bootstrap, para avaliar as relações entre as seqüências estudadas. Foram utilizados para efeito de comparação de seqüências isolados de *A. marginale* e *Borrelia* sp que possúsem sequenciamento completo de seu genoma depositados no genebank.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 *Borrelia* sp

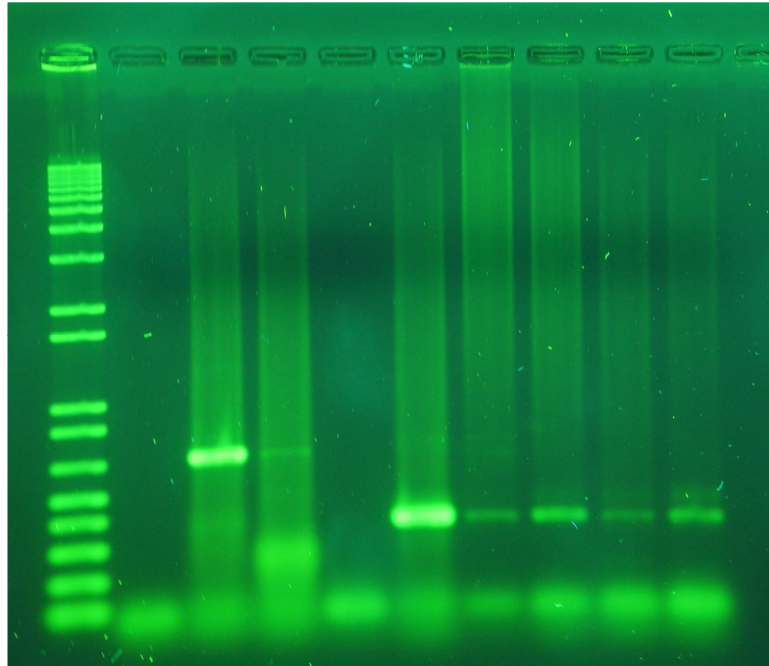
O ELISA indireto para pesquisa de anticorpos homólogos a *B. burgdorferi* revelou 11,75% (47) de positividade em relação aos animais avaliados. Destes foram selecionados 10 animais que apresentaram as densidades ópticas mais elevadas compatíveis com o controle positivo das placas. Para estes animais foram coletados sangue e os carrapatos encontrados fixados em seu corpo e, a partir deste material foi extraído DNA e realizadas as PCRs.

O conjunto de oligonucleotídeos iniciadores relativos aos genes *16S*, *fla*, *groel*, *hbb*, *recA*, *ospA*, *5S-23S*, baseados nos genes das espécies do grupo *B. burgdorferi*, tiveram suas reações padronizadas com o controle positivo de DNA cultura de *Borrelia burgdorferi* (Figura 5), tendo sua temperatura ótima de anelamento estabelecida e todos apresentaram ótimo desempenho, sendo capazes de amplificar o DNA de *B. burgdorferi* com segmento de nucleotídeos do tamanho esperado, demonstrando funcionalidade.

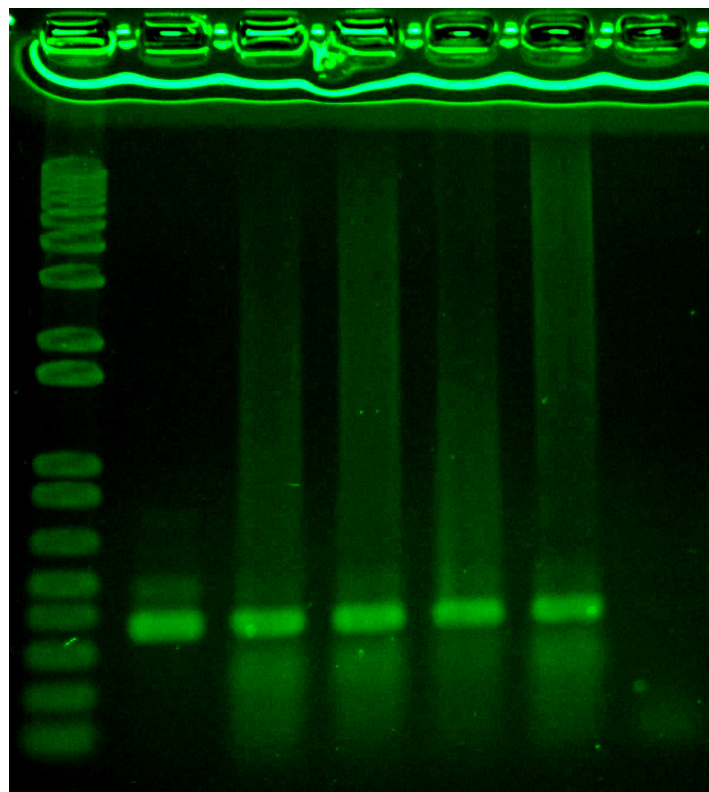
Porém, as PCRs utilizando o DNA relativo aos bovinos sorologicamente positivos, bem como o DNA dos carrapatos (*Rhipicephalus Boophilus microplus*) extraídos destes animais não apresentaram produto de amplificação.

Posteriormente aos resultados negativos apresentados pelo primeiro conjunto de oligonucleotídeos iniciadores, e discussões com Orientador e Co-orientador, foi levantada a hipótese de que o microrganismo presente no Brasil poderia não pertencer ao grupo de *B. burgdorferi*. Com isso, deu-se início a segunda etapa que consistiu no desenho de 20 oligonucleotídeos iniciadores desta vez baseados nos genes *p66*, *rrs*, *rpob*, *glpQ*, *fla*, *16S* pertencentes ao grupo *Borrelia theileri* (Tabela 5). Todas as reações de PCR foram igualmente padronizadas desta vez com DNA proveniente de *B. anserina* e as temperaturas ótimas de anelamento foram estabelecidas. Todos os oligonucleotídeos iniciadores foram capazes de amplificar os DNAs molde de *B. anserina* apresentando segmento de nucleotídeos do tamanho esperado, demonstrando funcionalidade. Foi então dado início aos testes com os DNAs de bovinos e carrapatos.

Os DNAs extraídos a partir do sangue de bovinos positivos pelo teste ELISA indireto, após reação de PCR, apresentaram amplificação para os oligonucleotídeos iniciadores *rrs1*, *rrs3* (Figura 8) e *rpoBX* (Figura 9). Os fragmentos foram então clonados em plasmídios pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vectors (Promega) e transformados em células competentes *E. coli* TOP 10<sup>®</sup> (Invitrogen). Após a PCR de colônia e confirmação da presença dos insertos, foi realizado o pré-inóculo e a mini preparação plasmidial e nova PCR foi realizada para confirmação que os fragmentos se encontravam inseridos nos plasmídios. Os plasmídios foram submetidos à reação de sequenciamento e o produto da reação foi analisado e comparado a outras seqüências depositadas no Genbank. Não foi obtido êxito na clonagem do produto de amplificação do oligonucleotídeo iniciador *rrs1*, não sendo possível seu sequenciamento.



**Figura 8:** Gel de agarose 1% relativo aos produtos de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores *rrs1* (664pb) e *rrs3*(365 pb) corado com Sybr green<sup>®</sup> (Invitrogen). As amostras estão dispostas no gel da esquerda para direita na seguinte ordem: coluna 1 marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder<sup>®</sup> (Invitrogen); coluna 2 controle negativo da PCR *rrs1*; coluna 3 Controle positivo *rrs1*; coluna 4 DNA *R. (Boophilus) microplus* vaca Tieta; coluna 5 controle negativo da PCR *rrs3*; coluna 6 controle positivo *rrs3*; colunas 7 a 10 DNA sangue bovinos Floresta, Vitória, Bezerro Chita e Tieta.





**Figura 9:** Gel de agarose 1% relativo aos produtos de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores *rpoBX* (370pb) corado com Sybr Green® (Invitrogen). As amostras estão dispostas no gel da esquerda para direita na seguinte ordem: coluna 1 marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder® (Invitrogen); coluna 2 Controle positivo *rpoB*; coluna 3 extração DNA sangue bovino Tieta; coluna 4 extração DNA sangue bovino Floresta; coluna 5 extração DNA sangue bovino Vitória; colunas 6 extração DNA sangue bovino nº 69; coluna 6 controle negativo de reação.

O alinhamento múltiplo das seqüências preditivas de aminoácidos de RRS do isolado de *Borrelia* proveniente de sangue de bovinos do Brasil (B\_Brasil) estão dispostos na figura 10.

```

rrs_B_garinii      1 STEANVLSVPPGGEYARKSETQORNRGPAQAVEHVVFDDTRGTLPLGLDIYRILEITIPRLGS
rrs_B_burgdorferi 1 STEANVLSVPPGGEYARKSETQORNRGPAQAVEHVVFDDTRGTLPLGLDIYRILEITIPRLGS
rrs_B_afzelii     1 STEANVLSVPPGGEYARKSETQORNRGPAQAVEHVVFDDTRGTLPLGLDIYRILEITIPRLGS
rrs_B_hermsii    1 STEANVLSVPPGGEYARKSETQORNRGPAQAVEHVVFDDTRGTLPLGLDIYRILEITIPRLGS
rrs_B_recurrentis 1 STEANVLSVPPGGEYARKSETQORNRGPAQAVEHVVFDDTRGTLPLGLDIYRILEITIPRLGS
rrs_B_turicatae   1 STEANVLSVPPGGEYARKSETQORNRGPAQAVEHVVFDDTRGTLPLGLDIYRILEITIPRLGS
rrs_B_duttonii   1 STEANVLSVPPGGEYARKSETQORNRGPAQAVEHVVFDDTRGTLPLGLDIYRILEITIPRLGS
rrs_B_theileri    1 STEANVLSVPPGGEYARKSETQORNRGPAQAVEHVVFDDTRGTLPLGLDIYRILEITIPRLGS
rrs_B_Brasil     1 STEANVLSVPPGGEYARKSETQORNRGPAQAVEHVVFDDTRGTLPLGLDIYRILEITIPRLGS

rrs_B_garinii     61 IYRCCMVVVSSCCEVLGVPQRAOPLLSVTSMTWGLR-DCFVGGR-GRQIIMAL
rrs_B_burgdorferi 61 IYRCCMVVVSSCCEVLGVPQRAOPLLSVTSMTWGLR-DCFVGGR-GRQIIMAL
rrs_B_afzelii     61 IYRCCMVVVSSCCEVLGVPQRAOPLLSVTSMTWGLR-DCFVGGR-GRQIIMAL
rrs_B_hermsii    61 WYRCCMVVVSSCCEVLGVPQRAOPLLSVTSMTWGLRRDCRAGGR-GRQIIMAL
rrs_B_recurrentis 61 WYRCCMVVVSSCCEVLGVPQRAOPLLSVTSMTWGLRRDCRAGGR-GRQIIMAL
rrs_B_turicatae   61 WYRCCMVVVSSCCEVLGVPQRAOPLLSVTSMTWGLRRDCRAGGR-GRQIIMAL
rrs_B_duttonii   61 WYRCCMVVVSSCCEVLGVPQRAOPLLSVTSMTWGLRRDCRAGGR-GRQIIMAL
rrs_B_theileri    61 WYRCCMVVVSSCCEVLGVPQRAOPLLSVTSMTWGLRRDCRAGGR-GRQIIMAL
rrs_B_Brasil     60 IYRCCMVVVSSCCEVLGVPQRAOPLLSVTSMTWGLRRDCRAGGR-GRQIIMAL

```

**Figura 10:** Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de fragmento de RRS de isolado proveniente de bovino (B\_Brasil) sorologicamente reativo à *B. burgdorferi* comparado às seqüências de espécies de *Borrelia* do grupo *B. burgdorferi* e febre recorrente, disponíveis no Genbank (*B. garinii*, *B. burgdorferi*, *B. afzelli*, *B. hermsii*, *B. recurrentis*, *B.turicatae*, *B. duttonii*, *B.theileri*).

Os resultados referentes às seqüências preditivas de aminoácidos disponíveis no Genbank para espécies de borrelia com o genoma completo seqüenciado, sendo três espécies do grupo *B. burgdorferi* (*B. burgdorferi*, *B. garini* e *B. afzelli*) e cinco espécies pertencentes ao grupo de febre recorrente (*B. hermsii*, *B. recurrentis*, *B.turicatae*, *B. duttonii*, *B.theileri*) (Tabelas 5 e 6). Das espécies relacionadas à febre recorrente, apenas *B. theileri* não possui o sequenciamento completo de seu genoma até o presente momento e foi inserida nas comparações devido a ser a espécie incriminada por acometer a espécie bovina.

**Tabela 5:** Porcentual de homologia determinado entre a seqüência preditiva de aminoácidos de um fragmento de RRS (112 aas) amplificado a partir de amostra de DNA de sangue de bovino com sorologia positiva para *B. burgdorferi* comparado às seqüências de espécies de *Borrelia* do grupo *B. burgdorferi* e febre recorrente. Dados gerados a partir do programa CLUSTAL W.



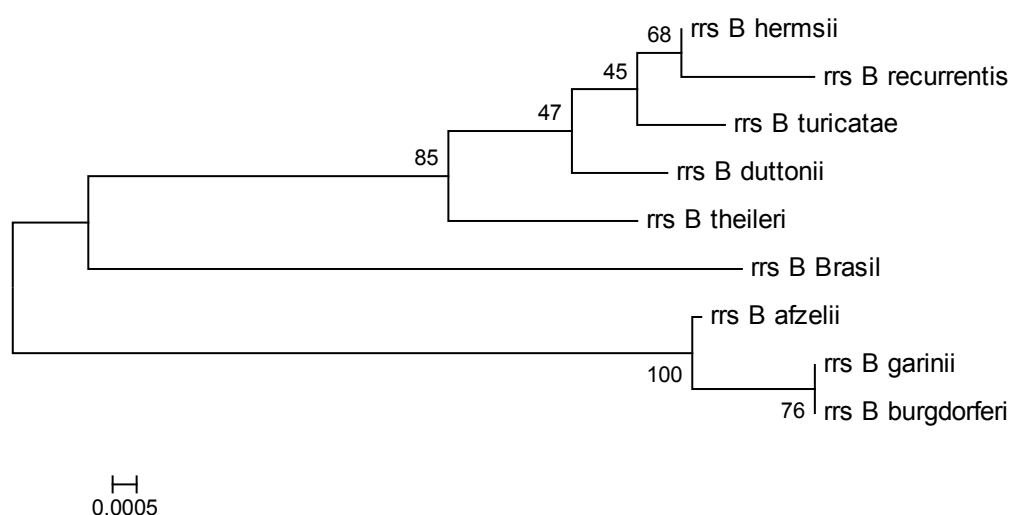
<b>Espécie de <i>Borrelia</i></b>	<b>% Homologia</b>
<i>Borrelia duttonii</i>	94
<i>Borrelia recurrentis</i>	92
<i>Borrelia theileri</i>	93
<i>Borrelia hermsii</i>	93
<i>Borrelia turicatae</i>	94
<i>Borrelia burgdorferi</i>	95
<i>Borrelia garinii</i>	95
<i>Borrelia afzelli</i>	96

**Tabela 6:** Porcentual de homologia determinado a partir da comparação entre as seqüências preditivas de aminoácidos de um fragmento de RRS das espécies de *Borrelia* do grupo *B. burgdorferi* e febre recorrente (*B. garinii*, *B. burgdorferi*, *B. afzelli*, *B. hermsii*, *B. recurrentis*, *B. turicatae*, *B. duttonii*, *B. theileri*). Dados gerados a partir do programa CLUSTAL W.

<b>Espécie de <i>Borrelia</i></b>	<b>Nº aas RRS</b>	<b>Relação</b>	<b>% Homologia</b>
<i>B. duttonii</i>	113	<i>B. recurrentis</i>	99
		<i>B. theileri</i>	98
		<i>B. hermsii</i>	100
		<i>B. turicatae</i>	100
		<i>B. garinii</i>	95
		<i>B. afzelli</i>	96
		<i>B. burgdorferi</i>	95
<i>B. garinii</i>	111	<i>B. theileri</i>	95
		<i>B. hermsii</i>	95
		<i>B. turicatae</i>	95
		<i>B. recurrentis</i>	94
		<i>B. afzelli</i>	100
		<i>B. burgdorferi</i>	100
<i>B. afzelli</i>	110	<i>B. recurrentis</i>	95
		<i>B. hermsii</i>	96
		<i>B. turicatae</i>	96
		<i>B. theileri</i>	96
		<i>B. burgdorferi</i>	100
<i>B. hermsii</i>	112	<i>B. recurrentis</i>	99

		<i>B. turicatae</i>	100
		<i>B. theileri</i>	98
		<i>B. burgdorferi</i>	95
<i>B. turicatae</i>	113	<i>B. recurrentis</i>	99
		<i>B. theileri</i>	98
		<i>B. burgdorferi</i>	95
<i>B. burgdorferi</i>	111	<i>B. recurrentis</i>	94
		<i>B. theileri</i>	95
<i>B. recurrentis</i>	112	<i>B. theileri</i>	97

Baseado nos resultados da tabela 5 é possível afirmar que as seqüências preditivas de aminoácidos de borrelias do grupo febre recorrente e do grupo *B. burgdorferi* apresentaram homologia de 92 a 94% e 95 a 96%, respectivamente, em relação à seqüência obtida para o isolado brasileiro no presente trabalho para RRS. Este fato sugere que a seqüência do isolado brasileiro é mais próxima do grupo *B. burgdorferi*, porém, estas mesmas seqüências preditivas de aminoácidos foram usadas para construção de uma árvore filogenética (Figura 11) que apresenta a seqüência do isolado brasileiro de borrelia (B Brasil) agrupado juntamente com o grupo de febre recorrente, sugerindo maior proximidade a este grupo.



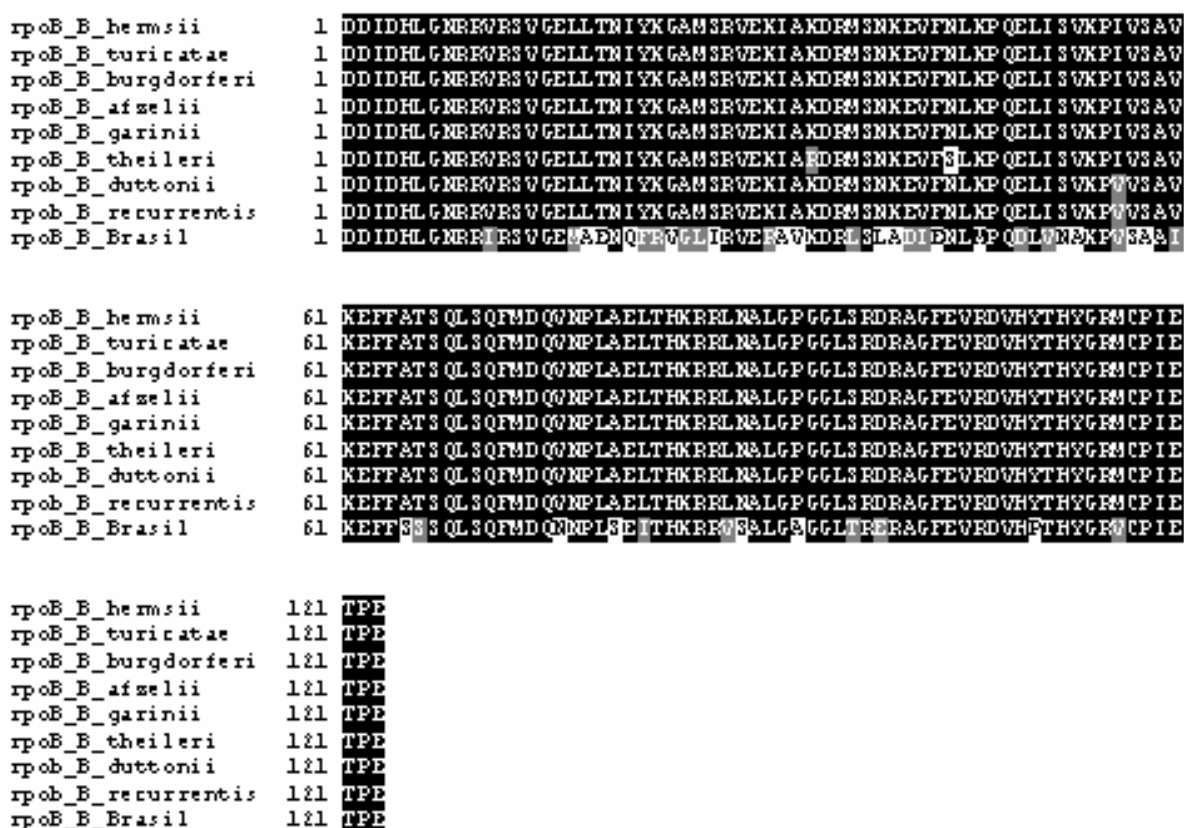
**Figura 11:** Árvore filogenética obtida através do método neighbor-joining contendo as seqüências de fragmentos de RRS de espécies de *Borrelia* do grupo *B. burgdorferi* e febre recorrente disponíveis no Genbank e a seqüência preditiva de aminoácidos de *Borrelia* isolado Brasileiro (B Brasil), amplificadas a partir do oligonucleotídeo iniciador *rrs3* (112 aminoácidos) DNA proveniente de bovino sorologicamente reativo à *B. burgdorferi*. Os números nos nós indicam os valores de bootstrap para 1000 réplicas.

A tabela 6 compara somente as seqüências preditivas de aminoácidos de RRS das espécies do grupo *B. burgdorferi* e febre recorrente (excluindo-se o isolado brasileiro), apresentando homologia de 97 a 100% quando seqüências do mesmo grupo foram

comparadas e 94 a 96% quando de grupos diferentes. Portanto, a proteína RRS apresenta-se conservada nas espécies do grupo *B. burgdorferi* e febre recorrente estudadas.

A espécie de *Borrelia* proveniente dos bovinos sorologicamente positivos das áreas brasileiras estudadas, baseado na árvore filogenética construída através das seqüências preditivas parciais de aminoácidos de RRS, demonstrou maior proximidade ao grupo da febre recorrente, sendo alocada no mesmo ramo.

O alinhamento múltiplo das seqüências preditivas de aminoácidos de RPOB do isolado de *Borrelia* proveniente de sangue de bovinos do Brasil (B\_Brasil) estão dispostos na figura 12. O porcentual de homologia apresentado pelas seqüências preditivas de aminoácidos de RPOB das espécies de *Borrelia* do grupo *B. burgdorferi* e do grupo de febre recorrente em relação à seqüência obtida para o isolado brasileiro estão dispostas nas tabelas 7 e 8, os quais foram construídas utilizando os mesmos parâmetros que as tabelas 5 e 6.



**Figura 12:** Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de fragmento de RPOB de isolado proveniente de bovino (B\_Brasil) sorologicamente reativo à *B. burgdorferi* comparado às seqüências de espécies de *Borrelia* do grupo *B. burgdorferi* e febre recorrente, disponíveis no Genbank (*B. garinii*, *B. burgdorferi*, *B. afzelli*, *B. hermsii*, *B. recurrentis*, *B.turicatae*, *B. duttonii*, *B.theileri*).

**Tabela 7:** Porcentual de homologia determinado entre a seqüência preditiva de aminoácidos de um fragmento de RPOB (123 aas) amplificado a partir de amostra de DNA de sangue de bovino com sorologia positiva para *B. burgdorferi* comparado às seqüências de espécies de *Borrelia* do grupo *B. burgdorferi* e febre recorrente. Dados gerados a partir do programa CLUSTAL W.

<b>Espécie de <i>Borrelia</i></b>	<b>% Homologia</b>
<i>B. hermsii</i>	66
<i>B. turicatae</i>	66
<i>B. duttonii</i>	67
<i>B. recurrentis</i>	67
<i>B. theileri</i>	65
<i>B. burgdorferi</i>	66
<i>B. garinii</i>	66
<i>B. afzelli</i>	66

**Tabela 8:** Porcentual de homologia determinado a partir da comparação entre as seqüências preditivas de aminoácidos de um fragmento de RPOB (123 aas) das espécies de *Borrelia* do grupo *B. burgdorferi* e febre recorrente (*B. garinii*, *B. burgdorferi*, *B. afzelli*, *B. hermsii*, *B. recurrentis*, *B. turicatae*, *B. duttonii*, *B. theileri*). Dados gerados a partir do programa CLUSTAL W.

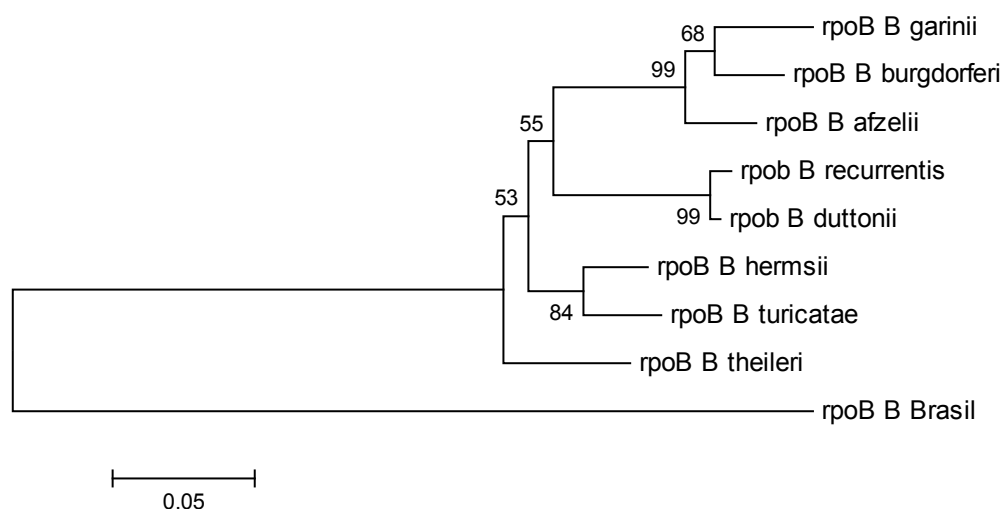
<b>Espécie de <i>Borrelia</i></b>	<b>Comparação</b>	<b>% Homologia</b>
<i>B. theileri</i>	<i>B. recurrentis</i>	97
	<i>B. duttonii</i>	97
	<i>B. hermsii</i>	98
	<i>B. turicatae</i>	98
	<i>B. garinii</i>	98
	<i>B. afzelli</i>	98
	<i>B. burgdorferi</i>	98
<i>B. garinii</i>	<i>B. duttonii</i>	99
	<i>B. hermsii</i>	100
	<i>B. turicatae</i>	100
	<i>B. recurrentis</i>	99
	<i>B. afzelli</i>	100
	<i>B. burgdorferi</i>	100
<i>B. afzelli</i>	<i>B. hermsii</i>	100
	<i>B. turicatae</i>	100
	<i>B. recurrentis</i>	99
	<i>B. duttonii</i>	99
	<i>B. burgdorferi</i>	100

<i>B. burgdorferi</i>	<i>B. hermsii</i>	100
	<i>B. turicatae</i>	100
	<i>B. recurrentis</i>	99
	<i>B. duttonii</i>	99
<i>B. hermsii</i>	<i>B. turicatae</i>	100
	<i>B. recurrentis</i>	99
	<i>B. duttonii</i>	99
<i>B. turicatae</i>	<i>B. recurrentis</i>	99
	<i>B. duttonii</i>	99
<i>B. recurrentis</i>	<i>B. duttonii</i>	100

Baseado nos resultados da tabela 7 é possível afirmar que as seqüências preditivas de aminoácidos de RRS de borrelias do grupo febre recorrente e do grupo *B. burgdorferi* apresentaram homologia de 65 a 67% e de 66%, respectivamente, em comparação à seqüência obtida para o isolado brasileiro. Este fato sugere, que a seqüência do isolado brasileiro é mais próxima do grupo febre recorrente.

A tabela 8 compara somente as seqüências preditivas de aminoácidos de RPOB das espécies do grupo *B. burgdorferi* e febre recorrente (excluindo-se o isolado brasileiro), apresentando níveis de homologia superiores a 97% quando comparadas entre e dentro dos grupos, sendo que os menores índices foram observados quando a seqüência de *B. theileri* foi comparada às demais. Se excluirmos *B. theileri* das comparações, os níveis de homologia serão entre 99 e 100%. A homologia apresentada na tabela 7 para RPOB foi superior a mesma comparação efetuada na tabela 5 para RRS, indicando que a proteína RPOB é mais conservada que RRS nos fragmentos estudados.

A árvore filogenética (Figura 13) construída a partir das mesmas seqüências preditivas de aminoácidos usadas na tabela 7, é possível observar a formação de 2 grupos, Febre recorrente e *B. burgdorferi*, entretanto, a seqüência de *B. theileri* não está contida no grupo Febre recorrente, como seria o esperado. A seqüência do isolado brasileiro de borrelia (B Brasil) também não foi agrupada em nenhum dos dois grupos, sendo situado como um grupo à parte. Considerando que o porcentual de homologia apresentado pelo isolado brasileiro foi inferior a 67%, isto é perfeitamente aceitável. Porém, como *B. theileri* apresentou homologia superior a 97% entre as seqüências dos grupos de borrelia estudados, sendo esperado que fosse alocada em um deles.



**Figura 13:** Árvore filogenética obtida através do método neighbor-joining contendo as seqüências de fragmentos de RPOB de espécies de *Borrelia* do grupo *B. burgdorferi* e febre recorrente disponíveis no Genbank e a seqüência preditiva de aminoácidos de *Borrelia* isolado Brasileiro (B Brasil), amplificados a partir do oligonucleotídeo iniciador *rrs3* (112 aminoácidos) DNA proveniente de bovino sorologicamente reativo à *B. burgdorferi*. Os números nos nós indicam os valores de bootstrap para 1000 réplicas.

#### 4.2 *A. marginale*

As seqüências preditivas de aminoácidos das proteínas de membrana do isolado brasileiro de *A. marginale* e os isolados americanos revelaram níveis de homologia superiores a 92% na maior parte das seqüências demonstrando conservação e estão resumidos na Tabela 9.

**Tabela 9:** Homologia apresentada pelas seqüências de aminoácidos do isolado brasileiro de *A. marginale* com as seqüências AMSM, AMFL e AMCE.

Proteína AMBR	Número de aas	Nº acesso GenBank AMBR	AMSM	AMFL	AMCE
AM854	236	GU991617	100	100	-
OMP1	329	GU991619	99	99	72
OMP4	404	GU991620	92	92	66
OMP5	380	GU991621	97	94	75
OMP7	381	GU991622	65	72	40
OMP8	399	GU991623	97	92	66
OMP10	420	GU991624	100	98	65
OMP14	404	GU991625	95	94	70
OMP15	147	GU991626	94	#	*
OPAG1	130	GU991627	100	100	*
OPAG3	312	GU991628	95	95	66
EF-Tu	393	GU991618	100	100	97
PepA	518	GU991629	97	97	65

<b>VirB3</b>	98	GU991632	100	100	96
<b>ViB9-1</b>	270	GU991631	97	100	97
<b>SODb</b>	223	GU991630	99	100	89

\* *A. marginale centrale* não possui os genes que codificam as proteínas OMP15 e OPAG1 em seu genoma;

# A seqüência preditiva de aminoácidos da proteína OMP15 de *A. marginale* isolado Florida (disponível no Genbank) está incompleta.

Os isolados americanos apresentaram seqüências preditivas de aminoácidos da proteína OPAG1 e OPAG3 idênticas entre si, e, em relação a AMBR, demonstraram homologia de 100% e 95%, respectivamente (Figuras 14 e 15). AMCE não possui o gene *opag1* o que não permitiu a organização da árvore filogenética, e sua seqüência preditiva de aminoácidos de OPAG3 apresentou apenas 66% de homologia com a seqüência de AMBR. A árvore filogenética de OPAG3 (Figura 16) confirma o percentual de homologia entre os isolados AMSM, AMFL, AMBR e um maior distanciamento do isolado AMCE. Portanto, apesar de o grau de conservação do gene *opag1* ter sido superior ao apresentado pelo gene *opag3* para os isolados de *A. marginale* isolado Saint Maries e Flórida, OPAG3 provavelmente representa um melhor candidato a componente vacinal, o quanto dessa proteção é conferida por OPAG3 ainda é desconhecido. Apesar do gene *opag1* apresentar-se conservado em *A. marginale*, este gene não está presente no isolado *A. marginale centrale*, e considerando-se que os genes contidos neste isolado são capazes de conferir imunidade aos bovinos, sendo suficiente para prevenir o desenvolvimento de doença clínica (PIPANO, 1995), provavelmente, esta proteína não é essencial para a construção da resposta imune protetora contra *A. marginale*.

```

OPAG1_AMBR      1  MSCRAFSLKGLLAFTLLPGSLATAARPSLLRVGGEASGQQTSGGGFHAAGGASATRGRLT
OPAG1_AMSM      1  MSCRAFSLKGLLAFTLLPGSLATAARPSLLRVGGEASGQQTSGGGFHAAGGASATRGRLT
OPAG1_AMFL      1  MSCRAFSLKGLLAFTLLPGSLATAARPSLLRVGGEASGQQTSGGGFHAAGGASATRGRLT

OPAG1_AMBR     61  SASAVSAPQSFVGLGSTVWEDGFLPSVVFSPAQELLSAALQPSPTPSSWVFGRTAISGVRG
OPAG1_AMSM     61  SASAVSAPQSFVGLGSTVWEDGFLPSVVFSPAQELLSAALQPSPTPSSWVFGRTAISGVRG
OPAG1_AMFL     61  SASAVSAPQSFVGLGSTVWEDGFLPSVVFSPAQELLSAALQPSPTPSSWVFGRTAISGVRG

OPAG1_AMBR    121  FLERTVFLVF
OPAG1_AMSM    121  FLERTVFLVF
OPAG1_AMFL    121  FLERTVFLVF

```

**Figura 14** - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de OPAG1, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.

OPAG3_AMSM	1	VCGLHTLPSSVRRWGVFGSVCWIVCMSIRGRACCSILACGALVAASGAVCTGANAGTRGF
OPAG3_AMFL	1	VCGLHTLPSSVRRWGVFGSVCWIVCMSIRGRACCSILACGALVAASGAVCTGANAGTRGF
OPAG3_AMBR	1	VCGLHTLPSSVRRWGVFGSVCWIVCMSIRGRACCSILACGALVAASGAVCTGANAGTRGF
OPAG3_AMCE	1	VCGLHTLPSSVRRWGVFGSVCWIVCMSIREKACGGIILTCGALVAFAAGACTNADAGVRGF
OPAG3_AMSM	61	YATLGGELGVANFGFPSVKTHGVPGAVLGVDKGSEQLVRFDELGLAAPT-RDGFGAHYLP
OPAG3_AMFL	61	YATLGGELGVANFGFPSVKTHGVPGAVLGVDKGSEQLVRFDELGLAAPT-RDGFGAHYLP
OPAG3_AMBR	61	YATLGGELGVANFGFPSVKTHGVPGAVLGVDKGSEQLVRFDELGLAAPT-RDGFGAHYLP
OPAG3_AMCE	61	YVALGGELGVASFGFPSVKTHGVPGAVLGVDKGSEQLVRFDELGLAAPT-RDGFGAHYLP
OPAG3_AMSM	120	KYENSLGLSGALGYSFDSFRLQLSAYSSSFSDGGSYAVSGNAAWFAFSPGKVSDDGGST
OPAG3_AMFL	120	KYENSLGLSGALGYSFDSFRLQLSAYSSSFSDGGSYAVSGNAAWFAFSPGKVSDDGGST
OPAG3_AMBR	120	KYENSLGLSGALGYSFDSFRLQLSAYSSSFSDGGSYAVSGNAAWFAFSPGKVSDDGGST
OPAG3_AMCE	121	RYRRSVGLSGALGYGFGPLRLQLGTYSGSFSDGGGHAVSNSSWFAFSPGEGFPNGGCP
OPAG3_AMSM	180	AEYHIGEVSGVGLNSVELSACYSGVGAFAGRHFGLYSCLGLGVSSVDYWGSRGSLVLSWSG
OPAG3_AMFL	180	AEYHIGEVSGVGLNSVELSACYSGVGAFAGRHFGLYSCLGLGVSSVDYWGSRGSLVLSWSG
OPAG3_AMBR	180	AEYHIGEVSEVGLNSVELSACYSGVGTTFGGRFGLYPCGLGLGVSSVDYWGSRGSLVLSWSG
OPAG3_AMCE	181	AGYSVGEVLEVGLSSVELSACYSSFSAGGSFGLYSCLGLGVSSVDYWGLRGGLALSWSG
OPAG3_AMSM	240	RTGVEYNLGPRLSLFAEAYYLGTDTTEEHAGGGPTLLSTSSGVPS-VDADVLPVLSVGYF
OPAG3_AMFL	240	RTGVEYNLGPRLSLFAEAYYLGTDTTEEHAGGGPTLLSTSSGVPS-VDADVLPVLSVGYF
OPAG3_AMBR	240	RTGVEYNLGSRLSLFAEAYYLGTDTTEEHTGGGPTLLSTSSGVPS-VDADVLPVLSMGYF
OPAG3_AMCE	241	RTGVEYTLSSGFTLFAEAYYLGANVEERTDGGGPVLRITVGSMPSSDGGVGVLPALSTGYF
OPAG3_AMSM	299	GGIAGVRCAFGDGF
OPAG3_AMFL	299	GGIAGVRCAFGDGF
OPAG3_AMBR	299	GGIAGVRCAFGDGF
OPAG3_AMCE	301	GGVTGVRVAFDGSF

**Figura 15** - Alinhamento múltiplo da sequência preditiva de aminoácidos de OPAG3, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.



**Figura 16** – Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína OPAG3 dos isolados de *A. marginale* AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.

No presente trabalho foram estudadas as seqüências preditivas de aminoácidos das proteínas OMP1, 4, 5, 7, 8, 10, 14 e 15. Na tabela 9 é possível observar que o isolado AMCE apresentou homologia de 72%, 66%, 75%, 38%, 65%, 65% e 70% respectivamente, em



relação às seqüências de AMBR, tendo em vista que não possui o gene que codifica a proteína OMP15.

Considerando as OMPs de AMBR estudadas, OMP1, OMP5 e OMP10 provavelmente assumem maior importância entre os antígenos derivados da membrana dessa riquetsia devido a apresentarem homologia superior a 92% em relação às seqüências preditivas de aminoácidos proteínas de *A. marginale* estudadas (Tabela 9, Figuras 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 e 30). Através das árvores filogenéticas produzidas com as seqüências preditivas de aminoácidos das OMPs citadas (Figuras 17, 19, 21, 23, 25, 27 e 29), foi possível confirmar o grau de proximidade entre os isolados estudados.

```

OMP1_AMSM      1  MKKVVYGLVYAAISLLFTPCGSFASPRPIDFSRGE GASGFFASVQYKLAIPHFRDFTVEDK
OMP1_AMFL      1  MKKVVYGLVYAAISLLFTPCGSFASPRPIDFSRGE GASGFFASVQYKLAIPHFRDFTVEDK
OMP1_AMDR      1  MKKVVYGLVYAAISLLFTPCGSFASPRPIDFSRGE GASGFFASVQYKLAIPHFRDFTVEDK
OMP1_AMCE      1  MKKVVYGLVYAAISLLFTPCGSFASPRPIDFSRGE GASGFFASVQYKLAIPHFRDFTVEDK

OMP1_AMSM      61  GKALNTFAMKEKQQCGTAKAAA GAATPPAAPSCAEAPPKGPDLAS GGSFE GKYSPEYLR
OMP1_AMFL      61  GKALNTFAMKEKQQCGTAKAAA GAATPPAAPSCAEAPPKGPDLAS GGSFE GKYSPEYLR
OMP1_AMBR      61  GKALNTFAMKEKQQCGTAKAAA GAATPPAAPSCAEAPPKGPDLAS GGSFE GKYSPEYLR
OMP1_AMCE      61  GKALNTFAMKEKQQCGTAKAAA GAATPPAAPSCAEAPPKGPDLAS GGSFE GKYSPEYLR

OMP1_AMSM      121 SAKAGSVSVGY SAGNVRLEAECMYQKFP VDTKKYKDNPERAYRFAI SAPDENSTIVATRP
OMP1_AMFL      121 SAKAGSVSVGY SAGNVRLEAECMYQKFP VDTKKYKDNPERAYRFAI SAPDENSTIVATRP
OMP1_AMBR      121 SAKAGSVSVGY SAGNVRLEAECMYQKFP VDTKKYKDNPERAYRFAI SAPDENSTIVATRP
OMP1_AMCE      121 SAKAGSVSVGY SAGNVRLEAECMYQKFP VDTKKYKDNPERAYRFAI SAPDENSTIVATRP

OMP1_AMSM      181 QEPYHITAENKEVTTASLMANLCYDLLPESSQISPSACVGGGSLVRF LGVTEVRWAYQA
OMP1_AMFL      181 QEPYHITAENKEVTTASLMANLCYDLLPESSQISPSACVGGGSLVRF LGVTEVRWAYQA
OMP1_AMBR      181 QEPYHITAENKEVTTASLMANLCYDLLPESSQISPSACVGGGSLVRF LGVTEVRWAYQA
OMP1_AMCE      181 QEPYHITAENKEVTTASLMANLCYDLLPESSQISPSACVGGGSLVRF LGVTEVRWAYQA

OMP1_AMSM      241 KVGVOYFASRKAAALFAYAYASRVHPEKFSNIPVWHHIKTE SPKGSQGAAGS GGGESSAQA
OMP1_AMFL      241 KVGVOYFASRKAAALFAYAYASRVHPEKFSNIPVWHHIKTE SPKGSQGAAGS GGGESSAQA
OMP1_AMBR      241 KVGVOYFASRKAAALFAYAYASRVHPEKFSNIPVWHHIKTE SPKGSQGAAGS GGGESSAQA
OMP1_AMCE      241 KVGVOYFASRKAAALFAYAYASRVHPEKFSNIPVWHHIKTE SPKGSQGAAGS GGGESSAQA

OMP1_AMSM      301 GSKLPGLLYPQASLGLDYFGFCGIRLVL
OMP1_AMFL      301 GSKLPGLLYPQASLGLDYFGFCGIRLVL
OMP1_AMDR      301 GSKLPGLLYPQASLGLDYFGFCGIRLVL
OMP1_AMCE      297 GSKLPGLLYPQASLGLDYFGFCGIRLVL

```

**Figura 17** - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de OMP1, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.



**Figura 18** – Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína OMP1 dos isolados de *A. marginale* AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.



```

OMP5_AMSM 1 MLVWESLPMRAVILLCRCKVALFAGACSVAVCLFACVASCAG--WHICHRGACTRRVYVACT
OMP5_AMBR 1 FLVWESLPMRAVILLCRCKVALFAGACSVAVCLFACVASCAG--WHICHRGACTRRVYVACT
OMP5_AMFL 1 MLVWESLPMRAVILLCRCKVALFAGACSVAVCLFACVASCAG--WHICHRGACTRRVYVACT
OMP5_ACE 1 -----MLVWESLPMRAVILLCRCKVALFAGACSVAVCLFACVASCAG--WHICHRGACTRRVYVACT

OMP5_AMSM 60 ACWARSAVRDLRLCTTIDGKTACVLPLSHTHCARHAELVCEITSFDWKSPNPDISFGCCDF
OMP5_AMBR 60 ACWARSAVRDLRLCTTIDGKTACVLPLSHTHCARHAELVEDITSFDWKSPNPDISFGCCDF
OMP5_AMFL 60 ACWARSAVRDLRLCTTIDGKTACVLPLSHTHCARHAELVEDITSFDWKSPNPDISFGCCDF
OMP5_ACE 51 ASWTHSMVRCLRLCTTIDGKTACVLPLSHTHCARHAELVEDITSFDWKSPNPDISFGCCDF

OMP5_AMSM 120 PALCWSSAGYATGRVRFEFGMECRRFPVKIDGESACGACFFLLLKNLTYALAYNCSTSLA
OMP5_AMBR 120 PALCWSSAGYATGRVRFEFGMECRRFPVKIDGESACGACFFLLLKNLTYALAYNCSTSLA
OMP5_AMFL 120 PALCWSSAGYATGRVRFEFGMECRRFPVKIDGESACGACFFLLLKNLTYALAYNCSTSLA
OMP5_ACE 111 PSFCWSSAGYATGRVRFEFGMECRRFPVKIDGESACGACFFLLLKNLTYALAYNCSTSLA

OMP5_AMSM 180 EALESCTCCQGGLSIDSSTS---TAMYKMSMYCHDDAEY---AAEQLALFSSEDRLAAA
OMP5_AMBR 180 EALESCTCCQGGLSIDSSTS---TAMYKMSMYCHDDAEY---AAEQLALFSSEDRLAAA
OMP5_AMFL 180 EALESCTCCQGGLSIDSSTS---TAMYKMSMYCHDDAEY---AAEQLALFSSEDRLAAA
OMP5_ACE 171 EALESCTCCQGLSIDSSTS---TAMYKMSMYCHDDAEY---AAERLALFSSEDRLAAA

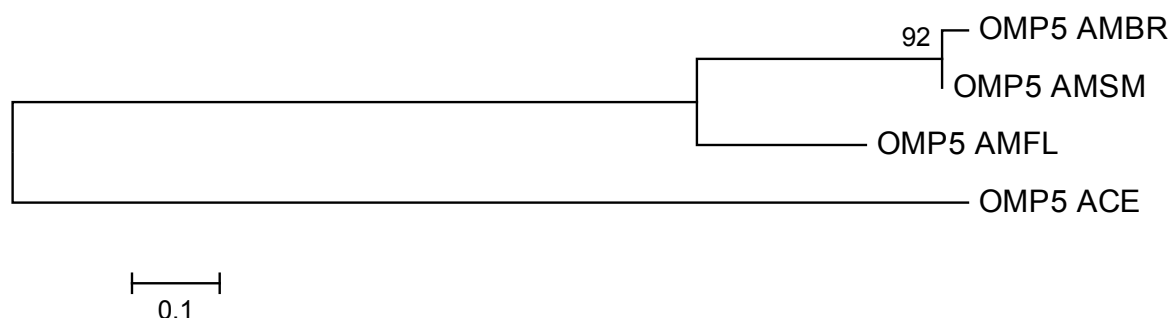
OMP5_AMSM 233 KLI--KVENCGGETAAWVEVNDIETTAAMFSACYDAPARAFSCRLTPYVCCSVGCNLDVW
OMP5_AMBR 233 KLI--KVENCGGETAAWVEVNDIETTAAMFSACYDAPARAFSCRLTPYVCCSVGCNLDVW
OMP5_AMFL 240 KLI--KADCGICWVSAWVEVNDIETTAAMFSACYDAPARAFSCRLTPYVCCSVGCNLDVW
OMP5_ACE 227 KLIDRKICCGGEPSAWVEVNDIETTAAMFSACYDAPSRTSSCRLTPYVCCSVGCNLDVW

OMP5_AMSM 291 SCNILWKLAYRARLGVNYMLTQRVSVNLEAFVHRVPCEVRYRKFVVEHVLCDTYADQCSN
OMP5_AMBR 291 SCNILWKLAYRARLGVNYMLTQRVSVNLEAFVHRVPCEVRYRKFVVEHVLCDTYADQCSN
OMP5_AMFL 298 SCNILWKLAYRARLGVNYMLTQRVSVNLEAFVHRVPCEVRYRKFVVEHVLCDTYADQCSN
OMP5_ACE 287 SCNILWKLAYRARLGVNYMLTQRVSVNLEAFVHRVPCEVRYRKFVVEHVLCDTYADQCSN

OMP5_AMSM 351 FADWALKLSYSGCNLCLKLEF-
OMP5_AMBR 351 FADWALKLSYSGCNLCLKLELN-
OMP5_AMFL 358 FADWALKLSYSGCNLCLKLEF-

```

**Figura 21** - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de OMP5, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.



**Figura 22** – Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína OMP5 dos isolados de *A. marginale* AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.

```

OMP7_AMFL 1 --QVRFLLCANVQAG--TAFTCSSAVAAGFCGDITDFYLGFGLAPAFCSVADFVAENPGAAD
OMP7_AMBR 1 QVEFSFLLCANVQAG--TAFTCSSAVAAGFCGDITDFYLGFGLAPAFCSVADFVAENPGAAD
OMP7_AMSM 1 --QVRFLLCANVQAG--TAFTCSSAVAAGFCGDITDFYLGFGLAPAFCSVADFVAENPGAAD
OMP7_ACE 1 QVRSRFLLGAVCAVFAVFAFTCSVAVAAGFCGDITDFYLGFGLAPAFSTGFVADFVAENPGAAD

OMP7_AMFL 57 SASPYAKDAVG--DTSESDRLEECCCG-EIPPKIPAQLIGSGVQCEGALLDRIRRS
OMP7_AMBR 59 SASPYAKDAVG--DTSESDRLEECCCG-EIPPKIPAQLIGSGVQCEGALLDRIRRS
OMP7_AMSM 57 SASPYAKDAVGGGTSPTD-IGIGIQQE-EIPPKIPAQLIGSGVQCEGALLDRIRRS
OMP7_ACE 61 SASPYAKDAVGGGTSPTD-IGIGIQQE-EIPPKIPAQLIGSGVQCEGALLDRIRRS

OMP7_AMFL 114 SPALSHHEGQSTDQGLMPSEGR-NCSACIGADQ-RSGGESSCAVLSDRASSGEC
OMP7_AMBR 115 -SALSHHEGQSTDQGLMPSEGRNCSACIGADQ-RSGGESSCAVLSDRASSGEC
OMP7_AMSM 115 SPALSHHEGQSTDQGLMPSEGR-NCSACIGADQ-RSGGESSCAVLSDRASSGEC
OMP7_ACE 118 -AEPHLEGRDAQ--GLMPSEGRNCSACIGADQ-RSGGESSCAVLSDRASSGEC

OMP7_AMFL 172 VAAYTRSDSN--SLSEGFGCASSECISTYMLQIGSDRCHPETC-PLLSSRAS
OMP7_AMBR 172 TRAGDREGGG--SLSEGFGCASSECISTYMLQIGSDRCHPETC-PLLSSRAS
OMP7_AMSM 173 AVDDTRSDSN--SLSEGFGCASSECISTYMLQIGSDRCHPETC-PLLSSRAS
OMP7_ACE 175 FCRTDSHYEGHSFTHSALGCHRCMTAGREVDAVR--EELLRSNGLCQSTPEND

OMP7_AMFL 229 NEPTIMPRSCMGSQSGLVDKSELQLEPTLLPTLI-RI--FLNGCSIPIQ
OMP7_AMBR 230 NEPTIMPRSCMGSQSGLVDKSELQLEPTLLPTLI-RI--FLNGCSIPIQ
OMP7_AMSM 230 NEPTIMPRSCMGSQSGLVDKSELQLEPTLLPTLI-RI--FLNGCSIPIQ
OMP7_ACE 233 VCN--SLSEGFGCASSECISTYMLQIGSDRCHPETC-PLLSSRAS

OMP7_AMFL 285 CHRDELFSGQDSYQYIQKSELCELRALPTSQYFC-DRIPESYGV-SPPEYAVC
OMP7_AMBR 286 CHRDELFSGQDSYQYIQKSELCELRALPTSQYFC-DRIPESYGV-SPPEYAVC
OMP7_AMSM 279 CHRDELFSGQDSYQYIQKSELCELRALPTSQYFC-DRIPESYGV-SPPEYAVC
OMP7_ACE 288 YACGELERSDEKQSQYYIQKSELCELRALPTSQYFC-DRIPESYGV-SPPEYAVC

OMP7_AMFL 343 IGSRYGGERQGELGL-EG-SGGLYSE-----
OMP7_AMBR 344 VEAS-YGGERQGELGL-EG-SGGLYSE-----
OMP7_AMSM 337 VEAS-YGGERQGELGL-EG-SGGLYSE-----
OMP7_ACE 348 IRYV-HGRYQSTWLD-EG-SGGLYSE-----

```

Figura 23 - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de OMP7, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.

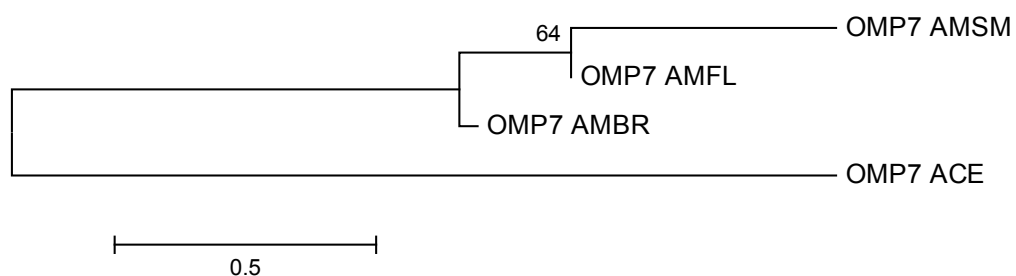


Figura 24 – Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína OMP7 dos isolados de *A. marginale* AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.



```

OMP10_AMSM 1 -----VRVARVSFGLLRCDGFFKLGCVLRLSLVGATLAVLLPAVFL-YGTGSSAA
OMP10_AMFL 1 -----VRVARVSFGLLRCDGFFKLGCVLRLSLVGATLAVLLPAVFL-YGTGSSAA
OMP10_AMBR 1 -----VRVARVSFGLLRCDGFFKLGCVLRLSLVGATLAVLLPAVFL-YGTGSSAA
OMP10_AMCE 1 LVAFVAIFVYVRVARVSFGLLRCDGFFKLGCVLRLSLVGATLAVLLPAVFLSCCAGAAVA

OMP10_AMSM 50 ---EAFCPYVSFCYTPAWCCVNRNLVVCIPGETWYVLPYKRDVSGDEVLSUSSFDWQCKNC
OMP10_AMFL 50 ---EAFCPYVSFCYTPAWCCVNRNLVVCIPGETWYVLPYKRDVSGDEVLSUSSFDWQCKNC
OMP10_AMBR 50 ---EAFCPYVSFCYTPAWCCVNRNLVVCIPGETWYVLPYKRDVSGDEVLSUSSFDWQCKNC
OMP10_AMCE 61 GYAATFGPYVSFCYTPAWCCVNRNLVVCIPGETWYVLPYKRDVSGDEVLSUSSFDWQCKNC

OMP10_AMSM 107 GAPGDDPIKFKRISPYCVTGAUGYALGDTRIELCVIGQEFVSVEISGRHWKQCNLSLFLLL
OMP10_AMFL 107 GAPGDDPIKFKRISPYCVTGAUGYALGDTRIELCVIGQEFVSVEISGRHWKQCNLSLFLLL
OMP10_AMBR 107 GAPGDDPIKFKRISPYCVTGAUGYALGDTRIELCVIGQEFVSVEISGRHWKQCNLSLFLLL
OMP10_AMCE 121 GAPGDDPIKFKRISPYCVTGAUGYALGDTRIELCVIGQEFVSVEISGRHWKQCNLSLFLLL

OMP10_AMSM 167 GKRSADLVRWLRPYISTNAGDGRSVEECKRLGNLLALRRGLNGLSESGRKAE AASAKML
OMP10_AMFL 167 GKRSADLVRWLRPYISTNAGDGRSVEECKRLGNLLALRRGLNGLSESGRKAE AASAKML
OMP10_AMBR 167 GKRSADLVRWLRPYISTNAGDGRSVEECKRLGNLLALRRGLNGLSESGRKAE AASAKML
OMP10_AMCE 181 GQRCADLAQWLRPRGASTCTDKLTTE---L TALLDVLRRGLGGLSIS---EERASVETT

OMP10_AMSM 227 LNYVGSATMPCSNWSSKPDVVKRLHTMLGQALPKVWPYLSYSDKDEARRALCEYGDSC-W
OMP10_AMFL 227 LNYVGSATMPCSNWSSKPDVVKRLHTMLGQALPKVWPYLSYSDKDEARRALCEYGDSC-W
OMP10_AMBR 227 LNYVGSATMPCSNWSSKPDVVKRLHTMLGQALPKVWPYLSYSDKDEARRALCEYGDSC-W
OMP10_AMCE 235 LNLVGSATMPCSNWSSKPDVVKRLHTMLGQALPKVWPYLSYSDKDEARRALCEYGDSC-W

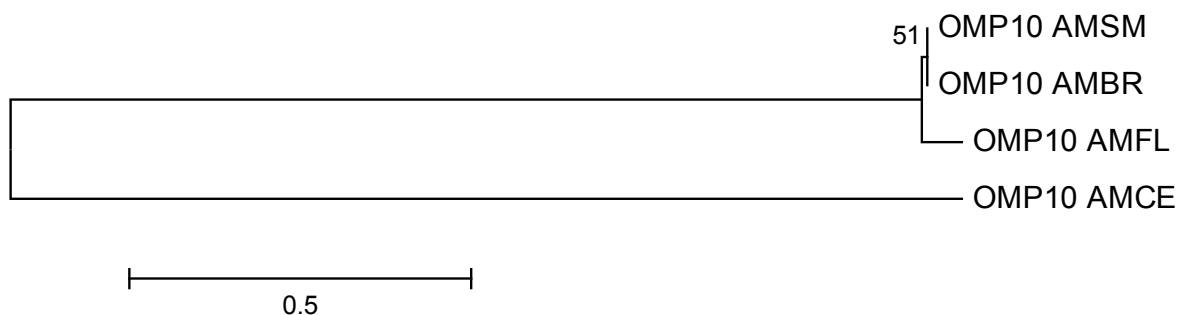
OMP10_AMSM 286 VAISAVELTAVTVVGCRRDLALS NFLTAAATRNLDA YCCAGHCUSFVRCAGKNVAEFGAEL
OMP10_AMFL 286 VAISAVELTAVTVVGCRRDLALS NFLTAAATRNLDA YCCAGHCUSFVRCAGKNVAEFGAEL
OMP10_AMBR 286 VAISAVELTAVTVVGCRRDLALS NFLTAAATRNLDA YCCAGHCUSFVRCAGKNVAEFGAEL
OMP10_AMCE 295 VAIPAVCLTAVTVVGCRRDLALS NFLTAAATRNLDA YCCAGHCUSFVRCAGKNVAEFGAEL

OMP10_AMSM 346 KLCVSYRLSRAASVFVCGVLHRTANYDFNLPVIPHCADSGSVAAGC-HADYARN-EARIS
OMP10_AMFL 346 KLCVSYRLSRAASVFVCGVLHRTANYDFNLPVIPHCADSGSVAAGC-HADYARN-EARIS
OMP10_AMBR 346 KLCVSYRLSRAASVFVCGVLHRTANYDFNLPVIPHCADSGSVAAGC-HADYARN-EARIS
OMP10_AMCE 355 KFCVSYRLSRAASVFVCGVLHRTANYDFNLPVIPHCADSGSVAAGC-HADYARN-EARIS

OMP10_AMSM 404 FCVLNLAGEVGLRFLIT
OMP10_AMFL 406 FCVLNLAGEVGLRFLIT
OMP10_AMBR 404 FCVLNLAGEVGLRFLIT
OMP10_AMCE 414 FCVLNLAGEVGLRFLV-

```

**Figura 27** - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de OMP10, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.



**Figura 28** – Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína OMP10 dos isolados de *A. marginale* AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.

```

OMP14_AMSM      1  ---WAFSILLLVGVIGCVMKPVVCI A A A L L S T I G Y L V P A S S H G M N G R E D F Y V S F G Y G P T I
OMP14_AMFL      1  -----LVVGVIGCVMKPVVCI A A A L L S T I G Y L V P A S S H G M N G R E D F Y V S F G Y G P T I
OMP14_AMBR      1  ---WAFSILLLVGVIGCVMKPVVCI A A A L L S T I G Y L V P A S S H G M N G R E D F Y V S F G Y G P T I
OMP14_AMCE      1  VQGVAFSLRLVYGVIGCVMKPVVCI A A V L L C A F G Y L A F T K S H G A D D R G D F Y V S F G Y G P T I

OMP14_AMSM      58  GKISGFRLNAAKETVA ILPYIGKLGSAELSSANVDWAGESTESPAMGFENSSLLGLRGSV
OMP14_AMFL      52  GKISGFRLNAAKETVA ILPYIGKLGSAELSSANVDWAGESTESPAMGFENSSLLGLRGSV
OMP14_AMBR      58  GKISGFRLNAAKETVA ILPYIGKLGSAELSSANVDWAGESTESPAMGFENSSLLGLRGSV
OMP14_AMCE      61  GTIGGLRLDAAKETVA ILPYIGKLGSAELSSANVDWAGESVESPVIGFENSSLLGLRGSV

OMP14_AMSM      118  GCVVRGTRLELEFPGHEHYDFKSONYALLSGGSATFALVKRISASATRDVEGFRAALQKEL
OMP14_AMFL      112  GCVVRGTRLELEFPGHEHYDFKSONYALLSGGSATFALVKRISASATRDVEGFRAALQKEL
OMP14_AMBR      118  GCVVRGTRLELEFPGHEHYDFKSONYALLSGGSATFALVKRISASATRDVEGFRAALQKEL
OMP14_AMCE      121  GCVVRGTRLELEFPGHEHYDFKSONYALLSGGSATFALVKRISASATRDVEGFRAALQKEL

OMP14_AMSM      178  SKPALQSIIKKRLEDIRDHDEAWESKALADKVISKFDALIPGEE---AKTERAAATGAGSA
OMP14_AMFL      172  SKPALRSIIKKRLEDIRDHDEAWESKALADKVISKFDALIPGEE---AKTERAAATGAGSA
OMP14_AMBR      178  SKPALKSIKKRLEDIRDHDEAWESKALADKVISKFDALIPGEE---AKTERAAATGAGSDT
OMP14_AMCE      181  SKPWLKSIKKRLEDIKHDAVRSRAFADKALIGKLSQIITSIEGSP TSA D G A G A P R G G C G

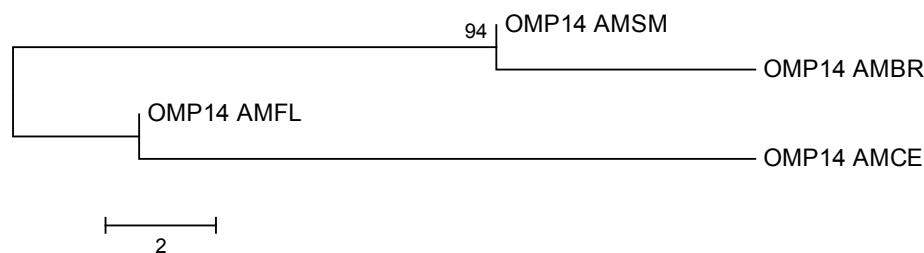
OMP14_AMSM      235  D T S A Q M T Q E S K R R N C A I T D I V G L S R L A R G V I G R A I A T S T E G M E I V E I S G V R V V S A I L S A C Y
OMP14_AMFL      229  D T S A Q M T Q E S K R R N C A I T D I V G L S R L A R G V I G R A I A T S T E G M E I V E I S G V R V V S A I L S A C Y
OMP14_AMBR      235  D A S A C S A L E R K R N E A I G E I V K F S R L A R G V I G R A I A T S T E G M E I V E I S G V R V V S A I L S A C Y
OMP14_AMCE      241  A G G @ A A P T Q D K R A A V A A V V E L S P G E R G V I G R A I A T S T E G M E I V E V S I V R A I S T V M S V C Y

OMP14_AMSM      295  D F P Q V G L L V D W R M S P Y A C A G L G A S F V G L T A Q R F Q P O L T C Q V K A G V S Y S I T P S L A A F I G G T
OMP14_AMFL      289  D F P Q V G L L V D W R M S P Y A C A G L G A S F V G L T A Q R F Q P O L T C Q V K A G V S Y S I T P S L A A F I G G T
OMP14_AMBR      295  D F P Q V G L L V D W R M S P Y A C A G L G A S F V G L T A Q R F Q P O L T C Q V K A G V S Y S I T P S L A A F I G G T
OMP14_AMCE      301  D F P Q V G L L V D W R M S P Y A C A G L G A S F V G L T D R Q F Q P O L T C R K A G I N Y M I A R N L D A F I G G T

OMP14_AMSM      355  A S K T L G T N Y D N T P A H R A V D D A S P L G K T K E K V S A S F G L R N I G V E L G I R F G F
OMP14_AMFL      349  A S K T L G T N Y D N T P A H R A V D D A S P L G K T K E K V S A S F G L R N I G V E L G I R F G F
OMP14_AMBR      355  A S K T L G T N Y D N T P A H R A V D D A S P L G K T K E K V S A S F G L R N I G V E L G I R F G F
OMP14_AMCE      361  F G K V L G T N Y D N T P A H R A V D D A S P L G K T K E K V L A S F G L Q H T I G V E V G I R L G F

```

**Figura 29** - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de OMP14, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.



**Figura 30** – Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína OMP14 dos isolados de *A. marginale* AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.

```

OMP15_AMBR      1  VTHI PQLTVLLRVRGPF AAF IYPET S CALI S CGTSD I SA SAPDLRAAKLLA - -H S QP TQR
OMP15_AMSM      1  VTHI PQLTVLLRVRGPF AAF IYPET S CALI S CGTSD I SA SAPDLRAAKLLVYPP E S QP TQR
OMP15_AMFL      1  VTHI PQLTVLLRVRGPF AAF IYPET S CALI S CGTSD I SA SAPDLRAAKLLA - -H S QP TQR

OMP15_AMBR      59  DFLH -PHLAPTS CPA DT PAPHLLTF SAF SITPS LAATIGGTASXITLGTNYDHPQPPC SRR
OMP15_AMSM      61  GLDCKPFLAPTS CPA DT PAPHLLTF SAF SITPS LAATIGGTASXITLGTNYDHPQPPC SRR
OMP15_AMFL      59  DFLH -PHLAP T P L P S ----- S A G H V P A L ----- G T Q P N S I P A N -----

OMP15_AMBR      118  QP I R K K N G E G L S I L R A T Q P R G R T E N Q Q R I L
OMP15_AMSM      121  QP I R K K N G E G L S I L R A T Q P R G R T E N Q Q R I L
OMP15_AMFL      91  ----- T A L C L I Q S Q Q S H E H -----

```

**Figura 31** - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de OMP15, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.

Não foi possível construir a árvore filogenética para OMP15 por não possuir o mínimo de 4 seqüências preditivas para comparação. Todas as árvores filogenéticas com exceção de OMP14, apresentaram o mesmo padrão, exibindo a formação de 2 grupos: um formado pelos isolados AMBR, AMSM, AMFL, e, em outro ramo AMCE, demonstrando o distanciamento entre os isolados. Mesmo OMP7 apresentando níveis de homologia inferiores a 72% em relação a AMBR, a árvore filogenética teve a mesma formação de 2 grupos. OMP14 apresentou a formação de 2 grupos diferentes do padrão exibido pelos demais, sendo o primeiro composto por AMBR e AMSM, e, o segundo por AMFL e AMCE.

OMP7 foi à única proteína de AMBR que apresentou seqüência preditiva de aminoácidos com homologia inferior a 90% em comparação com os isolados americanos *sensu stricto* (Tabela 9). Segundo Noh et al. (2006), esta variação ocorrida na seqüência de *omp7* está, provavelmente, associada a substituições de nucleotídeos em sua região central, que mantém a moldura de leitura (reading frame) mas introduz variações de aminoácidos. Os genes que codificam OMPs 7 a 9, partilham de extensas áreas de homologia nas extremidades 5' e 3', onde podem ocorrer recombinações enquanto que as áreas N e C terminais apresentam relativa conservação.

Como a inoculação de AMCE é capaz de proteger contra isolados de *A. marginale* (PIPANO, 1995), e, as OMPs 1, 5, 10 apresentam homologia superior a 65% em relação a AMCE possivelmente caracterizando melhores candidatos a antígenos vacinais dentre as OMPs estudadas.

A seqüência preditiva de aminoácidos da proteína PepA de AMBR, após alinhamento revelou 97% de homologia para as seqüências do mesmo gene de AMSM e AMFL e 65% para as de AMCE (Tabela 9, Figura 31). O percentual de homologia encontrado para a seqüência desta proteína é relativamente alto, considerando o seu tamanho de 521 aminoácidos, além do fato de que a seqüência protéica dos isolados americanos *sensu stricto*, difere por apenas 4 aminoácidos da seqüência de AMBR. A árvore filogenética produzida com as seqüências preditivas de aminoácidos de PepA (Figura 32), confirma a maior proximidade entre os isolados AMBR, AMSM e AMFL em relação a AMCE.

Pelo fato de PepA estar ancorada à membrana de *A. marginale* e, apresentar seqüência preditiva de aminoácidos altamente conservada, mais estudos devem ser dedicados, para avaliação de sua imunogenicidade e potencial como antígeno vacinal.



```

pepA_AMSM      1  MCYGTRIVGRYTIYFLKYRANGARIRALVLVWF GARMVSVSFLGLASGVSTLLKTAVLVV
pepA_AMFL      1  MCYGTRIVGRYTIYFLKYRANGARIRALVLVWF GARMVSVSFLGLASGVSTLLKTAVLVV
pepA_AMBR      1  MCYGTRIVGRYTIYFLKYRANGARIRALVLVWF GARMVSVSFLGLASGVSTLLKTAVLVV
pepA_AMCE      1  -----MVSVSFLSGLASGVSTLLKTAVLVV

pepA_AMSM     61  GVFEESNVLEDGGILRPEERKTVLRIKDMAMFSGKFADTMP IVLTHDGGVVLVVVGLGKES
pepA_AMFL     61  GVFEESNVLEDGGILRPEERKTVLRIKDMAMFSGKFADTMP IVLTHDGGVVLVVVGLGKES
pepA_AMBR     61  GVFEESNVLEDGGILRPEERKTVLRIKDMAMFSGKFADTMP IVLTHDGGVVLVVVGLGKES
pepA_AMCE     25  GVFEESNVLEDGGVLRPEERRAALRIKDMAMFSGKFADTMP IVLTHDGGVVLVVVGLGKES

pepA_AMSM    121  DTITESKAMELGGA VYSSLEKIKAKSATVVAPGGSELRVAYGAFLRSFKFDQYFHSKKS
pepA_AMFL    121  DTITESKAMELGGA VYSSLEKIKAKSATVVAPGGSELRVAYGAFLRSFKFDQYFHSKKS
pepA_AMBR    121  DTITESKAMELGGA VYSSLEKIKAKSATVVAPGGSELRVAYGAFLRSFKFDQYFHSKKS
pepA_AMCE     85  EPITESKAMELGGA VYSGLEKIKAKSATVVAPGGSELRVAYGALLRSFKFDQYFHSKKS

pepA_AMSM    181  NASTVQEIISMLVAGDAESAKKSF DALKKAEGESVFFVRSLSVSEPSNVLYPEEYSVRIQKE
pepA_AMFL    181  NASTVQEIISMLVAGDAESAKKSF DALKKAEGESVFFVRSLSVSEPSNVLYPEEYSVRIQKE
pepA_AMBR    181  NASTVQEIISMLVAGDAESAKKSF DALKKAEGESVFFVRSLSVSEPPNVLYPEEYSVRIQKE
pepA_AMCE    145  HVSTVQEIISMLVPGDAGVAKKSF DAL--AEGESVFFVRSLSVSEPPNVLYPEEYSVRIQKE

pepA_AMSM    241  LAPLGGKSARREAYGGKGHDPGSGGWPGQHRIKIGRDEIHGGTWWWSP TSVRRQRRL
pepA_AMFL    241  LAPLGGKSARREAYGGKGHDPGSGGWPGQHRIKIGRDEIHGGTWWWSP TSVRRQRRL
pepA_AMBR    241  LAPLRGGKSARREAYGKGHDVPSGGWPGQHRIKIGRDEIHGGTWWWSP TSVRGRQRRL
pepA_AMCE    203  LTPL--RKGCTREAHGGGCHDGPANSWAROHGKAKAGHEMDGSPRGQGGACVRRGQCH

pepA_AMSM    299  HRGHLAQTCC--YVEHEVHGRLRGCCRVDEDFGCEKSKGERSWRGGSGECCRWERTASWHC
pepA_AMFL    299  HRGHLAQTCC--YVEHEVHGRLRGCCRVDEDFGCEKSKGERSWRGGSGECCRWERTASWHC
pepA_AMBR    299  HRGHLAQTCC--YVEHEVHGRLRGCCRVDEDFGCEKSKGERSWRGGSGECCRWERTASWHC
pepA_AMCE    261  HGRCLA KACEGHVEHEVHGRLRGCCRVDENPSREKKEGCRGRGRIGECSEKRRKRTAFWHC

pepA_AMSM    358  HFHVRTDHRGLKYRRGREAGSGR--PVVHTKSIKIHCRPNFDFWSHNCCAGRKP IIRGPL
pepA_AMFL    358  HFHVRTDHRGLKYRRGREAGSGR--PVVHTKSIKIHCRPNFDFWSHNCCAGRKP IIRGPL
pepA_AMBR    358  HFHVRTDHRGLKYRRGREAGSGR--PVVHTKSIKIHCRPNFDFWSHNCCAGRKP IIRGPL
pepA_AMCE    320  HFYVGA DHRGLKYGRG--EIGFGRCLVVAEDDLAED--RPGNFMWSYGGRRARRKSRVPL

pepA_AMSM    417  FQORLPGAACEGRRGS--EALAHAGGCLQDDRFPGGCAKYFHQRAWGQHNRRRTIP AALR
pepA_AMFL    417  FQORLPGAACEGRRGS--EALAHAGGCLQDDRFPGGCAKYFHQRAWGQHNRRRTIP AALR
pepA_AMBR    417  FQORLPGAACEGRRGS--EALAHAGGCLQDDRFPGGCAKYFHQRAWGQHNRRRTIP AALR
pepA_AMCE    378  FQCSGR--AACKGRRRSRRALAYAHGRCLQDDRFPGSGYAEHLHQGARCRHNRCPIS AALC

pepA_AMSM    476  KWRTLGTSGHCWRCLGRRVCCVRQG--RPGSVCCSTGLCRSITKS---
pepA_AMFL    476  KWRTLGTSGHCWRCLGRRVCCVRQG--RPGSVCCSTGLCRSITKS---
pepA_AMBR    476  KWRTLGTSGHCWRCLGRRVCCVRQG--RPGSVCCSTGLCRSITKS---
pepA_AMCE    437  QRC TLGTFGYCRCLCG--VCCVRQGGQLDSACCSTGLCPNTTKSEMV

```

**Figura 32** - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de PEPA, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.



**Figura 33** – Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína PEPA dos isolados de *A. marginale* AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.

A seqüência preditiva dos aminoácidos de EF-Tu de AMBR apresentou 100% de homologia com a seqüência dos isolados americanos e 89% com AMCE (Tabela 9, Figura 33). A árvore filogenética produzida através das seqüências preditivas de aminoácidos de EF-Tu refletiu exatamente 100% de homologia, apresentando em um mesmo ramo e sem diferenças os isolados AMBR, AMSM e AMFL e, em outro ramo, AMCE (Figura 34).

EF_TU_AMSM	1	MTEGRKPHINUGT IGRVDHGKTTLT AALTTULTRRLSGANKVUKYDE IDKAP EERARGIT
EF_TU_AMFL	1	MTEGRKPHINUGT IGRVDHGKTTLT AALTTULTRRLSGANKVUKYDE IDKAP EERARGIT
EF_TU_AMBR	1	MTEGRKPHINUGT IGRVDHGKTTLT AALTTULTRRLSGANKVUKYDE IDKAP EERARGIT
EF_TU_AMCE	1	MTEGRKPHINUGT IGRVDHGKTTLT AALT <u>F</u> ULTRRLSGANKVUKYDE IDKAP EERARGIT
■		
EF_TU_AMSM	51	ISTAHVEYETEGRHYAHVDCPGHADYIKNMITGAAQMDVA ILVUSATDGMPTREHILL
EF_TU_AMFL	51	ISTAHVEYETEGRHYAHVDCPGHADYIKNMITGAAQMDVA ILVUSATDGMPTREHILL
EF_TU_AMBR	51	ISTAHVEYETEGRHYAHVDCPGHADYIKNMITGAAQMDVA ILVUSATDGMPTREHILL
EF_TU_AMCE	51	ISTAHVEYETEGRHYAHVDCPGHADYIKNMITGAAQMDVA ILVUSATDGMPTREHILL
EF_TU_AMSM	121	AKQUGUKDIUTWINKCDUVEDEEMLSIVEMEURELLSNYGYDGDGDVURGS SUKALEES
EF_TU_AMFL	121	AKQUGUKDIUTWINKCDUVEDEEMLSIVEMEURELLSNYGYDGDGDVURGS SUKALEES
EF_TU_AMBR	121	AKQUGUKDIUTWINKCDUVEDEEMLSIVEMEURELLSNYGYDGDGDVURGS SUKALEES
EF_TU_AMCE	121	AKQUGUKDIUTWINKCDUVEDEEMLSIVEMEURELLSNYGYDGD <u>S</u> UDVURGS SUKALEE <u>G</u>
EF_TU_AMSM	181	SDGPWSEKIMELUGALEK IELPUREKDKPFLMSVEDVPSIPGRGTUOTGR IERGV IKUGD
EF_TU_AMFL	181	SDGPWSEKIMELUGALEK IELPUREKDKPFLMSVEDVPSIPGRGTUOTGR IERGV IKUGD
EF_TU_AMBR	181	SDGPWSEKIMELUGALEK IELPUREKDKPFLMSVEDVPSIPGRGTUOTGR IERGV IKUGD
EF_TU_AMCE	181	SDGPWSEKIMELUGALEK IELPUREKDKPFLMSVEDVPSIPGRGTUOTGR IERGV IKUGD
EF_TU_AMSM	241	KVDIVGLRDLQSTUUCTGVEMPHKALETGEAGDNAGILLRG IKKEDVERGQULSAPGQIRS
EF_TU_AMFL	241	KVDIVGLRDLQSTUUCTGVEMPHKALETGEAGDNAGILLRG IKKEDVERGQULSAPGQIRS
EF_TU_AMBR	241	KVDIVGLRDLQSTUUCTGVEMPHKALETGEAGDNAGILLRG IKKEDVERGQULSAPGQIRS
EF_TU_AMCE	241	KVDIVGLRDLQSTUUCTGVEMPHKALETGEAGDNAGILLRG IKKEDVERGQULSAPGQ <u>MC</u> S
EF_TU_AMSM	301	YKAFKAEUYILKKEEGGRHTPPFSNYQPQFYORTTDUTGS IKLPSGVEMUMP GDMLS IEU
EF_TU_AMFL	301	YKAFKAEUYILKKEEGGRHTPPFSNYQPQFYORTTDUTGS IKLPSGVEMUMP GDMLS IEU
EF_TU_AMBR	301	YKAFKAEUYILKKEEGGRHTPPFSNYQPQFYORTTDUTGS IKLPSGVEMUMP GDMLS IEU
EF_TU_AMCE	301	YKAFKAEUYILKKEEGGRHTPPFSNYQPQFYORTTDUTGS IKLPSGVEMUMP GDMLS IEU
EF_TU_AMSM	361	ALDKPVALDKGLRFAUREGGRTVCSGIITE ILE
EF_TU_AMFL	361	ALDKPVALDKGLRFAUREGGRTVCSGIITE ILE
EF_TU_AMBR	361	ALDKPVALDKGLRFAUREGGRTVCSGIITE ILE
EF_TU_AMCE	361	TLDKPVALDKGLRFAUREGGRTVCSGIITE ILE

**Figura 34** - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de EF-Tu, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.



**Figura 35** – Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína EF-Tu dos isolados de *A. marginale* AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.

Em comparação com os genes de proteínas de membrana estudados neste trabalho, EF-Tu assume relativa importância como possível candidato a antígeno vacinal, por apresentar o maior percentual de homologia entre as seqüências preditivas de aminoácidos dos isolados estudados, sendo considerado como um gene altamente conservado. Confirmando os estudos de Araújo et al. (2008), que em seus experimentos observaram a conservação deste gene. Além do fato de se tratar de uma proteína capaz de estimular a resposta proliferativa de linfócitos T, como citado anteriormente por Lopez et al. (2008).

As seqüências preditivas de aminoácidos de SODB, VIRB9-1 e VIRB3, de AMBR, após alinhamento com os isolados anteriormente mencionados, apresentam percentual de homologia, em sua maioria próximo a 100% quando comparados aos isolados americanos *sensu stricto* e em torno de 85% para AMCE (Tabela 9, Figuras 35, 37 e 39), demonstrando alto grau de conservação. As árvores filogenéticas produzidas através das seqüências preditivas de aminoácidos de SODB, VIRB9-1 e VIRB3 (Figuras 36, 38 e 40) confirma os dados de homologia apresentados na tabela 9, sendo que SODB e VIRB 3 seguiram o mesmo padrão de distanciamento entre isolados com a formação de um grupo incluindo AMBR, AMSM e AMFL não demonstrando diferenças e o outro grupo com AMCE. A árvore formada para VIRB9-1 (figura 38) apresentou a formação de um grupo contendo AMBR e AMFL com o valor máximo de 100 para 1000 réplicas de bootstrap, indicando que não há diferenças entre estes isolados e outro ramo para AMSM e AMCE apresentando distanciamento entre estes isolados.

```

SODB_AMSM 1 VLNPLRSWYTFRVCFAIVVMFELPSLPYSSLEPYISDKLLDRHYNGHHKTYVDVLNKLVA
SODB_AMFL 1 VLNPLRSWYTFRVCFAIVVMFELPSLPYSSLEPYISDKLLDRHYNGHHKTYVDVLNKLVA
SODB_AMBR 1 VLNPLRSWYTFRVCFAIVVMFELPSLPYSSLEPYISDKLLDRHYNGHHKTYVDVLNKLVA
SODB_AMCE 1 -----MFELSSLPYSSLEPYISDKLLDRHYNGHHKTYVDVLNKLVV

SODB_AMSM 61 GTEFDGMNNSDLEGIIVKTHGSSATRGIFNNAQIWNHDFYWRSMKKDGGGNPPAKLAKM
SODB_AMFL 61 GTEFDGMNNSDLEGIIVKTHGSSATRGIFNNAQIWNHDFYWRSMKKDGGGNPPAKLAKM
SODB_AMBR 61 GTEFDGMNNSDLEGIIVKTHGSSATRGIFNNAQIWNHDFYWRSMKKDGGGNPPAKLAKM
SODB_AMCE 42 GTEFEGMSNGDLEGIIVKTHASSATKAI FNNAQIWNHDFYWKSMKKDGGGNPPAKLAKM

SODB_AMSM 121 LKESFGGVQEFADAF AASGTGHFGSGWAWLLYDRGSNKLQVVSTPNADSPLLTSGYYPLL
SODB_AMFL 121 LKESFGGVQEFADAF AASGTGHFGSGWAWLLYDRGSNKLQVVSTPNADSPLLTSGYYPLL
SODB_AMBR 121 LKESFGGVQEFADAF AASGTGHFGSGWAWLLYDRGSNKLQVVSTPNADSPLLTSGYYPLL
SODB_AMCE 102 LKESFGGVQEFADAF TASGTGHFGSGWAWLLYDRGSGLKVVSTPNADSPLLTACCCPLL

SODB_AMSM 181 TMDVWEHAYYLDYLNVRKKYVDVFLEHLINWDFALQRLETAGV
SODB_AMFL 181 TMDVWEHAYYLDYLNVRKKYVDVFLEHLINWDFALQRLETAGV
SODB_AMBR 181 TMDVWEHAYYLDYLNVRKKYVDVFLEHLINWDFALQRLETAGV
SODB_AMCE 162 TMDVWEHAYYLDYLNVRKRYVDVFLEHLINWDFALKGLLETAGV

```

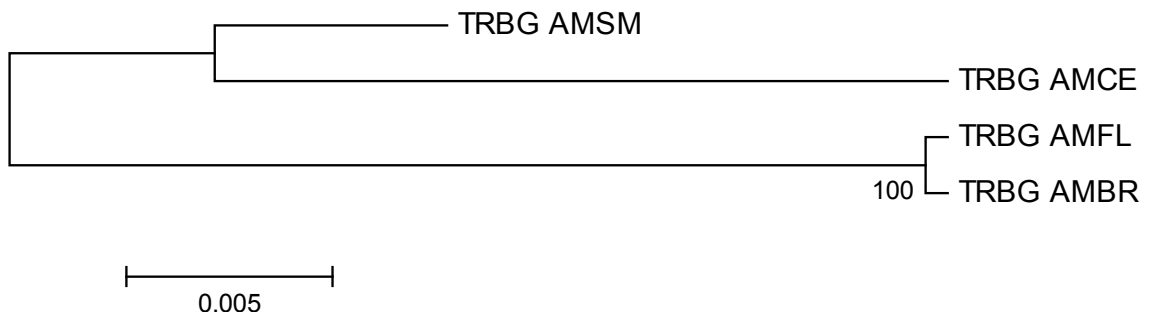
**Figura 36** - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de SODB, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.



**Figura 37** – Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína SODB dos isolados de *A. marginale* AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.

VIRB9-1_AMSM	1	MRKAFMVCAVALLCS	SAAFGKQEPR	SI	AADDHIKII	MNFPQS	IHR	YTG	FYGYQS	SIL	FEA			
VIRB9-1_AMCE	1	MRKAFMVCAVALLCS	SAAFGKQEPR	SI	AADDHIKVM	MNFPQS	IHR	YTG	FYGYQS	SIL	FEA			
VIRB9-1_AMFL	1	MRKAFMVCAVALLCS	SAAFGKQEPR	SI	AADDHIKVM	MNFPQS	IHR	YTG	FYGYQS	SIL	FEA			
VIRB9-1_AMBR	1	MRKAFMVCAVALLCS	SAAFGKQEPR	SI	AADDHIKVM	MNFPQS	IHR	YTG	FYGYQS	SIL	FEA			
VIRB9-1_AMSM	61	GEVIDTV	SMGDST	GWQLV	PKGNRLF	IKPVGD	MADTNVTI	ITNRRV	YYFEL	LHAE	ASGLDD			
VIRB9-1_AMCE	61	GEVIDTV	SMGDST	GWQLV	PKGNRLF	IKPVGD	MADTNVTI	ITNRRV	YYFEL	LHAE	ASGLDD			
VIRB9-1_AMFL	61	GEVIDTV	SMGDST	GWQLV	PKGNRLF	IKPVGD	MADTNVTI	ITNRRV	YYFEL	LHAE	ASGLDD			
VIRB9-1_AMBR	61	GEVIDTV	SMGDST	GWQLV	PKGNRLF	IKPVGD	MADTNVTI	ITNRRV	YYFEL	LHAE	ASGLDD			
VIRB9-1_AMSM	121	PRLAYEVRFVYPAAS	SVDAASS	SDLGG	GVS	FPTYQND	VDPDLS	DPE	VAKKGL	NFD	YSV	SHT		
VIRB9-1_AMCE	121	PRLAYEVRFVYPAAS	SVDAASS	SDLGG	GVS	FPTYQND	VDPDLS	DPE	VAKKGL	NFD	YSV	SHT		
VIRB9-1_AMFL	121	PRLAYEVRFVYPAAS	SVDAASS	SDLGG	GVS	FPTYQND	VDPDLS	DPE	VAKKGL	NFD	YSV	SHT		
VIRB9-1_AMBR	121	PRLAYEVRFVYPAAS	SVDAASS	SDLGG	GVS	FPTYQND	VDPDLS	DPE	VAKKGL	NFD	YSV	SHT		
VIRB9-1_AMSM	181	AGSANIV	PIRVFDRK	FTYMQ	FSNV	MGDLP	SIFNVD	AEGYES	LVN	FRI	VG	YV	VER	VSP
VIRB9-1_AMCE	181	AGSANIV	PIRVFDRK	FTYMQ	FSNV	MGDLP	SIFNVD	AEGYES	LVN	FRI	VG	YV	VER	VSP
VIRB9-1_AMFL	181	AGSANIV	PIRVFDRK	FTYMQ	FSNV	MGDLP	SIFNVD	AEGYES	LVN	FRI	VG	YV	VER	VSP
VIRB9-1_AMBR	181	AGSANIV	PIRVFDRK	FTYMQ	FSNV	MGDLP	SIFNVD	AEGYES	LVN	FRI	VG	YV	VER	VSP
VIRB9-1_AMSM	241	AFTLRYGS	SSTACV	FNEKLY	RSTS	STSRR	G	R	G					
VIRB9-1_AMCE	241	AFTLRYGS	SSTACV	FNEKLY	RSTS	STSRR	G	R	G					
VIRB9-1_AMFL	241	AFTLRYGS	SSTACV	FNEKLY	RSTS	STSRR	G	R	G					
VIRB9-1_AMBR	241	AFTLRYGS	SSTACV	FNEKLY	RSTS	STSRR	G	R	G					

**Figura 38** - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de VIRB9-1, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.



**Figura 39** – Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína VIRB9-1 dos isolados de *A. marginale* AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.

VIRB3_AMSM	1	MSSGSVKT	DQLFKGLTR	PTMLE	GVSYT	FAI	LNFMIS	SIMLFMY	SNDFRV	LLVL	APGM	HAI	G
VIRB3_AMFL	1	MSSGSVKT	DQLFKGLTR	PTMLE	GVSYT	FAI	LNFMIS	SIMLFMY	SNDFRV	LLVL	APGM	HAI	G
VIRB3_AMBR	1	MSSGSVKT	DQLFKGLTR	PTMLE	GVSYT	FAI	LNFMIS	SIMLFMY	SNDFRV	LLVL	APGM	HAI	G
VIRB3_AMCE	1	MSSGSVKT	DQLFKGLTR	PTMLE	GVSYT	FAI	LNFMIS	SIMLFMY	SNDFRV	LLVL	APGM	HAI	G
VIRB3_AMSM	61	FAASAK	DELFMD	LEV	IKMQK	CSK	CLNRF	FYHN	ANSY	D	V	M	
VIRB3_AMFL	61	FAASAK	DELFMD	LEV	IKMQK	CSK	CLNRF	FYHN	ANSY	D	V	M	
VIRB3_AMBR	61	FAASAK	DELFMD	LEV	IKMQK	CSK	CLNRF	FYHN	ANSY	D	V	M	
VIRB3_AMCE	61	FAASAK	DELFMD	LEV	IKMQK	CSK	CLNRF	FYHN	ANSY	D	V	M	

**Figura 40** - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de VIRB 3, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.



**Figura 41** – Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína VIRB 3 dos isolados de *A. marginale* AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.

Em estudos com outros membros do grupo TFSS (*virb9-2* e *virb10*), Araújo et al. (2008) constataram alto grau de conservação entre diferentes isolados de *A. marginale*. Ainda neste experimento, demonstraram que as proteínas VirB9-2, VirB10 são reconhecidas por anticorpos de bovinos natural ou experimentalmente infectados. Em AMBR, *virb3* segue o mesmo padrão de conservação que os outros componentes do grupo TFSS analisados por Araújo et al. (2008), portanto é esperado que apresente o mesmo perfil antigênico. Uma vez que, a conservação dos epítomos de células B entre e dentro dos isolados é crucial para o clearance de *Anaplasma*. Lopez et al. (2007), também comprovaram que as proteínas VIRB9-2, VIRB10 além da proteína de transferência conjugada (VIRB9-1) são conservadas entre isolados. Além disso são reconhecidas por células efectoras do sistema imune de bovinos inoculados com membrana externa de *A. marginale*. Por conseguinte, estudos que comprovem também o potencial antigênico e imunogênico de SODb são necessários para o desenvolvimento de vacinas contra *A. marginale*.

O gene que codifica a proteína AM854 não se encontra completo no isolado *A. marginale centrale*, apresentando em sua seqüência apenas 212 aminoácidos do total de 236 presentes nos isolados americanos, por esse motivo não pôde ser adicionado à tabela 9. Como os isolados Saint Maries, Flórida e o brasileiro (Pernambuco - Zona da Mata) possuem 100% de homologia entre si (Tabela 9), comparando as seqüências preditivas de aminoácidos com *A. marginale centrale* através do BLAST (NCBI), foi obtido 79% de homologia entre as seqüências (167/212). Esta homologia pode ser demonstrada quando a seqüência é submetida ao alinhamento múltiplo juntamente com as demais (Figura 41 e 42).

A seqüência de *A. centrale* isolado de Israel (HERNDOM et al., 2009) foi anotada no genoma como uma provável proteína externa de membrana (OmpA). Em relação aos demais isolados, AM854 foi anotada como uma proteína hipotética no isolado Saint Maries e demais anotações de genomas parciais como nos isolados Mississipi e Puerto Rico. Sendo ainda anotada como precursor da lipoproteína associada a peptidoglicanos no isolado Flórida. Lopez et al. (2005) afirmaram que a proteína AM854 dentre outras, foi reconhecida por IgG de pelo menos um bovino, demonstrando ser antigênica. Desta forma, a porção conservada de AM854 em *A. marginale centrale*, provavelmente possui maior importância para produção de resposta imune, considerando que a imunização com esta subespécie de *Anaplasma* seja capaz de gerar resposta imune protetora contra *A. marginale* em bovinos (PIPANO, 1995).

```

AM854_AMBR 1 MLHRWLALCFLASFAVTGCGLFSKEKVGMDIVGVPPFSAGRVEKVYFDNFKYEIKGSGKKV
AM854_AMSM 1 MLHRWLALCFLASFAVTGCGLFSKEKVGMDIVGVPPFSAGRVEKVYFDNFKYEIKGSGKKV
AM854_AMFL 1 MLHRWLALCFLASFAVTGCGLFSKEKVGMDIVGVPPFSAGRVEKVYFDNFKYEIKGSGKKV
AM854_AMCE 1 MLHRWLALCFLASFAVTGCGLFSKEKVGMDIVGVPPFSAGRVEKVYFDNFKYEIKGSGKKV

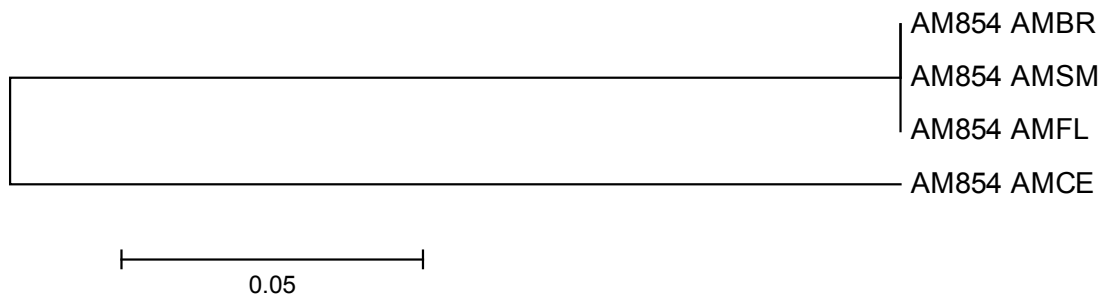
AM854_AMBR 61 LLGLVERMKADKRSTLLIIGHTDSRGTEEYNLALGERRANAVKEFILGCDRSLSPRISTQ
AM854_AMSM 61 LLGLVERMKADKRSTLLIIGHTDSRGTEEYNLALGERRANAVKEFILGCDRSLSPRISTQ
AM854_AMFL 61 LLGLVERMKADKRSTLLIIGHTDSRGTEEYNLALGERRANAVKEFILGCDRSLSPRISTQ
AM854_AMCE 61 LLGLVERMKADKRSTLLIIGHTDSRGTEEYNLALGERRANAVKEFILGCDRSLSPRISTQ

AM854_AMBR 121 SRGKAPEVLVYSSDFKEAEKAHAQNRRVVLIVECQHSVSPKKKMAIKWPFSSFGRSAAKQ
AM854_AMSM 121 SRGKAPEVLVYSSDFKEAEKAHAQNRRVVLIVECQHSVSPKKKMAIKWPFSSFGRSAAKQ
AM854_AMFL 121 SRGKAPEVLVYSSDFKEAEKAHAQNRRVVLIVECQHSVSPKKKMAIKWPFSSFGRSAAKQ
AM854_AMCE 121 SRGKAPEVLVYSSDFKEAEKAHAQNRRVVLIVECQHSVSPKKKMAIKWPFSSFGRSAAKQ

AM854_AMBR 181 DDVGSSEVSDENPVDDSSSEGIASEEAAPEEGVVSEEAEEEAPEVAQDSSAGVVAPE
AM854_AMSM 181 DDVGSSEVSDENPVDDSSSEGIASEEAAPEEGVVSEEAEEEAPEVAQDSSAGVVAPE
AM854_AMFL 181 DDVGSSEVSDENPVDDSSSEGIASEEAAPEEGVVSEEAEEEAPEVAQDSSAGVVAPE
AM854_AMCE 181 DDVGSSEVSDENPVDDSSSEGIASEEAAPEEGVVSEEAEEEAPEVAQDSSAGVVAPE

```

**Figura 42** - Alinhamento múltiplo da seqüência preditiva de aminoácidos de AM854, demonstrando homologia entre os isolados AMBR, AMSM, AMFL e AMCE.



**Figura 43** – Fig.1. Árvore filogenética construída através software MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining com valores de bootstrap para 1000 réplicas obtida através da análise das seqüências preditivas de aminoácidos da proteína AM854 dos isolados de *A. marginale* AMBR, AMSM, AMFL, AMCE.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados sugerem o isolado de *Borrelia* presente nas amostras de DNA estudadas sejam provavelmente mais próximas do grupo da febre recorrente baseado nas seqüências preditivas de aminoácidos de RRS e RPOB. Portanto, esses resultados não são capazes de caracterizar genotipicamente o isolado encontrado e mais estudos deverão ser realizados com sequenciamento completo de genes para aprofundar o conhecimento da espécie de *Borrelia* presente no Brasil.

Portanto, dentre as seqüências preditivas de aminoácidos das proteínas avaliadas, OMP1, OMP5, EF-Tu, VIRB3, SODB, VIRB9-1 e AM854 apresentaram os maiores níveis de homologia entre os isolados utilizados para comparação (inclusive AMCE), demonstrando alto grau de conservação. Isto sugere que estas sejam proteínas importantes para o desenvolvimento de imunógenos capazes de promover proteção cruzada entre isolados. Mais estudos deve ser realizados para elucidar a verdadeira importância dos genes *ef-tu*, *virb3*, *sodb* e *VirB9-1* e seu potencial imunogênico.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEMAN, A.R.; PALMER, G.H.; MCGUIRE, T.C.; MCELWAIN, T.F.; PERRYMAN, L.E.; BARBET, A.F. *Anaplasma marginale* major surface protein 3 is encoded by a polymorphic, multigene family. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 1, p. 156 – 163, 1997.

ALLEMAN, A.R.; MCSHERRY, L.J.; BARBET, A.F.; BREITSCHWERDT, E.B.; SORENSON, H.L.; BOWIE, M.V.; BÉLANGER, M. Recombinant major antigenic protein 2 of *Ehrlichia canis*: a potential diagnostic tool. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n. 7, p. 2494-9, 2001.

ANDERSSON, S.G.E.; ZOMORODIPOUR, A.; ANDERSSON, J.O.; SICHERITZ-PONTÉN, T.; ALSMARK, U.C.M.; PODOWSKI, R.M.; NÄSLUND, A.K.; ERIKSSON, A.S.; WINKLER, H.H.; KURLAND, C.G. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. **Nature**, v. 396, p.133-140, 1998.

ARAÚJO, F. R.; COSTA, C. M.; RAMOS, C. A. N.; FARIAS, T. A.; SOUZA, I. I. F. ; MELO, E.P.S.; ELISEI, C ; ROSINHA, G. M. S. ; SOARES, C. O.; FRAGOSO, S. P.; FONSECA, A. H. . IgG and IgG2 antibodies from cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* recognize the recombinant vaccine candidate antigens VirB9-2, VirB10, and elongation factor-Tu. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 186-190, 2008.

ARAÚJO, F.R.; MADRUGA, C.R.; SOARES, C.O.; KESSLER, R.H. Progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 139-148, 2003.

ARULKANTHAN, A.; MCGUIRE, T.C.; KNOWLES, D.P.; Biased Immunoglobulin G1 Isotype Responses Induced in Cattle with DNA Expressing msp1a of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 7, p. 3481–3487, 1999.

BARBET A.F. Recent developments in the molecular biology of anaplasmosis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, p. 43-49, 1995.

BARBOUR, A.G.; HAYES, S.F. Biology of *Borrelia* species. **Microbiology Revue**, v. 50, n. 4, p. 381-400, 1986.

BARBET, A.F.; BLENTLINGER, R.; JOOYOUNG, Y.I.; LUNDGREEN, A.M.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M. Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture, tick salivary glands, and cattle. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 102-107, 1999.

BARBET, A.F.; YI, J. Y. ; LUNDGREN, A.; MCEWEN, B.R.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K.M. Antigenic variation of *Anaplasma marginale*: Major Surface Protein 2 diversity during cyclic transmission between ticks and cattle. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 5, p. 3057-3066. 2001.

BENNETT, C.E. Ticks and Lyme disease. **Advances Parasitology**, v. 36, p.343-405, 1995.

BENXIU, J.; COLLINS, M. Seroepidemiologic survey of *Borrelia burgdorferi* exposure of dairy cattle in Wisconsin. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 9, p. 1228-1231, 1994.

BERARDI, V.P.; WEEKS, K.E.; STEERE, A.C. Serodiagnosis of early Lyme disease: analysis of IgM and IgG antibody responses by using an antibody-capture enzyme Immunoassay. **Journal of Infectious Diseases**, v. 158, p. 754-760, 1998.

BERGER, B.R.; CHRISTIE, P.J. Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* virB operon: virB2 through virB11 are essential virulence genes. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 12, p. 3646–3660, 1994.

BERKELMAN, R. L. Introduction. In: Hordsburgh C. R. Jr, Nelson A. M., editors. Pathology of emerging infections. Washington, D.C.: **American Society for Microbiology**, p. 1–5. 1997.

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

BOWIE, M. V.; DE LA FUENTE, A.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E.F.; BARBET, A.F. Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. **Gene**, v. 282, p. 95–102, 2002.

BRAYTON K.A., KNOWLES D.P., MCGUIRE T.C.; PALMER G.H. Efficient use of a small genome to generate antigenic diversity in tick-borne ehrlichial pathogens. **The Proceedings of the National Academy of Sciences (US)**, v. 98, n. 7, p. 4130-4135, 2001.

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

BRAYTON, K.A., PALMER, G.H.; BROWN, W.C.; Genomic and proteomic approaches to vaccine candidate identification for *Anaplasma marginale*. **Expert. rev. vaccines**, v.5, n.1, p. 95-101, 2006.

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

BRIZUELA, C.M.; ORTELLADO, C.A.; SANABRIA, E.; TORRES, O.; ORTIGOSA, D. The safety and efficacy of Australian tick-borne disease vaccine strains in cattle in Paraguay. **Veterinary Parasitology**, v. 76, p. 27–41, 1998.

BROWN, W.C., SHKAP, V., ZHU, D., MCGUIRE, T.C., TUO, W.; MCELWAIN, T.F.; PALMER, G.H. Cd4(+) t-lymphocyte and immunoglobulin responses in calves immunized with a *A. marginale* outer membranes and protect against homologous challenge. **Infection and Immunity** v.66, n. 11, p. 5406-5413. 1998a.

BROWN, W.C., ZHU, D., SHKAP, V., MCGUIRE, T.C., BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M.; PALMER, G.H. The repertoire of *Anaplasma marginale* antigens recognized by Cd4(+) t-lymphocyte from protectively immunized cattle is diverse and include major surface protein 2 (msp2) and msp3. **Infection and Immunity**, v.66, n.11, p.5414-5422 1998b.

BROWN, W.C.; MCGUIRE, T.C.; ZHU, D.; LEWIN, H.A.; SOSNOW, J.; PALMER, G.H.; Highly Conserved Regions of the Immunodominant Major Surface Protein 2 of the Genogroup II Ehrlichial Pathogen *Anaplasma marginale* are Rich in Naturally Derived CD4+ T Lymphocyte Epitopes that Elicit Strong Recall Responses. **The Journal of Immunology**, v. 26, p. 1114-1124, 2001.

CICERONI, L.; BARTOLONI, A.; GUGLIELMETTI, P.; PARADISI, F.; BARAHONA, H.G.; ROSELLI, M.; CIARROCCHI, S.; CACCIAPUOTI, B. Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia parkeri* and *Borrelia turicatae* in human settlements of the Cordillera Province, Bolivia. **Journal of tropical Medicine and Hygiene**, v. 9, p. 13-17, 1994.

COLLINS, N.E.; LIEBENBERG, J.; VILLIERS, E.P.; BRAYTON, K.A.; LOUW, E.; PRETORIUS, A.; FABER, F.E.; HEERDEN, H.V.; JOSEMANS, A.; KLEEF, M.V.; STEYN, H.C.; STRIJP, M.F.V.; ZWEYGARTH, E.; JONGEJAN, F.; MAILLARD, J.C.; BERTHIER, D.; BOTHA, M.; JOUBERT, F.; CORTON, C.H.; THOMSON, N.R.; ALLSOPP, M.T.; ALLSOPP, M.B.A. The genome of the heartwater agent *Ehrlichia ruminantium* contains multiple tandem repeats of actively variable copy number. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n.3, p. 838-843, 2005.

DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K.M.; Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants in persistently infected ticks. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 8, p. 5151–5156, 2001.

DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J.C.; BLOUIN, E.F.; MCEWEN, B. R. CLAWSON, D.; KOCAN, K.M. Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of *Anaplasma marginale*. **International Journal for Parasitology** v. 31, p. 1705–1714. 2001a.

DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J.C.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p.145-153. 2001b.

DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J.C.; BLOUIN, E.F.; SALIKI, J.T.; KOCAN, K.M. Infection of tick cells and bovine erythrocytes with one genotype of the intracellular *Ehrlichia Anaplasma marginale* excludes infection with other genotypes. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 3, p. 658–668. 2002c.

DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J.C.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M.. Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells. **Veterinary Microbiology**, v.91, p. 265–283, 2003a.

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

DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K.M.; GARCIA-GARCIA, J.C.; BLOUIN, E.F.; HALBUR, T.; ONET, V. Immunization against *Anaplasma marginale* major surface protein 1a reduces

infectivity for ticks **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v.1, n.4, 2003 d.

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

DE LA FUENTE, J.; LEW, A.; LUTZ, H.; MELI, M.L.; HOFMANN-LEHMANN, R.; SHKAP, V.; MOLAD, T.; MANGOLD, A.J.; ALMAZÁN, C.; NARAJO, V.; GORTÁZAR, C.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; GARCÍA-PÉREZ, A.L.; BARRAL, M.; OPORTO, B.; CECI, L.; CARELLI, G.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M. Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. **Animal Health and Research Reviews**, v. 6, p. 75 - 89, 2005.

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKR, C.P.J.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in 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 synonymous of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p. 2145-2165. 2001.

ERIKS, I.S.; PALMER, G.H.; MCGUIRE, T.C.; ALLRED, D.R.; BARBET, A.F. Detection and quantitation of *Anaplasma marginale* in carrier cattle by using a nucleic acid probe. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, n.2, p. 279-84, 1989.

ERIKS, I.S.; STILLER, D. and PALMER, G.H. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 8, p. 2091-2096, 1993.

FONSECA, A.H.; ISHIKAWA, M.M.; SOARES, C.O.; MASSARD, C.L.; YOSHINARI, N.H. Lyme borreliose serology in cattle in Brazil. **Revista da Universidade Rural, série Ciências da Vida**, v. 18, p. 85-89, 1996.

FUKUNAGA M.; KOREKI Y. The flagellin gene of *Borrelia miyamotoi* sp. nov. and its phylogenetic relationship among *Borrelia* species. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 134, n. 2-3, p. 255-258. 1995.

FUKUNAGA, M.; OKADA, K.; NAKAO, M.; KONISHI, T.; SATO, Y. Phylogenetic analysis of *Borrelia* species base don flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease *borreliae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 46, n. 4, p. 898-905, 1996b.

FRASER, C.M.; CASJENS, S.; HUANG, W.M.; SUTTON, G.G.; CLAYTON, R.; LATHIGRA, R.; WHITE, O.; KETCHUM, K.A.; DODSON, R.; HICKEY, E.K. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. **Nature**, v.390, p. 580-586, 1997.

FRENCH, D.M., MCELWAIN, T.F.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H. Expression of *A. marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 3, p. 1200-1207, 1998.

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

GE, Y.; RIKIHISA, Y. Identification of novel surface proteins of *Anaplasma phagocytophilum* by affinity purification and proteomics. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 21, p. 7819–7828, 2007.

GLÖCKNER, G.; LEHMANN, R.; ROMUALDI, A.; PRADELLA, S.; SCHULTE-SPECHTEL, U, SCHILHABEL, M.; WILSKE, B.; SEUHNEL, J.; PLATZER, M. Comparative analysis of the *Borrelia garinii* genome. **Nucleic Acids Research**, v.32, n. 20, p. 6038–6046, 2004.

GONÇALVES RUIZ, P.M.; PASSOS, L.M.F.; RIBEIRO, M.F.B. Lack of transmission of a brazilian *Anaplasma marginale* isolate with appendage by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: **Proceedings of the fourth international Conference on ticks and tick-borne pathogens, University of Alberta, Banff, Canadá**, p. 41, 2002.

HERNDON, D.R.; PALMER, G.H.; SHKAP, V.; KNOWLES, JR. D.P.; BRAYTON, K.A. Complete Genome Sequence of *Anaplasma marginale* ss. *Centrale*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, p. 379-80, 2010.

HOPE, M.; RIDING, G.; MENZIES, M.; WILLADSEN, P. A novel antigen from *Anaplasma marginale*: characterization, expression and preliminary evaluation of the recombinant protein. **Vaccine**, v. 22, issue 3-4, p. 407– 415, 2004.

HOTOPP, J.C.D.; LIN, M.; MADUPU, R.; CRABTREE, J.; ANGIUOLI, S.V.; EISEN, J.; SESHADRI, R.; REN, Q.; WU, M.; UTTERBACK, T.R.; SMITH, S.; LEWIS, M.; KHOURI, H.; ZHANG, C.; NIU, H.; LIN, Q.; OHASHI, N.; ZHI, N.; NELSON, W.; BRINKAC, L.M.; DODSON, R.J.; ROSOVITZ, M.J.; SUNDARAM, J.; DAUGHERTY, S.C.; DAVIDSEN, T.; DURKIN, A.S.; GWINN, M.; HAFT, D.H.; SELENGUT, J.D.; SULLIVAN, S.A.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; BENAHMED, F.; FORBERGER, H.; HALPIN, R.; MULLIGAN, S.; ROBINSON, J.; WHITE, O.; RIKIHISA, Y.; TETTELIN, H. Comparative Genomics of Emerging Human Ehrlichiosis Agents. **Public Library of Science - Genetics**, v. 2, p. 208-223, 2006.

ISHIKAWA, M.M. Epidemiologia da borreliose de Lyme em bovinos na região sudeste do Brasil e Padronização do diagnóstico sorológico. Tese de Mestrado, UFRRJ, Rio de Janeiro, p. 51, 1996.

JONGEJAN, F.; THIELEMANS, M.J.C. Identification of an immunodominant antigenically conserved 32-kilodalton protein from *Cowdria ruminantium*. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 10, p. 3243-3246, 1989.

KANO, F.S.; TAMEKUNI, K.; COELHO, A. L.; GARCIA, J.L.; VIDOTTO, O.; ITANO, E.N.; VIDOTTO, M. C. Induced immune response of Dna vaccine encoding an association MSP1a, MSP1b, and MSP5 antigens of *Anaplasma marginale*. **Vaccine**, v. 26, n. 27-28, p. 3522-3527, 2008.

KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos. Embrapa Gado de Corte: Campo Grande - MS, 157p. 1998.

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

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A. A.; MELÉNDEZ, R. D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 4, p. 698–712. Oct. 2003.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A. A.; MELÉNDEZ, R. D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clinical Microbiology reviews**, v. 16, n. 4, p. 698-712, 2003c.

KRIEG, N.R, HOLT, J.G. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9.ed. Baltimore : Williams & Wilkins, 1268p. 1984.

LESCOT, M.; AUDIC, S.; ROBERT, C.; NGUYEN, T.T.; BLANC, G.; CUTLER, S.J.; WINCKER, P.; COULOUX, A.; CLAVERIE, J.M.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. The genome of *Borrelia recurrentis*, the agent of deadly louse-borne relapsing fever, is a degraded subset of tick-borne *Borrelia duttonii*. **Public Library of Science - Genetics**. v. 4, n. 9, 2008.

LIN, Q.; RIKIHISA, Y.; OHASHI, N.; ZHI, N.; Mechanisms of Variable p44 Expression by *Anaplasma phagocytophilum*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 10, p. 5650–5661, 2003.

LOPEZ, J.E.; BEARE, P.A.; HEINZEN, R.A.; NORIMINE, J. LAHMERS, K.K.; PALMER, G.H.; BROWN, W.C. High-throughput identification of T-lymphocyte antigens from *Anaplasma marginale* expressed using in vitro transcription and translation. **Journal of Immunological Methods**, v.332, p. 129-141. 2008.

LOPEZ, J.E.; PALMER, G.H.; BRAYTON, K.A.; DARK, M.J.; LEACH,S.E.; BROWN, W.C. Immunogenicity of *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins in a protective outer membrane vaccine. **Infection and Immunity**, v.75, n.5, p. 2333-2342, 2007.

LOPEZ, J.E.; SIEMS, W.F.; PALMER, G.H.; BRAYTON, K.A.; MCGUIRE, T.C.; NORIMINE, J.; BROWN, W.C. Identification of novel antigenic proteins in a complex *Anaplasma marginale* outer membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 8109–8118, 2005.

LÖHR, C.V.; BRAYTON, K.A.; SHKAP, V.; MOLAD, T.; BARBET, A.F.; BROWN, W.C.; PALMER, G.H. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 operon-associated proteins during mammalian and arthropod infection. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 11, p. 6005–6012, 2002.

MACMILLAN, H.; NORIMINE, J.; BRAYTON, K.A.; PALMER, G.H. BROWN, W.C. Physical Linkage of natural complexed bacterial outer membrane proteins enhances immunogenicity. **Infection and Immunity**, v.76, n. 3, p. 1223 – 1229, 2008.

MCGAREY D.J., BARBET A.F., PALMER G.H., MCGUIRE T.C.; ALLRED D.R. Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b. **Infection and Immunity**, v.62, n. 10, p.4594-4601, 1994.

MADRUGA C.R., GOMES A., SCHENK M.A.M., KESSLER R.H., GRATÃO, G., GALES M.E., SCHENK, J.A.P., ANDREASI, M., BIANCHIN I.; MIGUITA M. Etiologia de algumas

doenças de bezerros de corte no Estado de Mato Grosso do Sul. **Circular Técnica 15**, Embrapa-CNPGC, Campo Grande, MS. 27p. 1984.

MADRUGA C.R., KESSLER R.H., GOMES A., SCHENK M.A.M.; ANDRADE D.F. Níveis de anticorpos e parasitemia de *A. marginale* em área enzoótica, nos bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 20, p.135-142, 1985.

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

MARTINS, J.R.; CERESÉR, V.H.; CORRÊA, B.L.; SMITH, R.D. *Borrelia theileri*: Observation on *Boophilus microplus* ticks in Guaíba, Rs, Brazil. **Ciência Rural**, v.26, n.3, p. 447-450, 1996.

MOLAD, T.; BRAYTON, K.A.; PALMER, G.H.; MICHAELI, S.; SHKAP, V. Molecular conservation of MSP4 and MSP5 in *Anaplasma marginale* and *A. marginale centrale* vaccine strain. **Veterinary Microbiology**, v.100, p.55–64. 2004.

NIU, H.; RIKIHISA, Y.; YAMAGUCHI, M.; OHASHI, N. Differential expression of VirB9-2 and VirB6 during the life cycle of *Anaplasma phagocytophilum* in human leucocytes is associated with differential binding and avoidance of lysosome pathway. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 3, 523–534, 2006.

NOH, S.M.; BRAYTON, K.A.; KNOWLES, D.P.; AGNES, J.T.; DARK, M. J.; BROWN, W.C.; BASZLER, T.V.; PALMER, G.H. Differential expression and sequence conservation of the *Anaplasma marginale* msp2 gene superfamily outer membrane proteins. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 6, p. 3471-3479, 2006.

NOH, S.N.; BRAYTON, K.A.; BROWN, W.C.; NORIMINE, J.; MUNSKE, G.R.; DAVITT, C.M.; PALMER, G.H. Composition of the surface proteome of *Anaplasma marginale* and its role in protective immunity induced by outer membrane immunization. **Infection and Immunity**, v.76, n.5, p. 2219–2226, 2008.

OHASHI, N.; ZHI, N.; LIN, Q.; RIKIHISA, Y. Characterization and Transcriptional Analysis of Gene Clusters for a Type IV Secretion Machinery in Human Granulocytic and Monocytic Ehrlichiosis Agents. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 4, p. 2128–2138, 2002.

PALMER, G.H.; BARBET, A.F.; CANTOR, G.H.; MCGUIRE, T.C. Immunization of Cattle with the MSP-1 Surface Protein Complex Induces Protection against a Structurally Variant *Anaplasma marginale* Isolate. **Infection and Immunity**, v.57, n.11, p. 3666-3669, 1989.

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

PALMER, G.H.; RURANGIRWA, F.R.; KOCAN, K.M.; BROWN, W.C. Molecular Basis for Vaccine Development against the Ehrlichial Pathogen *Anaplasma marginale*. **Parasitology Today**, v. 15, n. 7, 1999.

- PALMER, G.H.; KNOWLES JR, D.P.; RODRIGUEZ, J.L.; GNAD, D.P.; HOLLIS, L.C.; MARSTON, T.; BRAYTON, K.A. Stochastic transmission of multiple genotypically distinct *Anaplasma marginale* strains in a herd with high prevalence of *Anaplasma* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5381–5384, 2004.
- PALMER, G.H. The highest priority: what microbial genomes are telling us about immunity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 85, p. 1-8, 2002.
- PIPANO, E. Live vaccines against hemoparasitic diseases in livestock. **Veterinary Parasitology**, v. 57, p. 213-231, 1995.
- POPOV, V. L.; HAN, V. C.; CHEN, S. M.; DUMLER, J. S.; FENG, H. M.; ANDREADIS, T. G.; TESH, R. B.; WALKER, D. H. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, p. 235-251, 1998.
- QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K.; CARTER, G.R. Clinical Veterinary Microbiology. First Edition. **Wolfe Publishing**, London, p.292-303. 1994.
- RAMOS, C.A.; ARAÚJO, F.R.; OSÓRIO, A.L.; MADRUGA, C.R.; ROSINHA, G.M.; SOARES, C.O.; ELISEI, C. Transcription of genes of membrane proteins of Brazilian isolates of *Anaplasma marginale*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 3, p. 152-155, 2007.
- RENESTO, P.; LORVELLEC-GUILLON, K.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. *rpoB* gene analysis as a novel strategy for identification of spirochetes from the genera *Borrelia*, *Treponema*, and *Leptospira*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, 2200-3, 2000.
- RICH S.M., ARMSTRONG P.M., SMITH R.D., TELFORD S.R. 3RD. Lone star tick-infecting *borreliae* are most closely related to the agent of bovine borreliosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.2, p.494-497. 2001.
- RIDING, G.; HOPE, M.; WALTISBUHL, D.; WILLADSEN. P. Identification of novel protective antigens from *Anaplasma marginale*. **Vaccine**, v. 21, issue 17 – 18, p. 1874-1883, 2003.
- RIKIHISA, Y. Mechanisms to create a safe haven by members of the family Anaplasmataceae. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 990, p. 548–555, 2003.
- RODRIGUEZ, S.D.; GARCIA ORTIZ, M.A.; HERNANDEZ SALGADO, G.; SANTOS CERDA, N.A.; ABOYTES TORRES, R. CANTO ALARCOC G.J. *Anaplasma marginale* inactivated vaccine: dose titration against a homologous challenge. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 23, p. 239-252, 2000.
- RODRÍGUEZ, J.L.; PALMER, G.H.; KNOWLES JR, D.P.; BRAYTON, K.A. Distinctly different *msp2* pseudogene repertoires in *Anaplasma marginale* strains that are capable of superinfection. **Gene**, v.361, p. 127–132. 2005.
- ROGERS, A.B.; SMITH, R.D.; KAKOMA, I. Serologic cross-reactivity of antibodies against *Borrelia burgdorferi*, and *Borrelia coreaceae* in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 6, p. 695-697, 1999.



SMITH, R.D., MIRAPURI, G.S., ADAMS, J.H., AHRENS, E.H. *Borrelia theileri*: Isolation from ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) and tick-borne transmission between splenectomized calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, p. 1396-1398. 1985.

SMITH, R.D.; ROGERS, A.B. *Borrelia theileri*: A Review. **Journal of Spirochetel and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 4, p. 63-68, 1998.

SOARES, C.O.; SOUZA, J.C.P., MADRUGA, C.R.; MADUREIRA, R.C.; MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H. Soroprevalência de *Babesia bovis* em bovinos na Mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 75-79, 2000.

STEERE, A.C. Lyme Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 2, p.115-125, 2001.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S.; MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p.1596-1599, 2007.

TEBELE, N.; PALMER, G.H. Crossprotective immunity between the Florida and Zimbabwe stock of *Anaplasma marginale*. **Tropical Animal Health and Production**, v. 23, pág. 197–202, 1991.

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, Transval, South Africa. **Veterinary Bacteriology, Department of Agriculture** (1908,1910), p. 7-64, 1910.

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; LOEHR, B.I.; BABIUK, L.A. Immunization of livestock with DNA vaccines: current studies and future prospects. **Vaccine**, v.19, p. 2474–2479. 2001.

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

YOSHINARI, N.H.; STEERE, A.C.; COSSERMELLI, W. Revisão da borreliose de Lyme. **Revista da Associação Médica do Brasil**, v. 35, n. 1, p. 34-37, 1989.

## **7 ANEXOS**

## **7 ANEXOS**

Anexo A - Extração de DNA carrapatos	80
ANEXO B - Artigo enviado para revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz	81

## Anexos A

### Anexo A - Extração de DNA carrapatos

- Adicionar nitrogênio líquido à 1g de carrapatos em recipiente adequado e macerá-los.
- Acrescentar 500 µL de SDS a 20%, agitar vigorosamente em *vórtex* e incubar a 65°C por 1 hora;
- Remover o tubo da incubação e adicionar 800 µL de clorofórmio. Agitar vigorosamente em *vórtex* até completa homogeneização;
- Acrescentar 350 µL de solução de precipitação protéica e homogeneizar novamente em *vortex*;
- Centrifugar a 18.000 x g por 10 minutos;
- Pipetar a fase aquosa e transferi-la para outro tubo;
- Adicionar 1 mL de etanol 100%, homogeneizar por inversão até ocorrer à formação de um precipitado, o qual deverá ocorrer entre 30 e 60 segundos. Caso não ocorra visualização do precipitado, esperar mais 10 minutos;
- Centrifugar a 13.000 rpm por cinco minutos;
- Desprezar o sobrenadante e acrescentar 1 mL de etanol 70% a -20°C;
- Centrifugar novamente por dois minutos, desprezando o sobrenadante em seguida;
- Centrifugar por 1 minuto e retirar o resíduo de etanol com o auxílio de uma pipeta;
- Inverter o tubo para secagem do sedimento;
- Adicionar 100 µL de água ultrapura (ou TE) e homogeneizar lentamente;
- Incubar a 65°C por cinco minutos.

### Fórmulas dos reagentes

#### SDS 20%

- 2 g de SDS
- H<sub>2</sub>O q.s.p. 10 mL

#### Solução de precipitação protéica

- Acetato de potássio 5 M: 6 mL
- Ácido acético glacial: 1,1 mL
- H<sub>2</sub>O: 2,9 mL

Obs: esta solução deve ser estocada a 4°C.

## ANEXO B

ANEXO B - Artigo enviado para revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

### Protein Genetic Analysis of *A. marginale*

#### **Analysis of membrane protein genes in a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale***

Daniel S. G. Junior<sup>1</sup>, Flávio R. Araújo<sup>2</sup>, Nalvo F. A. Junior<sup>3</sup>, Said S. Adi<sup>3</sup>, Luciana M. Cheung<sup>3</sup>, Stenio P. Fragoso<sup>4</sup>, Carlos A. N. Ramos<sup>2</sup>, Renato Henrique M. de Oliveira<sup>2</sup>, Caroline S. Santos<sup>1</sup>, Gisele Bacanelli<sup>2</sup>, Cleber O. Soares<sup>2</sup>, Grácia M.S. Rosinha<sup>2</sup>, Aivaldo H. Fonseca<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brazil; <sup>2</sup>Embrapa Gado de Corte, BR 262, Km 04, Caixa postal 154, Campo Grande, MS, 79002-970, Brazil; <sup>3</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil; <sup>4</sup>Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

Corresponding author: Embrapa Gado de Corte, BR 262, Km 04, Caixa postal 154, Campo Grande, MS 79002-970, Brazil. E-mail: flabio@cnpqg.embrapa.br

**Financial support:** CNPq, FUNDECT, FINEP

### SUMMARY

The complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* has enabled the identification of several genes that encode membrane proteins, thereby increasing the chances of identifying candidate immunogens. Little is known regarding the genetic variability of genes that encode membrane proteins in *A. marginale* isolates. The aim of the present study was to determine the degree of conservation of the predicted amino acid sequences of OMP1, OMP4, OMP5, OMP7, OMP8, OMP10, OMP14, OMP15, sodB, OPAG1, OPAG3, virB3, virB9-1, pepA, EF-TU, and AM854 in a Brazilian isolate of *A. marginale* compared to other isolates. Hence, primers were used to amplify these genes: *omp1*, *omp4*, *omp5*, *omp7*, *omp8*, *omp10*, *omp14*, *omp15*, *sodb*, *opag1*, *opag3*, *virb3*, *VirB9-1*, *pepA*, *ef-tu*, and *am854*. After PCR amplification, the products were cloned and sequenced using the SANGER method and the predicted amino acid sequence were multi-aligned using the CLUSTAL W and MEGA 4 programs, comparing the predicted sequences between the Brazilian, Saint Maries, Florida and *A. marginale centrale* isolates. With the exception of outer membrane protein (OMP) 7, all proteins exhibited 92 to 100% homology to the other *A. marginale* isolates. However, only OMP1, OMP5, EF-Tu, VirB3, SODb and VirB9-1 were selected as potential immunogens capable of promoting cross-protection between isolates due to the high degree of homology (over 72%) also found with *A. (centrale) marginale*.

**Key words:** Membrane proteins, OMPs, *Anaplasma marginale*, Brazil

## INTRODUCTION

The outer membrane of intracellular bacterial pathogens transmitted by ticks determines the necessary functions for survival, replication and transmission. Thus, proteins expressed on the surface of these pathogens are potential candidates for vaccine development, targeting the induction of protective immune response in the vertebrate host and/or prevention of the colonization of the tick vector. The identification of surface proteomes is critical to the development of vaccines and this process has been accelerated by genome sequencing (Noh et al. 2008). A number of complete genome sequences of the family *Anaplasmataceae* have recently been reported, including *Anaplasma marginale* (Brayton et al. 2005), *Anaplasma marginale* ss. *centrale* (Herndon et al. 2009), *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Neorickettsia sennetsu* (Hotopp et al. 2006), *Ehrlichia canis* (Mavromatis et al. 2006) and *Ehrlichia ruminantium* (Collins et al. 2005).

Genome sequencing combined with subsequent proteomic studies on *A. marginale* has enabled the identification of several membrane proteins and expanded the range of vaccine candidates (Lopez et al. 2005; Brayton et al. 2006; Noh et al. 2008; Lopez et al. 2008). However, some membrane proteins of this rickettsia vary between and even within isolated depending on the rickettsemia cycle (Palmer et al. 2000). In the specific case of the protein MSP2, genetic variability is due to the rearrangement of more than 10 whole functional pseudogenes with a single gene expression site (Brayton et al. 2001; 2005). The number of distinct configurations is exponentially increased by the conversion of gene segments, in which mosaics from the expression site are generated by the recombination of oligonucleotide segments from multiple allele donors (Barbet et al. 2000; Brayton et al. 2002; Palmer et al. 2009). This process involves evasion by the rickettsia from the immune response and ensures the maintenance of infections with low cyclical rickettsemia in the immune host (Palmer et al. 2000). Genetic variability is one of the factors to be considered in the evaluation of candidates for the development of vaccines, as it can result in significant antigen polymorphism and impede cross-protection between isolates (Palmer et al. 2000).

The aim of the present study was to assess the conservation of membrane proteins from a Brazilian isolate of *A. marginale* and compare the findings with other known isolates.

## MATERIALS AND METHODS

***Anaplasma marginale* isolate** - The *Pernambuco-Zona da Mata* isolate of *Anaplasma marginale* (AMBR) was maintained in liquid nitrogen in stabilized form of infected blood containing 10% glycerol at *Embrapa Gado de Corte* [Brazilian Cattle Research Institute], Campo Grande, MS, Brazil. Rickettsemia in the sample at the time of the preparation of the stabilized solution was 87%.

DNA extraction was performed with the *Easy DNA* kit (Invitrogen) following to the manufacturer's instructions. The concentration of extracted DNA and the  $A_{260}/A_{280}$  ratio were determined with the aid of a *GeneQuant* spectrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech, USA).

**Gene Amplification by PCR for sequencing** – The membrane proteins prioritized in this work were those with less information available and those that amplification was successful. Primers were designed as described in Ramos et al. (2007) for the amplification of the *omp1*, *omp4*, *omp5*, *omp7*, *omp8*, *omp10*, *omp14*, *omp15*, *sodb* (*am197*), *opag1*, *opag3*, *virb3*, *virb9-1* (Conjugal transfer protein/*am097*), *pepA* (*am956*), *ef-tu* (*am254*) and *am854* genes (Table 1) using the polymerase chain reaction (PCR) method. Amplification reaction mixtures were prepared in a volume of 25  $\mu$ L containing 10 mM of Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM of KCl, 1.5 mM of  $MgCl_2$ , 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 12 pmol of each primer, 100 ng of genomic DNA and 1.25 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen).

Amplifications were carried out in a thermocycler (MyCycler, Biorad) as follows: 94° C for 1 minute (denaturation); 30 cycles at 94° C for 1 minute (denaturation), 55° C for 30 seconds (annealing) and 72° C for 1 minute (extension). The PCR products were analyzed through electrophoresis in 1% agarose gel stained with SybrGold (Invitrogen).

The amplicons were cloned in plasmid pGEM-T Easy (Promega, USA) following the manufacturer's instructions. The recombinant plasmids were then used to transform *Escherichia coli* (TOP-10) cells, which were seeded in Luria-Bertani agar (LB) containing 100 µg/mL of ampicillin. The plates were incubated at 37° C for approximately 12 hours and the colonies were submitted to PCR with M13 primers to confirm the presence of the inserts. Positive PCR colonies (one per gene) were grown in an LB medium broth with ampicillin and at 37° C for 12 hours under agitation. The cells were then recovered through centrifugation and submitted to extraction of plasmid DNA using the Wizard Plus Minipreps kit (Promega).

**Sequencing and Analysis** - Sequencing reactions were performed using with the BigDye Terminator (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. Gene sequences were obtained with an automatic sequencer (model ABI 3130, Applied Biosystems). Four sequence reactions were performed for each gene two with the M13 forward primer and two with the M13 reverse primer.

The genes were assembled and the consensus sequence was generated with the aid of the Sequencher program v.4.1.4 (Gene Codes). The search for homology was performed using the BLASTn algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), with comparisons to the sequences obtained from the following *A. marginale* isolates: Saint Maries (AMSM) (Genbank CP000030), Florida (AMFL) (Genbank CP001079) and *A. marginale centrale* (AMCE) (Genbank CP001759).

Predictive amino acid sequences in the genes of the Brazilian *A. marginale* isolate were obtained using the MEGA v. 4.0 program (Tamura et al. 2007) and multiple alignment between these sequences and those from the *A. marginale* saint maries isolate, *A. marginale florida isolate* and *A. marginale centrale* isolates was performed using the CLUSTAL W algorithm (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

## RESULTS AND DISCUSSION

The predicted amino acid sequence alignments of membrane proteins from the Brazilian (accession numbers in table 2) and American *A. marginale* isolates had degrees of homology over 92% between most of the sequences (Table 2), thereby demonstrating conservation.

The membrane protein genes in *A. marginale* are grouped into 2 superfamilies: MSP1 and MSP2 (Brayton et al. 2005). Most members of the MSP1 superfamily in the American *sensu stricto* isolates (*A. marginale* St. Maries and *A. marginale* Florida), such as MSP1a, MSP1b 1-2 and MLP 2-4, have low degrees of conservation, with only 13 to 48% homology between amino acids (Herndon et al. 2009). The MSP2 superfamily has a number of conserved genes, some of which were studied in the present investigation.

Operon-associated genes (OPAG) 1 and 3 are components of the MSP2 superfamily and their function remains unknown (Lohr et al. 2002). The observation that structural genes of bacteria are often organized into groups that encode proteins that have related functions (Lewin 2000 apud Lohr et al. 2002) suggests that OPAG proteins takes part in interactions in the membrane of *A. marginale*. It is unknown whether the OPAG1 gene is expressed in small amounts or not expressed at all. OPAG3 is expressed only within erythrocytes during acute rickettsemia. The differential expression of outer membrane proteins within the same operon is a new finding in tick-transmitted bacteria and expression regulation should be broadly applicable in order to understand how the pathogen adapts to transitions in the host (Lohr et al. 2002).

The American isolates exhibit predicted amino acid sequences of the proteins OPAG1 and OPAG3 identical to each other, with 100% and 95% of homology with *A. marginale* brazilian isolate, respectively. *A. marginale centrale* does not have the OPAG1 gene and its predicted amino acid sequence for OPAG3 only demonstrated 66% homology with the *A. marginale* brazilian isolate sequence. Therefore, although the degree of conservation in the OPAG1 gene is greater than that found in OPAG3 for the Saint Maries and Florida isolates of *A. marginale*, OPAG3 is probably a better candidate vaccine component. However, while *A. marginale centrale* lacks the OPAG1 gene, the immunity achieved by vaccination with this isolate is sufficient to prevent the development of clinical disease in cattle (Pipano, 1995). How this protection is achieved with OPAG3 remains unknown.

Fifteen OMPs with similar sequences to MSP2 and/or MSP4 have been identified in the MSP2 superfamily. These genes can be grouped separately or in structures similar to an operon (Brayton et al. 2006). Within this group, OMP2, OMP3 and OMP6 are probably pseudogenes, as their transcripts have not been detected in erythrocyte stages of different *A. marginale* isolates (Noh et al. 2005, Ramos et al. 2007).

OMPs 4, 7, 10 and 14 are proteins the functions of which remain undefined in *A. marginale*. These proteins are designated as members of the MSP2 superfamily due to sequence identity with surface antigens of the family PFAM01617 (Brayton et al. 2005). However, these OMPs are the targets of antibodies induced by the immunization of cattle with purified outer membranes (Lopez et al. 2005) and specifically by IgG2, which is associated with protective immunity (Brown et al. 1998).

The vaccine isolate *A. marginale centrale* has the genes OMP1, OMP4, OMP5, OMP7, OMP9, OMP10, OMP11, OMP12, OMP13 and OMP14 in its genome (Genbank CP001759). According to Herndon et al. (2009), the family of OMPs 1 to 15 present in the *sensu stricto* American isolates of *A. marginale* is reduced in *A. marginale centrale* which there are no distinct genes to omp7, omp8 and omp9, while they are assembled into a single coding region constituting a operon and homologous OMPs 2, 3, 6 and 15 are missing. In the present study, not all the genes in *A. marginale centrale* were studied; however, the predicted amino acid sequences of OMPs 1, 4, 5, 7, 8, 10 and 14 respectively exhibited 72%, 66%, 75%, 38% 65%, 65% and 70% of homology between the *A. marginale* brazilian isolate sequences (Table 2).

Considering the OMPs in the *A. marginale* studied, OMP1, OMP5 and OMP10 take on greater importance among antigens derived from the membrane of rickettsia due to the greater than 94% homology with predicted amino acid sequences of the other isolates studied (Table 2). As the inoculation of *A. marginale centrale* can protect against isolates of *A. marginale* (Pipano 1995), these above-mentioned proteins that have over 65% sequence homology with *A. marginale centrale* are probably the best candidate vaccine antigens among the OMPs studied.

For the predicted amino acid sequences of the *A. marginale* brazilian isolate OMP analyzed in the present study, most exhibited greater than 92% homology with the American isolates, indicating that the genes in this family of proteins are also conserved in the Brazilian isolate. However, the predicted OMP15 amino acid sequence in the *A. marginale florida* isolate (available on Genbank) is not complete and has only 105 amino acids (Figure 1).

OMP7 was the only protein with predictive amino acid sequence homology below 90% (Figure 2). According to Noh et al. (2006), this variation is probably associated with nucleotide substitutions in the central region of this gene, which maintain the reading frame but introduce variations in amino acids. The genes that encode OMPs 7 to 9 share large areas of identity at the 5' and 3' terminations, where recombination can occur, while C and N terminal areas exhibit relative conservation.

The protein leucyl aminopeptidase (PepA) and elongation factor Tu (EF-Tu) were previously classified as cytoplasmic proteins, but, after an *in silico* analysis by the TMHMM



program, were suggested to be proteins anchored to the outer membrane and exposed to the extracellular environment (Lopez et al. 2005). Leucyl aminopeptidase is an enzyme that promotes the breaking of peptide bonds by hydrolysis in the metabolic pathways of amino acids. After alignment, the predictive amino acid sequence of the protein PepA in *A. marginale* brazilian isolate exhibited 97% homology with the sequences of the same gene in *A. marginale* saint maries isolate and *A. marginale* florida isolate and 65% homology with the gene in *A. marginale centrale* (Table 2). The percentage of homology found for the sequence of this protein is relatively high considering its size (521 amino acids) and the fact that the protein sequence in the *sensu stricto* American isolate differs from the *A. marginale* brazilian isolate sequence by only four amino acids. As PepA after analysis, was suggested to be a membrane associated protein, and it's protein provides a conserved predictive amino acid sequence, more studies should be devoted to the evaluation of its immunogenicity and potential as a vaccine antigen.

EF-Tu is an enzyme belonging to the family of hydrolases involved in protein synthesis, promoting the elongation of the chain during the synthesis of polypeptides in the ribosome. Ramos et al. (2007) assessed the transcription pattern of several genes in membrane proteins in *A. marginale*, including EF-Tu, which, after analysis, was suggested to be a membrane-associated protein (Lopez et al. 2005). Araújo et al. (2008) and Lopez et al. (2008) expressed EF-tu in *Escherichia coli* and the recombinant protein was able to induce a proliferative response in T lymphocytes and titers of IgG2 greater than those of IgG1, thereby demonstrating the desired capacity for immunostimulation.

The predicted amino acid sequence in EF-Tu in *A. marginale* brazilian isolate exhibited 100% of homology with the sequence in the American isolates and 97% of homology with the sequence in *A. (centrale) marginale*. In comparison to the genes in the membrane proteins investigated in the present study, EF-Tu takes on significant importance as a possible candidate vaccine antigen, as it exhibits the highest percentage of homology among the predictive amino acid sequences in the isolates analyzed and is considered a highly conserved gene. This finding corroborates a study carried out by Araújo et al. (2008), who report the conservation of this gene. Moreover, it is capable of stimulating the proliferative response in T lymphocytes, as reported by Lopez et al. (2008).

The type IV secretion system (TFSS) transports macromolecules through the membrane in an ATP-dependent way and is related to the conjugation system in Gram-negative bacteria (Niu et al. 2006). TFSS is one of the few groups of syntenic genes among all sequenced Rickettsiales, suggesting that the coordination of the expression of these genes is critical (Hotopp et al. 2006). It is possible that TFSS expression is regulated and associated with survival in intracellular bacteria (Niu et al. 2006). Due to its location on the surface, its highly conserved nature and intracellular survival requirements, TFSS proteins in Gram-negative bacteria are consistent targets of immunological investigations (Lopez et al. 2007). In the present study, the predicted amino acid sequences of two TFSS proteins were analyzed: VirB3 and VirB9-1 (Sutten et al. 2010).

The function of VirB3 is not well defined, and VirB9-1 is responsible for the transfer of protein-DNA complexes and macromolecules between cells (Lopez et al. 2007).

After alignment with the previously mentioned isolates, the predicted amino acid sequences in VirB3 and VirB9-1 in *A. marginale* brazilian isolate exhibited nearly 100% homology with the American *sensu stricto* isolates (Table 2) and approximately 96% of homology with *A. marginale centrale* (Table 2), thereby demonstrating a high degree of conservation. In studies with other TFSS group members (VirB9-2 and VirB10), Araújo et al. (2008) and Vidotto et al. (2008) suggest conservation among different isolates of *A. marginale* and demonstrated that the proteins VirB9-2 and VirB10 are recognized by antibodies from naturally and experimentally infected cattle. The VirB3 protein in *A.*

*marginale* brazilian isolate has the same conservation profile as other components of the TFSS group analyzed by Araújo et al. (2008); thus, it is expected to exhibit the same antigen profile, as the conservation of B cell epitopes between and within isolates is likely important for controlling infection. Lopez et al. (2007) also found that VirB9-2, VirB10 and VirB9-1 are conserved among isolates. Furthermore, these proteins are recognized by effector cells of the immune system in cattle inoculated with the outer membrane of *A. marginale*.

Superoxide dismutases (SOD) are metalloenzymes that catalyze the dismutation reaction  $O_2 \rightarrow H_2O_2 \rightarrow O_2$ . There are other types of SODs that are distinguished by the metal present in the active site (ex: MnSOD, ZnSOD). According to Ohashi et al. (2002), the SODb gene in *Anaplasma* and *Ehrlichia* spp probably encodes a FeSOD. Iron SODs and manganese SODs are known to defend bacterial cells from reactive oxygen generated from the bacterial metabolism and to protect DNA from oxidation damage.

The alignment of the predicted amino acid sequence of SOD of *A. marginale* brazilian isolate with the others analyzed in this work, exhibited nearly 100% homology with the American *sensu stricto* isolates (Table 2) and 89% of homology with *A. marginale centrale* (Table 2). Thus, as SOD is also highly conserved among *A. marginale* strains, the immunogenic potential of this protein should also be examined for vaccine development.

Lopez et al. (2005) annotated AM854 in *A. marginale* genome as a putative protein without defined function and Blast search showed identity with an OMP and peptidoglycan-associated protein in *E. canis*.

Noh et al. (2008) report that AM854 along with other proteins, were identified on the surface of *A. marginale* from erythrocytes and tick cells. The predictive amino acid sequence for the gene *am854* in *A. marginale* brazilian isolate exhibited 100% homology with the sequences in the American isolates (Table 2). According to Lopez et al. (2005), AM854, along with other proteins, was recognized by IgG in at least one animal, thereby proving to be antigenic. Although the gene that encodes the protein AM854 is not complete, compared to the American isolates, the *A. marginale centrale* genome has a protein annotated as a putative outer membrane protein (OmpA), which has 211 amino acids when compared using BLAST to the sequence of the American isolates (236 aas) presents 79% of identity (167/211) showing considerable conservation. This fact must be taken into account, since immunization with this subspecies of *Anaplasma* is capable of generating protective immune response against *A. marginale* in cattle (PIPANO, 1995).

In conclusion, among the predicted amino acid sequences of the proteins evaluated, OMP1, OMP5, EF-Tu, VirB3, SODb and VirB9-1 had the highest degrees of homology to the isolates used for comparison purposes (including the *A. marginale centrale* isolate) and demonstrated a high degree of conservation. This suggests that these proteins are important to the development of immunogens capable of promoting cross-protection between isolates. Further studies should be carried out in order to gain a better understanding of the real importance of the EF-Tu, VirB3, SODb and VirB9-1.

## REFERENCES

Araújo FR, Costa CM, Ramos CA, Farias TA, Souza II, Melo ES, Elisei C, Rosinha GM, Soares CO, Fragoso SP, Fonseca AH 2008. IgG and IgG2 antibodies from cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* recognize the recombinant vaccine candidate antigens VirB9, VirB10, and elongation factor-Tu. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 186-190.

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.

- Barbet AF, Lundgren A, Jooyoung yi, Rurangirwa FR, Palmer GH 2000. Antigenic variation of *Anaplasma marginale* by expression of MSP2 mosaics. *Infect Immun* 68: 6133–6138.
- Brayton KA, Knowles DP, McGuire TC, Palmer GH 2001. Efficient use of a small genome to generate antigenic diversity in tick-borne ehrlichial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4130-4135.
- Brayton KA, Palmer GH, Lundgren A, Yi J, Barbet AF 2002. Antigenic variation of *Anaplasma marginale* MSP2 occurs by combinatorial gene conversion. *Mol Microbiol* 43: 1151-1159.
- Brayton KA, Meeus PF, Barbet AF, Palmer GH 2003. Simultaneous variation of the immunodominant outer membrane proteins, MSP2 and MSP3, during *Anaplasma marginale* persistence in vivo. *Infect Immun* 71:6627-6632.
- Brayton KA, Kappmeyer LS, Herndon DR, Dark MJ, Tibbals DL, Palmer GH, McGuire TC, Knowles Jr 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, PalmerGH, Brown WC 2006. Genomic and proteomic approaches to vaccine candidate identification for *Anaplasma marginale*. *Expert Rev Vaccines* 5: 95–101.
- Brown WC, Shkap V, Zhu D, McGuire TC, Tuo W, McElwain TF, Palmer GH 1998. CD41 T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infect Immun* 66: 5406-5413.
- Collins NE, Liebenberg J, Villiers EP, Brayton KA, Louw E, Pretorius A, Faber FE, Heerden HV, Josemans A, Kleef MV, Steyn HC, Strijp MFV, Zwegarth E, Jongejan F, Maillard JC, Berthier D, Botha D, Joubert F, Corton CH, Thomson NR, Allsopp MT, Allsopp BA 2005. The genome of the heartwater agent *Ehrlichia ruminantium* contains multiple tandem repeats of actively variable copy number. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 838-843.
- Herndon DR, Palmer GH, Shkap V, Knowles Jr DP, Brayton KA 2010. Complete Genome Sequence of *Anaplasma marginale* ss. *Centrale. J Bacteriol* 192: 379-80.
- Hotopp JCD, 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, White O, Rikihisa Y, Tettelin H 2006. Comparative Genomics of Emerging Human Ehrlichiosis Agents. *PLoS Genet* 2: 208-223.
- Lewin, B 2000. The operon. In B. Lewin (ed.), *Genes VII*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom. p. 275–277.

- 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.
- Lopez JE, Palmer GH, Brayton KA, Dark MJ, Leach SE, Brown WC 2007. Immunogenicity of *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins in a protective outer membrane vaccine. *Infect Immun* 75: 2333-2342.
- Lopez JE, Beare PA, Heinzen RA, Norimine J, Lahmers KK, Palmer GH, Brown WC 2008. High-throughput identification of T-lymphocyte antigens from *Anaplasma marginale* expressed using in vitro transcription and translation. *J Immunol Methods* 332: 129-141.
- Mavromatis K, Doyle CK, Lykidis A, Ivanova N, Francino MP, Chain P, Shin M, Malfatti S, Larimer F, Copeland A, Detter JC, Land M, Richardson PM, Yu XJ, Walker DH, McBride JW, Kyrpides NC 2006. The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. *J Bacteriol* 188: 4015-4023.
- Niu H, Rikihisa Y, Yamaguchi M, Ohashi N 2006. Differential expression of VirB9 and VirB6 during the life cycle of *Anaplasma phagocytophilum* in human leucocytes is associated with differential binding and avoidance of lysosome pathway. *Cell Microbiol* 8: 523-534.
- Noh 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.
- Noh SM, Brayton KA, Brown WC, Norimine J, Munske GR, Davitt CM, Palmer GH 2008. Composition of the Surface Proteome of *Anaplasma marginale* and Its Role in Protective Immunity Induced by Outer Membrane Immunization. *Infect Immun* 76: 2219-2226.
- Ohashi N, Zhi N, Lin Q, Rikihisa Y 2002. Characterization and transcriptional analysis of gene clusters for a type IV secretion machinery in human granulocytic and monocytic ehrlichiosis agents. *Infect Immun* 70: 2128-2138.
- Palmer GH, Brown WC, Rurangirwa FR 2000. Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Microbes Infect* 2: 167-176.
- Palmer GH, Bankhead T, Lukehart SA 2009. Nothing is permanent but change - antigenic variation in persistent bacterial pathogens. *Cell Microbiol* 11: 1697-1705.
- Pipano E 1995. Live vaccines against hemoparasitic diseases in livestock. *Vet Parasitol* 57: 213-231.

Ramos CA, Araújo FR, Osório AL, Madruga CR, Rosinha GM, Soares CO, Elisei C 2007. Transcription of genes of membrane proteins of Brazilian isolates of *Anaplasma marginale*. *Rev Bras Parasitol Vet* 16:152-155.

Sutten EL, Norimine J, Beare PA, Heinzen RA, Lopez JE, Morse K, Brayton KA, Gillespie JJ, Brown WC 2010. *Anaplasma marginale* Type IV Secretion System proteins VirB2, VirB7, VirB11, and VirD4 are immunogenic components of a protective bacterial membrane vaccine. *Infect Immun* 78: 1314 – 1325.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.

Vidotto MC, Venancio EJ, Vidotto O 2008. Cloning, sequencing and antigenic characterization of rVirB9 of *Anaplasma marginale* isolated from Paraná state, Brazil. *Genet Mol Res* 7:460-466.

**Table 1 – Primer sequences used to amplify Brazilian *A. marginale* isolate.**

GENE	PRIMER	SEQUENCE (5' - 3')	AMPLICON SIZE (bp)	REGION
<i>Omp 1</i>	F	AAGGTCTACGGCTTGGTTTACGCTGCGTTGTCTTT	977	1027576 - 1025552
	R	AGTCTGATACCGCACTCAAACCCAAAATAGTCCAG		
<i>Omp 4</i>	F	CAGCATATCATTGAATACAGGAGGAAGTCGCTTAT	1128	1040447 - 1041574
	R	GTGGCTAGCCGCTTTGGAGATGTTACCAG		
<i>Omp 5</i>	F	CTGGTGGTGGAGAGTTTGCCTATG	1112	1041985 - 1043096
	R	AACTCGAGCTTCAGCCCCAGATTG		
<i>Omp 7</i>	F	TCTTTTCTGTTGGGTGCGGTTGTA	1121	1088542 - 1089662
	R	CGCGCCTTGACATCTTCCTC		
<i>Omp 8</i>	F	TTTCTGTTGAGCGCGGTTGTAGTT	1127	1089797 - 1090923
	R	CGCGCTCTGATATTTTCCCTTTCA		
<i>Omp 10</i>	F	TTGCTGCGTTGCGACGGTTTC	1202	1092307 - 1093508
	R	GCGAGATTCAACACCCCAAAAGAG		
<i>Omp 14</i>	F	GCGTTTAGCCTCCTGTT	1207	63058 - 64247
	R	ATCCGAACCTGATTCTTA		
<i>Omp 15</i>	F	GAATTCACGCATATACCTTGGCTCACCGTT	422	900095 - 900516
	R	GAATTCCTATATTGCGTAGCCCGAAGGATGCTGAGA		
<i>Am 097</i>	F	ATGAAAAAGGCTTTCATGGTTT	813	77775 - 78587
	R	CTACCACGTCCCCTTCTG		
<i>Am 197</i>	F	ATGAAAAAGCTTGAGCTTGCTAG	510	166838 - 167347
	R	CTACTTGGGCTTTCTAGGAGCC		
<i>Am 254</i>	F	ATGACAGAAGGGAGAAAGCC	1182	832189 - 833370
	R	CTACTCCAAAATCTCAGTTATGATAC		
<i>Am 854</i>	F	ATGCTGCATCGTTGGTTAGC	711	789000 - 789710
	R	CTATTCAGGCGCGACCAC		
<i>Am 956</i>	F	ATGTGCTATGGTACTCGCATC	1605	876183 - 877787
	R	TCACTTTTCGTAATACTTCGACACA		
<i>Opag1</i>	F	AGTTGCAGAGCATTTTCCTTG	390	1030618 - 1031007
	R	CTAAAAAACCAAAAAAACCGT		
<i>Opag 3</i>	F	TGTGGGTTGCACACACTACC	936	1028730 - 1029665
	R	CTAAAAACCATCACCAAATGC		
<i>Virb 3</i>	F	TCGTCCGGTAGCGTAAAGAC	294	752143 - 752436
	R	CTACATCACATCGTAAGAATT		
<i>SodB</i>	F	TCACACACCCGCGGTTTCAAGCCT	664	752533 - 753196
	R	TCCGCTGCGCAGTTGGTATACAT		

**Table 2** – Percentage of identity between the predicted amino acid sequences in the membrane proteins of the Brazilian *Anaplasma marginale* isolate compared to the American isolates Saint Maries and Florida and *A. (centrale) marginale*.

AMBR Protein	Number of aas	GenBank number AMBR	AMSM	AMFL	AMCE
AM854	236	GU991617	100	100	-
OMP1	329	GU991619	99	99	72
OMP4	404	GU991620	92	92	66
OMP5	380	GU991621	97	94	75
OMP7	381	GU991622	65	72	40
OMP8	399	GU991623	97	92	66
OMP10	420	GU991624	100	98	65
OMP14	404	GU991625	95	94	70
OMP15	147	GU991626	94	#	*
OPAG1	130	GU991627	100	100	*
OPAG3	312	GU991628	95	95	66
EF-Tu	393	GU991618	100	100	97
PepA	518	GU991629	97	97	65
VirB3	98	GU991632	100	100	96
ViB9-1	270	GU991631	97	100	97
SODb	223	GU991630	99	100	89

\* *A. marginale centrale* does not have the complete genes that codify the proteins AM 854, OMP15 and OPAG1 in its genome;

# The OMP15 predicted amino acid sequence of the *A. marginale* Florida isolate (available on GenBank) is incomplete.

```

OMP15_AMBR 1  NTHI PQLTVLLRVRGPF AAF IYPET S CALI S CGTSD I SA SAPDLRAANKLLA- -HSDPTQR
OMP15_AMSM 1  NTHI PQLTVLLRVRGPF AAF IYPET S CALI S CGTSD I SA SAPDLRAANKLLVPPESDPTQR
OMP15_AMFL 1  NTHI PQLTVLLRVRGPF AAF IYPET S CALI S CGTSD I SA SAPDLRAANKLLA- -HSDPTQR

OMP15_AMBR 59  DFLH-FHLAPTS CPA DT PAPHLLTF S AFSITPSLAAPIGCTASNTLGTNYDHPCPFC SRR
OMP15_AMSM 61  GLDCKYFHLAPTS CPA DT PAPHLLTF S AFSITPSLAAPIGCTASNTLGTNYDHPCPFC SRR
OMP15_AMFL 59  DFLH-FHLAP TPLPS-----SHTVPSL-----GTQPNILPSS-----

OMP15_AMBR 110  QP I RKNK GEGLS ILRAT QYRGETEN QGR IL
OMP15_AMSM 121  QP I RKNK GEGLS ILRAT QYRGETEN QGR IL
OMP15_AMFL 91  -----TALC I IQS QYRGETEN-----

```

**Figure 1** – Multiple alignment of the predicted amino acid sequence in OMP15; the sequence is smaller in *A. marginale* florida isolate in comparison to *A. marginale* Saint Maries isolate and *A. marginale* brazilian isolate.

