

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE UMA
PROTEÍNA RECOMBINANTE QUIMÉRICA PARA USO NO
CONTROLE DE TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA (TPB)

Juliana da Silva Gomes

CAMPO GRANDE, MS
2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE UMA PROTEINA
RECOMBINANTE QUIMÉRICA PARA USO NO CONTROLE DE
TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA (TPB)**

**Production and preliminary evaluation of a recombinant chimeric
protein for use in tick fever control**

Juliana da Silva Gomes

Orientador: Prof^a Dra. Grácia Maria Soares Rosinha

Co-orientadores: Prof^a Dra. Lenita Ramires dos Santos

Prof^o Dr. Newton Valério Verbisck

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

CAMPO GRANDE, MS
2015

Certificado de aprovação

JULIANA DA SILVA GOMES

Produção e avaliação preliminar de uma proteína recombinante quimérica para uso no controle de tristeza parasitária bovina (TPB).

Production and preliminary evaluation of a recombinant chimeric protein for use in tick fever control.

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de mestra em Ciência Animal.

Área de concentração: Saúde Animal.

Aprovado(a) em: 26/02/2015

BANCA EXAMINADORA:



Dra. Grácia Maria Soares Rosinha
(EMBRAPA CNPCG) – (Orientadora)



Dra. Carina Elisei de Oliveira
UCDB



Dr. Newton Valério Verbisck
EMBRAPA CNPCG

*À minha família que sempre deram muita
força pra a conclusão desse estudo,
especialmente, ao Meu pai Pedro, Minha
Mãe Tânia, Meu Marido Pablo e
Minha Filha Julia.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo apoio, em especial aos meus pais por sempre possibilitarem o avanço nos estudos, a minha vó Beth pelo apoio e meu marido pelo carinho e compreensão.

À Marina que com muito carinho cuidou da minha filha Julia nesse período.

À minha Orientadora Dra. Grácia Maria Soares Rosinha, pela oportunidade, confiança e ensinamentos.

À minha co-orientadora Dra. Lenita Ramires dos Santos pelos ensinamentos, paciência, dedicação e sempre estar disposta a ajudar.

Ao meu co-orientador Dr Newton Valério Verbisck pelos ensinamentos e disposição em ajudar.

À toda equipe do Laboratório de Engenharia Genética Animal da Embrapa Gado de Corte, principalmente à Goretti e Cleber Galvão, não só pela ajuda técnica, mas pelos ensinamentos, apoio, companheirismo e amizade.

Aos amigos que me acompanharam nesse período de mestrado: Cheyenne Santana, Anna Leticia, Marielen, Renata Bastos, Leticia Umeda, Cristiane Sanches, Simone Sanches e Patricia Melo.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pelo programa de mestrado em Ciência Animal.

À Embrapa Gado de Corte pela possibilidade de realização deste experimento e a CAPES pela bolsa de estudos.

À todos vocês, muito obrigada!

Resumo

GOMES, J.S. Produção e avaliação preliminar de uma proteína recombinante quimérica para uso no controle de Tristeza parasitária bovina (TPB). 2015. 47 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2015.

A tristeza parasitária bovina é uma importante doença causada pela riquetsia *Anaplasma marginale* e pelos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, responsáveis por consideráveis perdas econômicas ao setor agropecuário. Considerando que a vacina comercializada contra os agentes da TPB apresentam muitas desvantagens, foi proposto com este estudo obter uma proteína recombinante quimérica, contendo epítomos com potencial imunogênico, com a finalidade de testá-la posteriormente como candidata a uma nova vacina. Esta proteína recombinante quimérica foi obtida a partir de um gene sintético inserido em um vetor de expressão em organismos procarióticos, contendo porções dos genes *VirB9* e *VirB10* de *A. marginale* e *P0* de *Babesia* sp. A proteína recombinante, denominada VIRB9VIRB10P0, foi produzida com alto grau de pureza e confirmada por avaliação em SDS PAGE e *Western blotting*. Estudos *in silico* mostraram que essa proteína mantém a antigenicidade em sua conformação recombinante. Soros de 25 bovinos naturalmente infectados com *A. marginale* e/ou *Babesia* sp. foram analisados por ELISA indireto para resposta humoral do tipo IgG. Em uma primeira análise, apenas três dos 25 soros dos animais foram capazes de reconhecer a proteína recombinante quimérica VIRB9VIRB10P0. É possível que isso tenha ocorrido porque as porções selecionadas neste estudo foram sintetizadas de modo a conter principalmente epítomos de ligação a MHC classe II, já que estudos sugerem que uma resposta imune capaz de proteger bovinos contra TPB é baseada em uma resposta predominantemente celular. Assim, estudos de resposta imune humoral com uma amostragem maior e análise de resposta celular serão avaliados pela VIRB9VIRB10P0 em imunização de camundongos.

Palavras-chave: *Anaplasma* sp.; *Babesia* sp.; vacina; gene *virB9*; gene *virB10*; gene *P0*

Abstract

GOMES, J.S. Production and preliminar evaluation of a recombinant chimeric protein for use in tick fever control. 2015. 47 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2015.

The tick fever is an important disease caused by the rickettsia *Anaplasma marginale* and the protozoa *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*, causing significant economic losses to the agricultural sector. Taking into account the several disadvantages of the nowadays commercialized vaccine against tick fever agents, this study proposes the production of a recombinant chimeric protein containing potential immunogenic epitopes in order to subsequently test it as a candidate for a new vaccine. This chimeric recombinant protein was then obtained from a synthetic gene containing portions of *VirB9* and *VirB10* genes of *A. marginale* and P0 *Babesia* sp, which were inserted in a prokaryotic expression vector. The recombinant protein, named VIRB9VIRB10PO, was produced at high purity and its identity was confirmed by SDS-PAGE and Western blotting. *In silico* studies showed that this recombinant protein retains its antigenicity. On the other hand, sera from *A. marginale* and / or *Babesia* sp. naturally infected cattle (n=25) were analyzed by ELISA for IgG-type antibody response. Preliminar analysis revealed that only 3 of the 25 sera were able to recognize VIRB9VIRB10PO. This may be explained by the fact that our gene was synthesized to be enriched for MHC class II binding epitopes. In fact, several studies suggest that tick fever immune protection is made predominantly by a cellular-type response. Nevertheless, humoral immune response analysis will be further explored with a higher sampling and cellular responses shall be evaluated by VIRB9VIRB10PO mice immunization.

Keywords: *Anaplasma* sp.; *Babesia* sp.; vaccine; gen virB9; gen virB10; gen P0

Lista de ilustrações

Figura 1 - Modelo esquemático da elaboração do gene quimérico.....	32
Figura 2 - Análise da produção da proteína recombinante quimérica em <i>E. coli</i> pela indução da expressão do gene inserido em plasmídeo (pET28a/VIRB9VIRB10P0)	33
Figura 3 - <i>Western Blotting</i> da proteína recombinante.....	34
Figura 4 - Purificação da proteína recombinante pelo método de cromatografia de afinidade ao níquel.....	35
Figura 5 - Avaliação do reconhecimento da proteína recombinante quimérica (VIRB9VIRB10P0) por anticorpos de animais naturalmente infectados com os agentes da TPB	36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Histórico	2
2.2 Agente etiológico.....	3
2.3 Transmissão.....	4
2.4. Ciclo biológico	4
2.4.1 <i>Babesia</i> sp.....	4
2.4.2 <i>Anaplasma</i> sp.....	5
2.5 Patogenia e sinais clínicos	6
2.6 Epidemiologia.....	6
2.7 Resposta imunológica.....	8
2.8 Controle e profilaxia.....	9
2.9 Diagnóstico e tratamento	10
2.10 Vacinas contra TPB	11
2.11. Proteínas candidatas vacinais contra TPB	11
3. REFERÊNCIAS	13
ARTIGO CIENTÍFICO.....	21
INTRODUÇÃO.....	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
Obtenção do gene quimérico	23
Expressão do gene quimérico em <i>E. coli</i> e produção da proteína	24
Purificação por cromatografia de afinidade.....	24
Análise da produção e purificação da proteína quimérica.....	25
Avaliação da resposta imunológica humoral de bovinos com a proteína recombinante quimérica	25
RESULTADOS	26
Construção quimérica de VIRB9/VIRB10 e P0	26
Indução da expressão do gene em <i>E. coli</i>	26
Purificação da proteína quimérica recombinante	26
Análise da antigenicidade da proteína quimérica VIRB9VIRB10P0.....	26
DISCUSSÃO	27
REFERÊNCIAS	29

INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2014, o Brasil obteve aproximadamente quatro milhões de toneladas de carcaça bovina e, no mesmo ano, exportou carne *in natura* para 65 países, sendo os principais: Rússia, China, Venezuela, Egito, Irã, Chile, Argélia, Líbia, Itália e Líbano (IBGE, 2014). Porém, algumas doenças são responsáveis por prejuízos econômicos na pecuária, como a tristeza parasitária bovina (TPB), responsável por altos índices de mortalidade e morbidade, redução na produção de carne e leite, aborto e baixa fertilidade (SACCO, 2001), contribuindo com perdas significativas na pecuária, causada pelos efeitos de doenças transmitidas por carrapato que podem chegar a 3,24 bilhões de dólares anuais (GRISI *et al.*, 2014).

A TPB é uma doença infecciosa parasitária cujos agentes etiológicos são a riquetsia *Anaplasma marginale* e os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, responsáveis por afetar bovinos, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais (MAHONEY & ROSS, 1972). É transmitida biologicamente, no Brasil, pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, exclusivamente quando se trata de *Babesia* sp. Entretanto, *A. marginale* também pode ser transmitida por fômites e vetores mecânicos (moscas hematófagas) (KESSLER, 2001).

No Brasil, a maioria das regiões é considerada de estabilidade enzoótica, com frequência de animais acometidos superior a 75%. Excetua-se as regiões em que os fatores ecológicos e climáticos não favorecem o desenvolvimento dos transmissores dos agentes da TPB, em que não há transmissão contínua aos animais, e estes então não desenvolvem imunidade adequada quando jovens, caracterizando assim uma região de instabilidade enzoótica (MAHONEY & ROSS, 1972; SOUZA *et al.*, 2000a).

Os sinais clínicos da TPB surgem após o desenvolvimento e a multiplicação do(s) patógeno(s) no animal, comumente com apresentação de febre alta, anemia, icterícia, hemoglobinúria, anorexia, diminuição ou parada da ruminação, prostração, e em infecções por *B. bovis* podem ocorrer sinais neurológicos (SOUZA *et al.*, 2000a; DREHER *et al.*, 2005).

O diagnóstico da TPB pode ser realizado através de um exame clínico, porém desta forma pode ser confundido ou associado a outras doenças (MADRUGA *et al.*, 1986). Assim, só é possível um diagnóstico específico através de exame laboratorial, sendo os mais utilizados os de identificação indireta de anticorpos contra os agentes da TPB, tais como as técnicas de imunofluorescência (IFI) (GUGLIELMONE *et al.*, 1991), congutinação rápida

(TCR) e imunoenzimático (ELISA) (MARANA et al., 2006). Esses testes são mais comumente realizados para levantamentos epidemiológicos da propriedade e/ou região. E os métodos de diagnóstico direto podem ser feitos por confecção de esfregaços sanguíneos (ALMERIA et al., 2001) e reação em cadeia da polimerase (PCR) (FIGUEIROA et al., 1992), auxiliando no correto tratamento dos animais acometidos, principalmente para diferenciação dos casos de anaplasmose e babesiose, já que o tratamento é específico para cada enfermidade (RIET-CORREA et al., 2001).

Em regiões onde os surtos da doença são frequentes, é necessário ter o conhecimento do clima, manejo da propriedade, raça dos animais, intensidade e a frequência do vetor, e principalmente, identificar os animais portadores assintomáticos para que seja, imediatamente, feito o tratamento correto a fim de evitar e minimizar perdas na propriedade (SACCO, 2002).

A vacinação é o método mais eficiente e econômico de prevenção da infecção. Atualmente, existe uma única vacina disponível no mercado para TPB com registro e licenciada pelo Ministério da Agricultura, baseada em microrganismos vivos atenuados derivados de sangue de bovinos infectados, disponível desde o ano de 1990 (ARTECHE, 1992). Porém, este tipo de vacina apresenta inúmeras desvantagens, tais como, risco de reversão da virulência dos patógenos, contaminação com outras doenças bovinas e sensibilização dos animais contra grupos sanguíneos (WRIGHT & RIDDLES, 1989).

Considerando a importância da TPB na bovinocultura faz-se necessário o estudo de novas formulações vacinais que confirmem maior proteção a bovinos e seja de fácil manipulação. Assim, propõe-se com este estudo obter uma proteína recombinante quimérica contendo fragmentos de proteínas com reconhecido potencial imunogênico, sendo elas VIRB9 e VIRB10 de *A. marginale* e P0 de *Babesia* sp. e determinar se nesta conformação, anticorpos são capazes de realizar o reconhecimento da proteína quimérica, como forma de avaliação inicial de um candidato a vacina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

Em 1888, o pesquisador Victor Babes investigou surtos de uma doença que causava hemoglobinúria em bovinos na Romênia, onde descobriu a presença de um microrganismo no

interior de eritrócitos e, como acreditava tratar-se de uma bactéria, denominou-o de *Haematococcus bovis* (BOCK *et al.*, 2004).

Em 1893, Theobald Smith e Fred Kilborne, associaram uma enfermidade ocorrida nos Estados Unidos, chamada de “Febre do Texas”, à hemoglobinúria em bovinos, classificando o agente como um protozoário, denominado de *Pyrosoma bigemina* (BOCK *et al.*, 2004). No mesmo ano, Starcovici comprovou a similaridade do microrganismo de Babes com os estudados por Smith e Kilborne, propondo a denominação *Babesia* para o gênero, e que *H. bovis* passasse a ser *B. bovis* e *P. bigemina* passasse a ser *B. bigemina* (UILENBERG, 2006).

Sir Arnold Theiler na África do Sul, em 1910, reconheceu pontos marginais, em eritrócitos de bovinos doentes, responsáveis por uma doença similar à febre do Texas, denominando o agente como *A. marginale*. Com esta descoberta, determinou-se que babesiose e anaplasmose são doenças distintas que podem infectar o mesmo animal (KOCAN *et al.*, 2010).

2.2 Agente etiológico

A TPB é um complexo de doenças, que no Brasil, os principais agentes etiológicos são *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*. Esses agentes são organismos intraeritrocitários e a enfermidade ocorre devido, principalmente, a uma intensa destruição dos eritrócitos do hospedeiro.

A babesiose é causada por um protozoário do filo Protozoa, subfilo Apicomplexa, da classe Sporozoa, ordem Piroplasmida, gênero *Babesia*. Em esfregaços sanguíneos são encontrados dentro de eritrócitos isolados ou em pares, em ângulo característico e com as extremidades estreitas opostas. São tipicamente piriformes, mas podem se apresentar na forma redonda, alongada ou em forma de charuto (URQUHART *et al.*, 1996).

A anaplasmose é causada pela rickettsia *Anaplasma marginale* pertencente ao super-reino Bactéria, filo Proteobacteria, classe Alphaproteobacteria, ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae (DUMLER *et al.*, 2001). Consiste em um organismo intracelular obrigatório e, em esfregaços sanguíneos, apresentam-se como pequenos “corpúsculos de inclusão” redondos no interior de eritrócitos (URQUHART *et al.*, 1996).

2.3 Transmissão

A transmissão biológica dos agentes da TPB, no Brasil, ocorre exclusivamente pelo carrapato *R. (B.) microplus*. Em outros países foi demonstrada experimentalmente a transmissão biológica de *A. marginale* por várias outras espécies de carrapatos (STILLER & CONAN, 1995). No entanto, a transmissão da anaplasmoose também pode ocorrer por insetos hematófagos e pela via iatrogênica (KESSLER, 2001), e a transmissão congênita pode ocorrer nas duas enfermidades (RIBEIRO *et al.*, 1995; BRACARENSE *et al.*, 2001).

O frequente contato físico dos bovinos, principalmente quando há contato entre mãe e filho, ou então entre animais em período de reprodução, é um importante fator que auxilia na transmissão do vetor infectado (KESSLER, 2001). Em animais que apresentam parasitemia baixa, poucos vetores são necessários para efetiva transmissão dos agentes da TPB, pois o parasita é capaz de compensar esta baixa parasitemia com replicação biológica (ERIKS *et al.*, 1993).

Após a ocorrência de uma infecção aguda de TPB, os animais permanecem com nível eritrocitário indetectáveis na microscopia durante muitos anos (>0,01% células parasitadas), permanecendo como reservatório e fonte de infecção dos patógenos (KIESER *et al.*, 1990), sendo capazes de mantê-los vivos em mudança de estágio de vida e serem capazes de transmitir o microrganismo entre gerações (LABRUNA, 2004).

2.4. Ciclo biológico

2.4.1 *Babesia* sp.

O ciclo biológico, nos bovinos, ocorre inicialmente pelo carrapato *R. (B.) microplus* durante o repasto sanguíneo, onde inocula os esporozoítos de *Babesia* sp, que através da saliva do carrapato minimiza as reações imunológicas do hospedeiro contra o patógeno inoculado (LABRUNA, 2004). Após chegar a corrente sanguínea, os parasitas atingem as hemácias e se transformam em trofozoítos, por um processo de merogonia, dividem-se assexuadamente por fissão binária dando origem aos merozoítos, ocasionando no rompimento da hemácia e invasão de novos eritrócitos (URQUHART *et al.*, 1996; BOCK *et al.*, 2004; UILENBERG, 2006).

O carrapato, durante o hematofagismo, ingere o sangue parasitado contendo os gametócitos, os eritrócitos se rompem no trato gastrointestinal liberando os gametas, onde

ocorrerá a fecundação unindo-se aos pares formando os zigotos. Os zigotos migram para a corrente circulatória, desenvolvendo-se em oocinetos e atingindo células de vários órgãos (URQUHART *et al.*, 1996; BOCK *et al.*, 2004; UILENBERG, 2006).

Quando infecta o ovário, os parasitas invadem os ovócitos, que em seguida continuam a multiplicação nos tecidos das larvas eclodidas. A infecção, quando chega às glândulas salivares, na primeira alimentação das larvas, esses se transformam em esporonitos que se rompem liberando os esporozoítos, que irão infectar um novo hospedeiro (URQUHART *et al.*, 1996; BOCK *et al.*, 2004; UILENBERG, 2006).

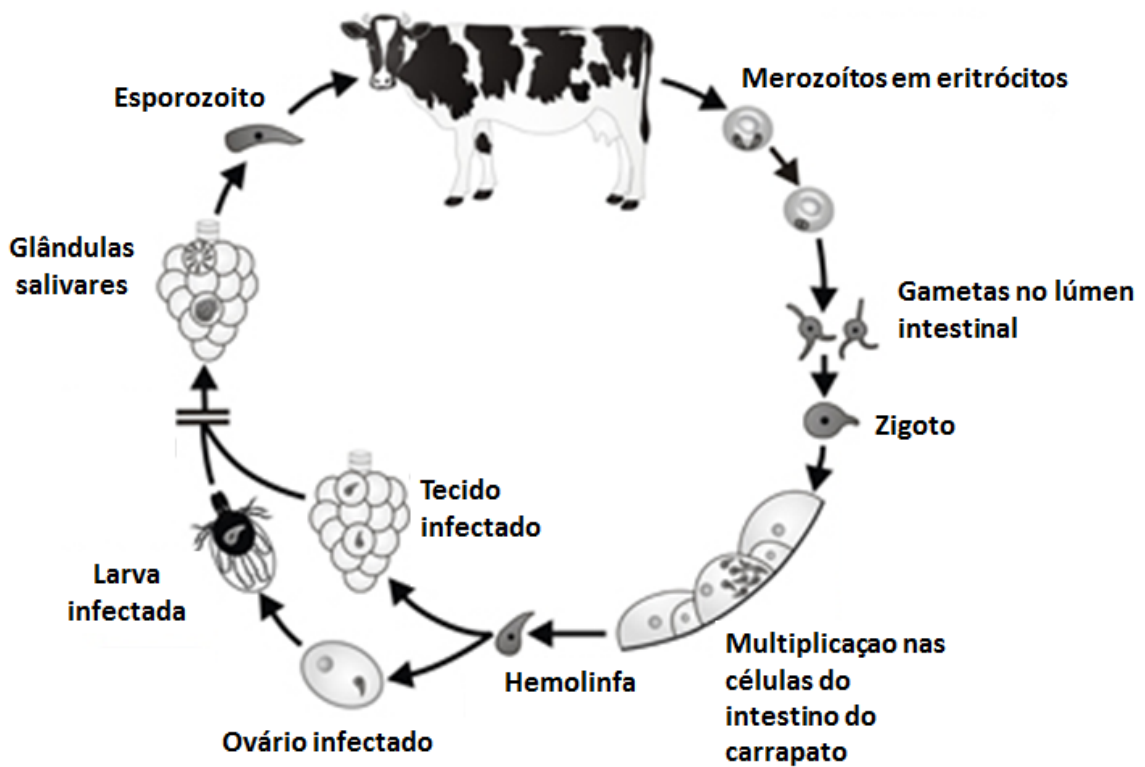


Figura 1. Ciclo biológico da *Babesia* sp. Fonte: Adaptado de <http://pixgood.com/babesia-microti-life-cycle.html>.

2.4.2 *Anaplasma* sp.

Em infecção por *A. marginale*, o patógeno entra no eritrócito, invaginando a membrana celular de modo a formar um vacúolo conhecido como forma reticulada (vegetativa), que se divide por fissão binária formando um corpúsculo de inclusão contendo até oito “corpúsculos iniciais” mantidos juntos, também conhecidos como forma densa (URQUHART *et al.*, 1996; KOCAN *et al.*, 2003)

2.5 Patogenia e sinais clínicos

A intensidade e os sinais clínicos de TPB são dependentes de alguns fatores, como o agente etiológico, quantidade do agente inoculado, e a sensibilidade dos hospedeiros ligados à raça, idade e outros fatores individuais (RIET-CORREA *et al.*, 2001).

Nos animais que apresentam infecção por *Babesia* sp., a multiplicação dos protozoários ocasiona um aumento da fragilidade osmótica, relacionada ao desequilíbrio na produção de citocinas pró inflamatórias e de óxido nítrico (BROWN & PALMER, 1999). Conseqüentemente ocorre a destruição das células, o que resulta em hemoglobinemia, hemoglobinúria e febre nos animais acometidos, podendo envolver cerca de 0,2% a 45% dos eritrócitos (URQUHART *et al.*, 1996).

Geralmente *B. bigemina* parasita hemácias da circulação periférica (MASSARD & FREIRE, 1985), ocasionando uma infecção leve, com apresentação de mucosas pálidas, icterícia, aumento da frequência respiratória e principalmente anemia (BROWN & PALMER, 1999; BOCK, 2004). A infecção por *B. bovis* é menos hemolítica, porém apresenta altas taxas de mortalidade entre bovinos suscetíveis, pois causa modificações na membrana dos eritrócitos e expressão de proteínas de superfície que medeiam a adesão dos eritrócitos nas células endoteliais dos capilares, seguidos de sequestro de hemácias parasitadas e não parasitadas nos capilares de órgãos vitais como o cérebro, causando obstrução vascular, anoxia tecidual e lesões graves como a perda da função dos órgãos. A doença neurológica é de grande importância, pois caracteriza-se por incoordenação motora, ataxia, coma e morte (BROWN & PALMER, 1999; VILORIA & SALCEDO, 2004).

Em animais infectados por *Anaplasma* sp., diferentemente do que ocorre na infecção por *Babesia* sp., a anemia é acarretada por uma resposta autoimune causada pela produção de anticorpos contra a membrana eritrocitária, com destruição tanto de hemácias infectadas quanto não infectadas (KUTTLER, 1984). A infecção por esta riquetsia tem como principais sinais clínicos a anemia, febre, mucosas pálidas e ictéricas, perda de peso rápido, letargia, ocasionalmente são observados hemoglobinúria e em casos severos pode ocorrer a morte do animal (AJAYI *et al.*, 1978; HOFMANN-LEHMANN *et al.*, 2004).

2.6 Epidemiologia

A análise epidemiológica da interação entre carrapatos, bovinos e hemoparasitas pode revelar três situações, que são: áreas livres das doenças transmitidas pelo carrapato e animais totalmente susceptíveis, caso os mesmos sejam expostos ao patógeno; áreas de instabilidade enzoótica (frequência de anticorpos <75%), em que as condições climáticas não são favoráveis ao desenvolvimento do carrapato, porém há ocorrência de infestações temporárias, constituindo o que se costuma chamar de “população de risco”, com elevadas taxas de mortalidade e morbidade; e área de estabilidade enzoótica (frequência de anticorpos >75%) onde as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento do vetor, com a maior parte dos bovinos resistentes à TPB (MAHONEY & ROSS, 1972; ARTECHE *et al.*, 1992).

Na maioria das regiões do Brasil a epidemiologia da tristeza parasitaria bovina é de estabilidade enzoótica (SANTOS *et al.*, 2001; BERTO *et al.*, 2008; GUEDES JUNIOR *et al.*, 2008; FOLLY *et al.*, 2009), exceto em regiões em que os fatores ecológicos e climáticos não favorecem o desenvolvimento dos transmissores dos agentes da TPB (MAHONEY & ROSS, 1972; SOUZA *et al.*, 2000a). O estado da Paraíba é um exemplo de instabilidade enzoótica, pois, em um total de 509 bovinos analisado por imunofluorescência indireta, foram detectados anticorpos contra *A. marginale* e *Babesia* sp. nos valores médios por fazenda de 15% (0-75%) para *A. marginale*, 9,5% (0-40%) para *B. bigemina*, e 26,9% (0-73,7%) para *B. bovis* (COSTA *et al.*, 2011, 2013).

A região Sul do estado do Paraná possui alta prevalência da doença, porém menor quando comparado às regiões Norte e Noroeste do estado, devido à diferença de temperatura e umidade que interferem no desenvolvimento do vetor *R. (B.) microplus* (MARANA *et al.*, 2009), caracterizando a área como sendo de instabilidade enzoótica.

Schild e colaboradores em 2008 analisaram uma região no Rio Grande do Sul considerada livre de vetor do agente da TPB, devido ao clima frio que prejudica o desenvolvimento do carrapato. Foi possível concluir que a introdução acidental de *R. (B.) microplus* de outras regiões, quando em período de clima favorável, pode acarretar a ocorrência de infestação e inoculação dos agentes em animais não imunes, e ocasionar surtos de TPB na região.

Estudos de soroprevalência para *A. marginale* e *B. bovis* na mesorregião Norte Fluminense no Rio de Janeiro, caracterizam esta área como uma área de estabilidade enzoótica, não havendo diferença significativa entre faixa etária, sexo e aptidões zootécnicas entre os animais afetados (SOARES *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2000a). Porém, quando se trata de *B. bigemina*, a soroprevalência encontrada caracteriza esta mesorregião como uma área de instabilidade enzoótica, devido à baixa/moderada infecção dos animais por *B.*

bigemina, o que caracteriza área como sujeita ao desequilíbrio epidemiológico (SOUZA *et al.*, 2000b).

2.7 Resposta Imunológica

A resposta imunológica capaz de proteger bovinos de forma eficaz contra TPB requer componentes de resposta humoral e celular, além das características inatas de cada animal que, individualmente, determinam ou não resistência à infecção. Além disso, deve ser considerado o tipo do agente invasor, pois cada um apresenta suas particularidades (MADRUGA *et al.*, 2001).

A imunidade específica pode ser formada por ocorrência de uma infecção ou por transferência passiva de anticorpos. A resposta imune humoral, induzida com a participação de linfócitos T auxiliares, gera anticorpos que irão neutralizar a infecção dos eritrócitos pelo microrganismo e potencializar a fagocitose (TEIXEIRA *et al.*, 2000). Porém, uma infecção natural, vacinação ou premunicação é necessária para que o animal desenvolva imunidade duradoura (HALL, 1963).

Proteínas presentes na membrana externa de corpúsculos iniciais de *A. marginale* (Major Surface Proteins – MSPs) são responsáveis por induzirem a produção de anticorpos responsáveis pelo controle da riquetsemia aguda e anemia (TEBELE *et al.*, 1991). Entretanto, a resposta imune humoral desencadeada pelos anticorpos, isoladamente, não é capaz de proteger os bovinos contra o patógeno (BROWN *et al.*, 2001). Os monócitos, macrófagos, neutrófilos e as células “Natural Killers”, sendo a primeira linha de defesa celular, são os responsáveis por fazer a fagocitose, produzir citocinas e explosão oxidativa, atuando como fatores de resistência às infecções por diversos parasitos (ALLISON & EUQUI, 1983). Essas células de defesa são ativadas pelos linfócitos T auxiliares (CD4+), e estimuladas por interferon- γ a produzirem IgG2, responsável por auxiliar no processo de neutralização da infecção mediada por anticorpos (ESTES *et al.*, 1994; BROWN *et al.*, 1998; TUO *et al.*, 2000).

Segundo estudos de Pacheco e colaboradores (2004), em média, os bezerros apresentam baixa porcentagem de imunoglobulinas séricas ao nascimento, com 45 dias de vida os bezerros são negativos quanto à presença de anticorpos e, a partir dos 60 dias de idade os níveis de anticorpos séricos começam a aumentar novamente, com produção ativa de anticorpos específicos.

Animais que não são previamente afetados pelos agentes da TPB até a idade de 7 a 9 meses não desenvolvem imunidade duradoura, com isso, ocorre uma maior taxa de letalidade em casos de surtos de carrapatos (COSTA *et al.*, 2013).

2.8 Controle e profilaxia

Para elaborar estratégias de controle e profilaxia devem ser levadas em consideração informações epidemiológicas da propriedade, especialmente a forma de transmissão pelo carrapato (MORZARIA *et al.*, 1992). Os pecuaristas, com intuito de aumentar a produtividade, têm adotado práticas de manejo que contribuem para a proliferação de carrapatos, como a utilização de estábulos e aquisição de animais provenientes, muitas vezes, de áreas endêmicas para TPB.

Para o melhor controle da infecção por *A. marginale* deve manter-se a propriedade livre de moscas hematófagas, principalmente em épocas chuvosas. Resultados insatisfatórios podem ser gerados quando os sistemas de criação são empregados de forma errada na propriedade, quando o uso de produtos carrapaticidas é feito de forma indiscriminada e a falta de padronização dos métodos utilizados na premunicação (GONÇALVES, 2000).

A medida mais apropriada de profilaxia dessa hemoparasitose é a imunização dos animais susceptíveis, principalmente em animais de áreas livres de carrapatos levados para área com carrapato, áreas de instabilidade enzoótica, animais expostos a uma situação de redução temporária da infestação por carrapatos ou com superinfestação de carrapatos (GONÇALVES, 2000; SACCO, 2001).

Em busca de desenvolver imunidade e/ou proteção do rebanho deve ser realizado o controle de vetores, já que o carrapato não deve ser erradicado da propriedade para que os animais sejam parasitados durante todo o ano, permitindo doses infectantes baixas e adequadas (GONÇALVES, 2000). A quimioprofilaxia, que consiste no tratamento dos animais com químicos e subsequente exposição à infestação de carrapatos (KUTTLER e JOHNSON, 1986), é um método dispendioso e seu uso constante pode acarretar em seleção de cepas resistentes (KOCAN *et al.*, 2003).

Outro método é a premunicação, que consiste na inoculação de sangue de animais infectados em animais sensíveis, com isto, estes animais induzirão resposta imune contra a doença. Entretanto, este método possui muitas desvantagens, como o risco de inocular outros agentes infecciosos carregados pelo sangue, induzir auto-imunidade, ou ocasionar uma forte

reação nos animais devido a virulência da cepa ou grande quantidade de microrganismo inoculado (SILVA & LIMA, 1995).

2.9 Diagnóstico e tratamento

Para a realização do diagnóstico, devem ser levados em consideração dados epidemiológicos, sinais clínicos apresentados, exames laboratoriais e, em casos de óbito do animal, devem ser observadas as lesões na necropsia.

O diagnóstico feito por avaliação dos sinais clínicos é relativamente mais simples, porém em alguns casos mais agudos, os sintomas nem sempre são identificados. Por causa disso, o diagnóstico mais específico deve ser realizado, já que os mesmos sintomas podem ser encontrados em outras enfermidades (MADRUGA *et al.*, 1986).

O diagnóstico específico é feito através de exames laboratoriais, sendo os mais utilizados os de identificação indireta de anticorpos contra os agentes da TPB, como a técnica de imunofluorescência (IFI) (GUGLIELMONE *et al.*, 1991), congutinação rápida (TCR) e imunoenzimático (ELISA) (MARANA *et al.*, 2006), comumente realizados para levantamentos epidemiológicos da propriedade e/ou região. Os métodos de diagnóstico direto podem ser feitos por confecção de esfregaços sanguíneos (ALMERIA *et al.*, 2001) e reação em cadeia da polimerase (PCR) (FIGUEIROA *et al.*, 1992), auxiliando na diferenciação dos casos de anaplasmosose e babesiose (RIET-CORREA *et al.*, 2001).

É de grande importância a identificação do agente etiológico da TPB, para se realizar o tratamento adequado, já que este é específico para cada enfermidade. Quando se trata de babesiose o tratamento constitui-se em derivados de diamina e, para anaplasmosose, são empregadas as tetraciclinas. Em casos que não é possível o diagnóstico preciso, o tratamento deve ser realizado com dipropionato de imidocarb, pois possui ação para as duas doenças. Em casos mais graves da doença é importante o tratamento suporte que inclui a soroterapia, protetor hepático e transfusão de sangue, o que torna o tratamento cada vez mais oneroso (SACCO, 2001), e aumenta o risco de resíduos presentes na carne e no leite para consumo, trazendo risco à saúde humana (MAPA, 1999; FEIJÓ *et al.*, 2013).

2.10 Vacinas contra TPB

Uma vacina ideal contra TPB deve ser capaz de induzir imunidade protetora, em nível de evitar a infecção nos bovinos e impedir a transmissão do patógeno pelos carrapatos (KOCAN *et al.*, 2010). Para isso, o animal deve receber antígenos com potencial de estimular uma resposta imunológica duradoura (TIZARD, 2009).

Existem, no Brasil, duas vacinas contra TPB, que são a Eritrovac e a Embravac. Entretanto, apenas a primeira é licenciada e comercializada (ARTECHE, 1992). São vacinas do tipo viva atenuada produzida com *A. centrale*, pois esta possui epítomos reconhecidos por células T CD4+ conservados, que auxiliam na proteção cruzada também contra *A. marginale* (SHKAP *et al.*, 2002). É usada no Brasil, e em vários países, associada com amostras atenuadas de *Babesia* (KESSLER *et al.*, 1991). Mesmo sendo uma vacina eficiente, não impede a infecção concomitante de *A. marginale* (DE LA FUENTE *et al.*, 2002), além da existência do risco de reversão da virulência do patógeno (SHKAP *et al.*, 2008), os animais podem permanecer persistentemente infectados, tornando-os reservatórios assintomáticos do patógeno o que contribui com a propagação da doença (KOCAN *et al.*, 2010).

O uso de vacinas vivas contra anaplasmose teve início em 1900 por Sir Arnold Theiler, realizada com a inoculação de eritrócitos infectados ou com o microrganismo atenuado. Já as vacinas mortas contra *A. marginale* foram comercializadas nos EUA na década de 1960 e retiradas do mercado em 1999. Esse tipo de vacina, mesmo possuindo algumas vantagens, confere baixa proteção em relação às vacinas vivas (KOCAN *et al.*, 2010).

Estudos com isolamento e atenuação de amostras de campo de *B. bigemina* e *B. bovis* estão sendo desenvolvidos (KESSLER *et al.*, 1987a, 1987b; KESSLER *et al.*, 1991). Porém, estas vacinas, sendo elas produzidas por irradiação ou por passagem em hospedeiros não usuais, geralmente não desenvolvem a proteção necessária nos animais vacinados, sendo pouco confiáveis (CARSON *et al.*, 1977; KUTTLER & ZAUGG, 1988; KOCAN *et al.*, 2010).

2.11. Proteínas candidatas vacinais contra TPB

A exploração de novas tecnologias de DNA recombinante conduziu a um novo conceito de imunização, em que epítomos isolados capazes de estimular uma resposta imune específica são selecionados para novas formulações vacinais. Dessa forma, vem sendo criadas

bases de dados a partir de sequenciamentos completos de genoma e análises proteômicas em busca de epítomos de proteínas que induzam produção de INF-gama e induzam IgG2 nos animais contra os agentes da TPB (BROWN et al., 1998; BRAYTON et al., 2005; LOPEZ et al., 2005).

Entre elas, as proteínas VIRB9 e VIRB10 de *A. marginale*, pertencentes ao sistema de secreção do tipo IV (TFSS – type four secretion system), são altamente conservadas e possuem grande capacidade de induzir IgG e estimular linfócitos T CD4⁺ (LOPEZ et al., 2007; MORSE et al., 2011). Foram identificadas como imunogênicas por reagirem com anticorpos de bovinos imunizados com membrana externa de *A. marginale* e IgG2 de bovinos naturalmente infectados (LOPEZ et al., 2005; ARAÚJO et al., 2008). Ademais, VIRB9 e VIRB10 já foram utilizadas em sua conformação recombinante para indução de resposta imune com produção de IFN-gama em camundongos (CASTELÃO et al., 2012).

A proteína P0 de *B. bovis* também foi avaliada quanto a sua conservação e antigenicidade, apresentando alta conservação entre os isolados brasileiro, bem como foi confirmado que anticorpos específicos de isotipo IgG2 de animais naturalmente infectados com *B. bovis* reagem com a proteína recombinante, indicando um direcionamento de resposta imune do tipo TH1 (RAMOS et al., 2009). Soro de animais experimentalmente infectados com *B. bigemina* também foram capazes de reconhecer P0r, o que revelou a possibilidade de uso dessa proteína em vacinação tanto para indução de resposta imune contra *B. bovis* como contra *B. bigemina*.

Considerando a importância de controlar a TPB no Brasil, uma vacina formulada com base em porções de proteínas ricas em epítomos para a construção de uma quimera proteica, capaz de promover proteção contra mais de um microrganismo, é uma ferramenta promissora para estimular resposta imune duradoura, segura e eficaz (ALMAZÁN et al., 2012; MARCHIORO et al. 2014; ZHAO et al. 2015).

3. REFERÊNCIAS

ALLISON, A. C.; EUQUI, E. M. The role of cell-mediated immune responses in resistance to malaria with special reference to oxidant stress. **Annual Review of Immunology**, v.1, p. 361-392, 1983.

ALMERIA, S.; CASTELLÀ, J.; FERRER, D.; ORTUÑO, A.; ESTRADA-PEÑA, A.; GUTIÉRREZ, J.F. Bovine piroplasms in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR - based and light microscopy detection. **Veterinary Parasitology**, v.99, n. 9, p.249-259, 2001.

ARTECHE, C.C.P. Imunoprofilaxia da tristeza parasitária bovina (TPB) no Brasil: uso de cepas atenuadas de *Babesia* spp e de cepa heteróloga da *Anaplasma*. **A Hora Veterinária**, v.11, p.39-42, 1992.

AJAYI, S. A.; WILSON, A. J.; CAMPBELL, R. S. Experimental bovine anaplasmosis: clinico-pathological and nutritional studies. **Research Veterinary Science**, v. 25, n. 1, p. 76-81, 1978.

BABES, V. Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf. **Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des Sciences**, v. 107, p. 692-694, 1888.

BERTO, R. S.; FAUSTINO, M. A. G.; MELO, L. E. H.; ALVES, L. C.; MADRUGA, C. R.; ALMEIDA, M. A. O.; RAMOS, C. A. N.; TENÓRIO, T. G. S.; SILVA, F. F. Frequência de anticorpos IgG anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em bovinos no Município do Paudalho, Zona da Mata do Estado de Pernambuco. **Revista Medicina Veterinária**, v. 2, n. 3, p. 9-12, 2008.

BOCK, R.; JACKSON, L.; DE VOS, A.; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, v. 129, n. 51, p. 247-269, 2004.

BRACARENSE, A. P. F. L.; VIDOTTO, O.; CRUZ, G. D. Transmissão congênita de *Babesia bovis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 4, p. 1-3, 2001.

BRAYTON, K. A.; KAPPMAYER, L. S.; HERNSON, D. R.; DARK, M. J.; TIBBALS, D. L.; PALMER, G. H.; MCGUIRE, T. C.; KNOWLES, 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**, v. 102, n. 3, p. 844-849, 2005.

BROWN, W.C., SHKAP V., ZHU D, MCGUIRE T.C., TUO W., Mc ELWAIN T.F. & PALMER G.H. CD4+ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 11, p. 5406-5413, 1998.

BROWN, W. C. & PALMER, G. H. Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. **Parasitology Today**, v. 15, n. 7, p. 275-281, 1999.

BROWN, W. C.; PALMER, G. H., LEWIN, H. A.; MCGUIRE, T. C. CD4+ T lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* major surface protein 1 (MSP1), a heteromeric complex of MSP1a and MSP1b, preferentially recognize the MSP1a carboxil terminus that is conserved among satrains. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6853-6862, 2001.

CARSON, C. A.; SELLS, D. M.; RISTIC, M. Cell-mediated immune response to virulent and attenuated *Anaplasma marginale* administered to cattle in live and inactivated forms. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 2, p. 173-179, 1977.

COSTA, V. M. M.; RODRIGUES, A. L.; MEDEIROS, J. M. A.; LABRUNA, M. B.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Tristeza parasitária bovina no Sertão da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n.3, p. 239-243, 2011.

COSTA, V. M. M.; RIBEIRO, M. F. B.; DUARTE, A. L. L.; MANGUEIRA, J. M.; PESSOA, A. F. A.; AZEVEDO, S. S.; BARROS, A. T. M.; RIET-CORREA, F.; LABRUNA, M. B. Seroprevalence and risk factors for cattle anaplasmosis, babesiosis, and trypanosomiasis in a Brazilian semiarid region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 207-213, 2013.

DE LA FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; GARCIA-GARCIA, J. C.; RODRIGUEZ, S. D.; GARCIA, M. A.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; FRICHE PASSOS, L. M.; BARBOSA RIBEIRO, M. F.; BLOUIN, E. F.; KOKAN, K. M. Phylogeography of new world isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 3, p. 275–285, 2002.

DREHER, U. M.; HOFMANN-LEHMANN, R.; MELI, M. L.; REGULA, G.; CAGIENARD, A. Y.; STARK, K. D. C.; DOHERR, M. G.; FILLI, F.; HASSIG, M.; BRAUN, U.; KOCAN, K. M.; LUTZ, H. Seroprevalence of anaplasmoses among cattle in Switzerland in 1998 and 2003: No evidence of an emerging disease. **Veterinary Microbiology**. v.107, n. 1/2, p.71-79. 2005.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HE agente' as subjective synonyms 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 qualification of *Anaplasma marginale* in carrier cattle by using a nucleic acid probe. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, n.2, p.279-284, 1989.

ERIKS, I. S.; STILLER, D.; 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.

FEIJÓ, L. D.; FLEURY, M. S.; PORTZ, A. J.; CASTELO BRANCO, R. L.; ROCHA, R. S.; SILVA, A. M. S. Identification and assessment of emerging issues associated with chemical contaminants in dairy products. **Bulletin of the international dairy federation**, n. 465, p. 11 2013.

FIGUEROA, J.V.; CHIEVES, L.P.; JOHNSON, G.S.; BUENING, G.M. Detection of *Babesia bigemina* infected carriers by polymerase chain reaction amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.10, p. 2576-2582, 1992.

FOLLY, M. M.; PEREIRA, M. A. V. C.; EMMOTT, V. P.; VITA, G. F.; MADRUGA, R. Ocorrência de *Babesia* sp. em bezerros mestiços, por meio de testes sorológicos, em Campo dos Goyatacazes, RJ, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 1, p. 44-51, 2009.

GONÇALVES, P. M. Epidemiologia e controle da Tristeza Parasitária Bovina na região sudeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 187-194, 2000.

GRISI, L.; LEITE, C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, 2014.

GUEDES JUNIOR, D. S.; ARAÚJO, F. R.; SILVA, F. J. M.; RANGEL, C. P.; BARBOSA NETO, J. D.; FONSECA, A. H. Frequency of antibodies to *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax* and *Borrelia burgdorferi* in cattle from the Northeastern region of the State of Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 2, p. 105-109, 2008.

GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; AGUIRRE, D. H.; GAIDO, A. B. Vacunas congeladas contra la babesiosis y la anaplasmosis de los bovinos: viabilidad luego de la descongelación. **Revista Cubana de Ciencias Veterinarias**, v. 22, n. 3, p. 233-240, 1991.

HALL, W. T. K. The immunity of calves to tick-transmitted *Babesia argentina* infection. **Australian Veterinary Journal**, v. 39, p. 386-389, 1963.

HOLFMANN-LEHMANN, R.; MELI, M. L.; DREHER, U. M.; GONCZI, E.; DEPLAZES, P.; BRAUN, U.; ENGELS, M.; SCHUPBACH, J.; JORGER, K.; THOMA, R.; GRIOT, C.; STARK, K. D. C.; SCHMIDT, J.; KOCAN, K. M.; LUTZ, H. Concurrent infections with

borne pathogens as etiology of fatal hemolytic anemia in cattle herd from Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n.8, p. 3775-3780, 2004.

IBGE (2014) Disponível em <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em dez de 2014.

KESSLER, R. H.; MADRUGA, C. R.; JESUS, E. F.; SEMPREBOM, D. V. Isolamento de cepas puras de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em área enzoótica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, n. 7, p. 747-752, 1987 a.

KESSLER, R. H.; SACCO, A. M. S.; JESUS, E. F.; MADRUGA, C. R. Desenvolvimento de cepas vivas atenuadas de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*: teste preliminar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22 n. 11/12, p. 1225-1230, 1987 b.

KESSLER, R. H., SASTRE, A.M., MOREIRA, M.A., *et al.* Experiencias con vacunas vivas atenuadas de *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma centrale* conservadas por congelación en Brasil. **Revista Cubana de Ciências Veterinárias**, v. 22, n. 3, p. 189-196, 1991.

KESSLER, R. H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 177-179, 2001.

KIESER, S. T.; ERIKS, I. S.; PALMER, G. H. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. **Infection and Immunity**, v.58, n.4, p.1117-1119, 1990.

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

KOCAN, K. M.; DE LA FLUENTE, 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, 2003.

KREIER, J. P. & RISTIC, M. The biology of hemotrophic bacteria. **Annual Review Microbiology**, v. 35, p. 325-338, 1981.

KUTTLER, K. L. & JOHNSON, L. W. Chemoprophylactic activity of imidocarb, diaminazene and oxytetracycline against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. **Veterinary Parasitology**, v. 21, n. 2, p. 107-118, 1986.

KUTTLER, K. L. & ZAUGG, J. L. Characteristics of an attenuated *Anaplasma marginale* of deer origin as an anaplasmosis vaccine. **Tropical Animal Health and Production**, v. 20, n. 2, p. 85-91, 1988.

LABRUNA, M. B. Carta Acarológica. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 199-202, 2004.

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.

MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária. Campo Grande, Embrapa Gado de Corte, 360p, 2001.

MADRUGA, C. R.; BERNE, M. E. A.; KESSLER, R. H.; GOMES, R. F. C.; LIMA, J. G.; SCHENK, M. A. M. Diagnóstico da tristeza parasitária bovina no 40 Estado de Mato Grosso do Sul: inquérito de opinião. **Circular Técnica, Embrapa-CNPGC**, 40 p., n. 18, 1986.

MAHONEY, D. F. & ROSS, D. R. Epizootiological factors in control of bovine babesiosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, n. 5, p. 292-298, 1972.

MARANA, E. R. M.; ALFIERI, A. A.; ANDRADE, G. M.; FREIRE, R. L.; GARCIA, J. L.; VIDOTTO, O. Comparison of the serologic tests of Indirect Immunofluorescence, Rapid Conflutination, Indirect ELISA and Competition ELISA for detection of antibodies against *Anaplasma marginale* in cattle sera from different enzootic areas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 4, p. 629-638, 2006.

MARANA, E. R. M.; DIAS, J. A.; FREIRE, R. L.; VICENTINI, J. C.; VIDOTTO, M. C.; VIDOTTO, O. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos da região Centro-Sul do

estado do Paraná, Brasil, por teste imunoenzimático competitivo utilizando proteína recombinante MSP5-PR1. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 20-26, 2009.

MASSARD, C. L. & FREIRE, R. B. Etiologia, manifestações e diagnóstico das babesioses bovinas no Brasil. **A hora veterinária**, v. 23, p. 53-56, 1985.

Ministério da Agricultura pecuária e abastecimento, Brasil (1999). **Instrução normativa 42**. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>. Acessado em fev de 2015.

MORZARIA, S.; KATENDE, J.; KAIRO, A.; NENE, V.; MUSOKE, A. New methods for the diagnosis of *Babesia bigemina* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, n. 3, p. 201-205, 1992.

PACHECO, R. C.; VIDOTTO, O.; TAMEKUMI, K.; IGARASHI, M; KAWASAKI, P.; PRUDÊNCIO, L. B.; MARANA, E. R. M.; PEREIRA, A. L. Dinâmica da infecção natural pelo *Anaplasma marginale* em vacas e bezerros da raça Holandesa, na região de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. **Ciências Agrárias**, v. 25, n. 3, p. 235-244, 2004.

RIBEIRO M. F. B., LIMA J. D., GUIMARÃES A. M., SCATAMBURLO M. A.; MARTINS N. E. Transmissão congênita da anaplasmoze bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 47, n.3, p. 297-304, 1995.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. D. C.; LEMOS, R. A. A. Doenças parasitárias In: **Doenças de ruminantes e equinos**. 2ª ed., v. 2, Varela Editora e Livraria LTDA, São Paulo, p. 35-42, 2001.

SACCO, A. M. S. Controle/Profilaxia da Tristeza Parasitária Bovina. **Comunicado Técnico, EMBRAPA-CPPSul**, Bagé, RS, ISSN 0100-8919, 2001.

SACCO, A. M. S. Profilaxia da tristeza parasitária bovina: Por quê, quando e como fazer. **Circular Técnica, EMBRAPA-CPPSul**, Bagé, RS. ISSN 0100-8625, 2002.

SANTOS, H. Q.; LINHARES, G. F.; MADRUGA, C. R. Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em bovinos de leite da microrregião de Goiânia determinada pelos testes de imunofluorescência indireta e elisa. **Ciência Animal Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 133-137, 2001.

SCHILD, A. L.; RUAS, J. L.; FARIAS, N. A.; GRECCO, F. B.; SOARES, M. P. Aspectos epidemiológicos de um surto de babesiose cerebral em bovinos em zona livre de carrapato. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2646-2649, 2008.

SHKAP, V.; MOLAD, T.; BRAYTON, K. A.; BROWN, W. C.; PALMER, G. H. Expression of major surface protein 2 variants with conserved T-cell epitopes in *Anaplasma centrale* vaccinates. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 642-648, 2002.

SHKAP, V.; LEIBOVITZ, B.; KRIGEL, Y.; MOLAD, T.; FISH, L.; MAZUZ, M.; FLEIDEROVITZ, L.; SAVITSKY, I. Concomitant infection of cattle with the vaccine strains *anaplasma marginale centrale* and field strains of *A. marginale*. **Veterinary Microbiology**, v. 130, n. 3-4, p. 277-284, 2008.

SILVA, A. C. & LIMA, J. D. Utilização de inóculo padronizado na premunicação de bovinos contra anaplasmose e babesiose. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.4, n.2, suplemento 1, p.212, 1995.

SMITH, T. e KILBORNE, F. L. Invertigations into the nature, causation and prevention of Southern cattle fever. In **Ninth Annual Report of the Bureau of Animal Industry for the Year 1892**, p. 177-304, 1893.

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.

SOUZA, J. C. P.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; SCOFIELD, A.; FONSECA, A. H. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 97-101, 2000a.

SOUZA, J. C. P.; SOARES, C. O.; SCOFIELD, A.; MADRUGA, C. R.; CUNHA, N. C.; MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Soroprevalência de *Babesia bigemina* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 26-30, 2000b.

STILLER, D & COAN, M. Recent developments in elucidating tick vector relationship for anaplasmosis and equine piroplasmosis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 97-108, 1995.

TEBELE N., MCGUIRE T.C. & PALMER G.H. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 9, p. 3199-3204, 1991.

TEIXEIRA, M. M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GAZZINELLI, T.R.T. Immunoregulation in parasitic infection: insights for therapeutic intervention. **Immunology Today**, v.21, n.11, p. 536-538, 2000.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária**. Elsevier. Cap. 20, p.263-277. 2009

TUO, W.; PALMER, G. H.; MCGUIRE, T. C.; ZHU, D.; BROWN, W. C. Interleukin-12 as an adjuvant promotes immunoglobulin G and type 1 cytokine recall responses to major surface protein 2 of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. **Infection and immunity**, v. 68, n. 1, 2000.

UILENBERG, G. *Babesia* – A historical overview. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 3-10, 2006.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. Protozoologia veterinária In: **Parasitologia Veterinária**. 2ª ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 180-220, 1996.

VILORIA, M. I. V.; SALCEDO, J. H. P. Patofisiologia da infecção por *Babesia bovis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 48-52, 2004.

WRIGHT, I. G. e RIDDLES, P. W. Biotechnology in tick-borne diseases: present status, future perspectives. FAO Expert Consultation of Biotechnology for Livestock Production and Health, 6-10 October 1986, Rome. Plenum Press, New York, p. 325-340, 1989.

ARTIGO CIENTÍFICO

Produção e avaliação preliminar de uma proteína recombinante quimérica para uso no controle de Tristeza parasitária bovina (TPB)

JULIANA S. GOMES¹, GRÁCIA M.S. ROSINHA², LENITA R. SANTOS², EMANUELLE B. GASPAR³, CARLOS A.N. RAMOS⁴, FLÁBIO R. ARAÚJO², MARIA G. SANTOS², NEWTON V. VERBISK²

¹Aluna da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Campo Grande, MS, Brasil.

²Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil

³Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS, Brasil

⁴Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

Periódico: Revista Pesquisa Veterinária Brasileira

ABSTRACT. - GOMES, J. S. 2015. [Production and preliminary evaluation of a recombinant chimeric protein for use in tick fever control] *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor Sanidade Animal, Embrapa Gado de Corte.

The tick fever is an important disease caused by the rickettsia *Anaplasma marginale* and the protozoa *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*, causing significant economic losses to the agricultural sector. Taking into account the several disadvantages of the nowadays commercialized vaccine against tick fever agents, this study proposes the production of a recombinant chimeric protein containing potential immunogenic epitopes in order to subsequently test it as a candidate for a new vaccine. This chimeric recombinant protein was then obtained from a synthetic gene containing portions of *VirB9* and *VirB10* genes of *A. marginale* and P0 *Babesia* sp, which were inserted in a prokaryotic expression vector. The recombinant protein, named VIRB9VIRB10PO, was produced at high purity and its identity was confirmed by SDS-PAGE and Western blotting. *In silico* studies showed that this recombinant protein retains its antigenicity. On the other hand, sera from *A. marginale* and / or *Babesia* sp. naturally infected cattle (n=25) were analyzed by ELISA for IgG-type antibody response. Preliminary analysis revealed that only 3 of the 25 sera were able to recognize VIRB9VIRB10PO. This may be explained by the fact that our gene was synthesized to be enriched for MHC class II binding epitopes. In fact, several studies suggest that tick fever immune protection is made predominantly by a cellular-type response. Nevertheless, humoral immune response analysis will be further explored with a higher sampling and cellular responses shall be evaluated by VIRB9VIRB10PO mice immunization.

INDEX TERMS: *Anaplasma* sp.; *Babesia* sp.; vaccine; gen *VirB9*; gen *VirB10*; gen P0.

RESUMO. - [Produção e avaliação preliminar de uma proteína recombinante quimérica para uso no controle de Tristeza parasitária bovina (TPB)] A tristeza parasitária bovina é uma importante doença causada pela riquetsia *Anaplasma marginale* e pelos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, responsáveis por consideráveis

perdas econômicas ao setor agropecuário. Considerando que a vacina comercializada contra os agentes da TPB apresentam muitas desvantagens, foi proposto com este estudo obter uma proteína recombinante quimérica, contendo epítomos com potencial imunogênico, com a finalidade de testá-la posteriormente como candidata a uma nova vacina. Esta proteína recombinante quimérica foi obtida a partir de um gene sintético inserido em um vetor de expressão em organismos procarióticos, contendo porções dos genes *VirB9* e *VirB10* de *A. marginale* e *P0* de *Babesia* sp. A proteína recombinante, denominada VIRB9VIRB10P0, foi produzida com alto grau de pureza e confirmada por avaliação em SDS PAGE e *Western blotting*. Estudos *in silico* mostraram que essa proteína mantém a antigenicidade em sua conformação recombinante. Soros de 25 bovinos naturalmente infectados com *A. marginale* e/ou *Babesia* sp. foram analisados por ELISA indireto para resposta humoral do tipo IgG. Em uma primeira análise, apenas três dos 25 soros dos animais foram capazes de reconhecer a proteína recombinante quimérica VIRB9VIRB10P0. É possível que isso tenha ocorrido porque as porções selecionadas neste estudo foram sintetizadas de modo a conter principalmente epítomos de ligação a MHC classe II, já que estudos sugerem que uma resposta imune capaz de proteger bovinos contra TPB é baseada em uma resposta predominantemente celular. Assim, estudos de resposta imune humoral com uma amostragem maior e análise de resposta celular serão avaliados pela VIRB9VIRB10P0 em imunização de camundongos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Anaplasma* sp.; *Babesia* sp.; vacina; gene *VirB9*; gene *VirB10*; gene *P0*.

INTRODUÇÃO

A babesiose bovina é causada pelos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e a anaplasmose bovina pela riquetsia *Anaplasma marginale*, formando o complexo tristeza parasitária bovina (TPB). São enfermidades transmitidas por artrópodes hematófagos, cujo principal agente transmissor no Brasil é o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, sendo estes patógenos responsáveis por afetar bovinos, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais (MAHONEY & ROSS 1972).

Os agentes da TPB são microrganismos intraeritrocitários e a enfermidade ocorre devido principalmente, a uma intensa destruição dos eritrócitos do hospedeiro. É de grande importância no Brasil, pois o país exportou carne *in natura* para 65 países no ano de 2014 (IBGE 2014). Altos índices de mortalidade e morbidade, redução na produção de carne e leite, aborto e baixa fertilidade ocasionados por esta enfermidade (SACCO 2001) contribuem com perdas significativas na pecuária que podem chegar a 3,24 bilhões de dólares anuais, relacionado aos efeitos de doenças transmitidas por carrapato (GRISI et al. 2014).

A análise epidemiológica da interação entre carrapatos, bovinos e hemoparasitas pode revelar três situações, que são: áreas livres das doenças, áreas de instabilidade enzoótica e área de estabilidade enzoótica (MAHONEY & ROSS 1972, ARTECHE et al. 1992). Na maioria das regiões do Brasil a epidemiologia da TPB é de estabilidade enzoótica, exceto em regiões em que os fatores ecológicos e climáticos não favorecem o desenvolvimento dos transmissores dos agentes da TPB, não havendo transmissão contínua aos animais, os quais não desenvolvem imunidade adequada quando jovens, caracterizando uma região de instabilidade enzoótica (SOUZA et al. 2000, MAHONEY & ROSS 1972).

A intensidade e os sinais clínicos da TPB são dependentes de alguns fatores, como o agente etiológico, quantidade do agente inoculado, e a sensibilidade dos hospedeiros ligados à raça, idade e outros fatores

individuais (RIET-CORREA et al. 2001). Comumente o animal infectado apresenta febre alta, anemia, icterícia (*Anaplasma* sp.), hemoglobínúria (*Babesia* sp.), anorexia, diminuição ou parada da ruminação, prostração, e sinais neurológicos (*Babesia bovis*) (DREHER et al. 2005, SOUZA et al. 2000).

O tratamento deve ser realizado de forma rápida e adequada com intuito de minimizar perdas na propriedade, principalmente em regiões onde os surtos são frequentes. Entretanto, é de grande importância a identificação do agente etiológico da TPB, já que este é específico para cada enfermidade (SACCO 2001). Para isso, devem ser avaliados dados epidemiológicos, sinais clínicos e lesões, sendo que um diagnóstico específico só é possível através de exame laboratorial (RIET-CORREA et al. 2001).

A vacinação é o método mais eficiente e econômico de prevenção da infecção. Atualmente, existe uma única vacina disponível no mercado para TPB com registro e licenciada pelo Ministério da Agricultura, baseada em microrganismos vivos atenuados (ARTECHE 1992). Porém, as vacinas até hoje produzidas para TPB protegem os animais da doença clínica, mas não de se tornarem persistentemente infectados, contribuindo com a propagação da doença, pois tornam-se reservatórios assintomáticos do patógeno (KOCAN et al. 2010). Outras desvantagens podem ser destacadas quanto à vacina disponível tais como, risco de reversão da virulência dos patógenos, contaminação com outras doenças bovinas e sensibilização dos animais contra grupos sanguíneos (WRIGHT & RIDDLES, 1989).

Considerando a importância da TPB na bovinocultura faz-se necessário o estudo de novas formulações vacinais que confirmam maior proteção a bovinos e seja de fácil manipulação. Assim, propõe-se com este estudo obter uma proteína recombinante quimérica contendo fragmentos de proteínas com reconhecido potencial imunogênicos, sendo elas VIRB9 e VIRB10 de *A. marginale* e P0 de *Babesia* sp. e determinar se, nessa conformação, anticorpos são capazes de realizar o reconhecimento da proteína quimérica, como forma de avaliação inicial de um candidato a vacina.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do gene quimérico

Três proteínas foram selecionadas para este estudo, sendo elas VIRB9 e VIRB10 de *A. marginale* e P0 de *Babesia* sp. Essas proteínas foram previamente analisadas em relação à imunogenicidade e/ou conservação entre os isolados (ARAÚJO et al. 2008, JUNIOR et al. 2010, RAMOS et al. 2009, CASTELÃO et al. 2012). No entanto, para confecção do gene quimérico, apenas porções ricas em epítomos (regiões de ligação a MHC classe II) foram selecionadas após análise de predição usando um servidor *on line* de livre acesso denominado Propred (SINGH & RAGHAVA, 2001; <http://www.imtech.res.in/raghava/propred/>) e também pela análise no *software* Protean – DNASTar. A sequência do DNA quimérico desenhado para conter 1287 pares de bases, capaz de codificar uma proteína quimérica com domínios hidrofílicos e antigênicos como mencionado acima, foi sinteticamente confeccionada pela empresa de biotecnologia Genone *Biotechnologies*. Esta sequência foi inserida no plasmídeo pET28a (Promega). O plasmídeo recombinante contendo a sequência quimérica (pET28a/VIRB9VIRB10P0) foi utilizado para transformar *Escherichia coli* da linhagem TOP10 (quimicamente competente) para obtenção de estoque e para cultivo e purificação de plasmídeo por mini preparação usando o kit de purificação Pure Link conforme recomendações do fabricante (Promega).

Expressão do gene quimérico em *E. coli* e produção da proteína

O plasmídeo recombinante pET28a/VIRB9VIRB10P0 foi utilizado para transformação de *E. coli* da linhagem *Rosetta* (quimicamente competente), apropriada para expressão e produção de proteína recombinante pelo uso deste plasmídeo. Resumidamente, uma alíquota da bactéria, previamente preparada para a transformação química, foi removida do armazenamento a -80 °C e colocada imediatamente no gelo. Após o descongelamento da bactéria competente, um volume de 2 µL do plasmídeo pET28a/VIRB9VIRB10P0 (proveniente de uma mini preparação) foi adicionado ao tubo o qual foi incubado no gelo durante 30 minutos. Em seguida, realizou-se um choque térmico pela incubação a 42°C durante 45 segundos, sem agitação dos tubos. Posteriormente, o tubo da reação de transformação foi mantido no gelo durante 2 minutos seguido da adição de 1 mL de meio de cultura Luria Bertani (LB). Este material foi então incubado por 1 hora em estufa a 37 °C, sob agitação constante de 250 RPM. Ao final, a reação de transformação foi utilizada para o plaqueamento em meio de cultura LB ágar contendo os antibióticos cloranfenicol (15 µg/mL) e canamicina (34 µg/mL). As placas foram incubadas por aproximadamente 16 a 18 horas a 37°C para o crescimento das colônias.

Para expressão do gene quimérico foi realizado cultivo em meio líquido LB com os antibióticos cloranfenicol e canamicina, iniciado pela incubação de um pré-inóculo contendo colônias de *E. coli Rosetta* transformadas durante aproximadamente 18 horas, a 37 °C, sob agitação constante. Posteriormente, a cultura foi reiniciada pelo uso do pré-inóculo (diluído a densidade ótica (D.O.) 0,1. Foi utilizado Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosídeo (IPTG, Invitrogen) para indução da expressão quando a cultura atingiu uma leitura de densidade ótica (D.O.) próximo a 0,6. A indução foi feita com 1mM de IPTG. Para análise da indução foi feita eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de amostras de cultura no momento da indução (0h) e 3 horas após indução (3h). Essas amostras foram centrifugadas a 1200 RPM para obtenção do sedimento bacteriano. O sedimento bacteriano foi então tratado com tampão da amostra para aplicação em gel de poliacrilamida.

Para obtenção da produção da proteína em larga escala foram cultivados cerca de 1,5 litros de cultura de *E. coli* da linhagem *Rosetta* transformada. O sedimento assim obtido foi tratado com tampões contendo agentes denaturantes (uréia 8M e/ou guanidina 6M) e utilizado para purificação.

Purificação por cromatografia de afinidade

A purificação da proteína quimérica recombinante foi realizada por cromatografia de afinidade ao níquel. Essa purificação foi realizada modificando o método de centrifugação para gravitacional (Probond Resin – Invitrogen), seguindo e adaptando as instruções do fabricante.

Para a criação de uma coluna, foi utilizada uma seringa de 5 mL e um pedaço de lã de algodão de vidro comprimido dentro desta, a resina foi transferida para a coluna montada e a passagem dos reagentes foi realizada pela ação da gravidade.

As eluições foram realizadas com solução tampão contendo alta concentração de Imidazol (480 mM).

Todo material eluído após a cromatografia de afinidade foi dialisado contra tampão PBS 1X, para remoção dos agentes denaturantes. A diálise foi realizada a 4 °C, durante 24 horas, com três trocas de tampão a cada 6 horas, em béquer de 2 litros sob agitação constante.

Análise da produção e purificação da proteína quimérica

Todas as análises referentes à produção e purificação da proteína recombinante quimérica foram realizadas em gel de poliácridamida (12%) corado com *Comassie Blue*. A confirmação da expressão do gene e, conseqüentemente, a produção da proteína, foi realizada por *Western Blotting*. Um gel de poliácridamida contendo a proteína quimérica recombinante foi utilizado para realização de transferência para uma membrana de nitrocelulose durante cerca de 2 horas a 100 volts. Anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (diluição 1:3000) foi utilizado para identificação da ligação dos anticorpos específicos à proteína quimérica por conter resíduos de histidina em sua porção N-terminal. Entre cada uma das etapas utilizou-se lavagens com PBS 1X/Tween20, como procedimento padrão em *Western blotting*. Para a revelação foi utilizado 1mg/mL de diaminobenzidina (DAB) dissolvido em água destilada mais 1 μ L/mL de peróxido de hidrogênio na hora de aplicar na membrana.

A quantificação do material purificado foi realizada pelo método de Lowry (Lowry, 1950). Para esta quantificação a quantidade de material obtida foi determinada com base em uma curva padrão de BSA utilizando-se o programa Prisma (GraphPad).

Avaliação da resposta imunológica humoral de bovinos com a proteína recombinante quimérica

A resposta imunológica humoral foi avaliada pela análise da presença de IgG bovino por meio de ELISA indireto. Foi realizada uma padronização do teste específico para a proteína recombinante no qual as concentrações ótimas de antígenos e diluições de soro foram determinadas. Para tanto, foi utilizada a proteína quimérica previamente solubilizada em SDS 2% (LECHTZIER et al. 2002). Para a realização do teste, a preparação proteica foi necessariamente diluída 1:100 para o início da sensibilização. Assim, placas de 96 poços (Costar 3590) foram adsorvidas com a proteína diluída em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6 (100 μ L/poço) e incubadas *overnight*, em câmara úmida a 4°C. Após este período, os poços foram bloqueados com PBS com 0,05% de tween 20 (PBST) com 10% de leite desnatado (Molico), por 1 hora a 37 °C. Um *pool* de todas as amostras de soro de 25 animais positivos e soro de 25 animais negativos para os agentes da TPB foram analisadas em diluições seriadas e incubadas por 1 hora a 37°C. Essas amostras foram previamente analisadas em ELISA indireto específico para cada agente. Para avaliação da interação Ag/Ac, o anticorpo anti-IgG de bovino conjugado a peroxidase (Sigma) foi usado diluído a 1:10.000 em PBST com 1% de leite desnatado e incubadas por 1 hora a 37°C. As reações enzimáticas foram reveladas com 95 μ L /poço de OPD (Sigma-fast OPD) no escuro durante 15 minutos e interrompidas com 50 μ L /poço de H₂SO₄ 3M. As densidades ópticas foram determinadas por espectrometria em leitor de ELISA com filtro de 492 nm.

A realização do ensaio de ELISA individual dos 21 soros de animais positivos e 21 negativos foi desenvolvida como descrito anteriormente. A proteína recombinante quimérica foi adsorvida (1,56 μ g/mL) em uma placa e diluída em tampão carbonato-bicarbonato e o soro analisado foi diluído a 1:100 em PBST com 1% de leite desnatado. A determinação do *cut-off* foi baseada em Frey et al, 1998, pelo uso da seguinte fórmula: $X + SD.f$, no qual f corresponde à um valor pré-determinado estatisticamente para o número de amostras utilizadas ($f = 1,772$).

Análise Estatística

Foi realizada análise estatística para comparação das médias dos valores de densidade óptica para o ELISA indireto pelo uso de teste *t* não pareado, com o auxílio do programa GraphPad Prism®, sendo considerado como estatisticamente significativos valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Construção quimérica de VIRB9/VIRB10 e P0

A sequência gênica quimérica criada para representar porções ricas em epítomos (Figura 1) foi desenhada para conter 321 pares de bases codificadoras de VIRB9, 231 pares de bases codificadoras de VIRB10 e 735 pares de bases codificadoras de P0. Dessa forma, a proteína quimérica foi produzida de modo a conter 429 resíduos de aminoácidos (codificados de 1287 pares de bases). Como demonstrado (figura 2), o gene sintético inserido no plasmídeo de escolha (para expressão em organismos procarióticos) apresenta-se “funcional”, tendo sido corretamente confeccionado, uma vez que a proteína produzida foi confirmada como sendo a proteína desejada. A massa molecular (aproximadamente 47kDa) da proteína produzida a partir deste gene está compatível ao tamanho previsto por análise *in silico*, mostrando que a proteína produzida corresponde à proteína quimérica.

Indução da expressão do gene em *E. coli*

A expressão do gene quimérico pelo uso de IPTG em bactérias *E. coli* da linhagem *Rosetta*, transformadas com pET28a/VIRB9VIRB10P0, foi confirmada pela produção de uma proteína com cerca de 47 kDa. Essa proteína é visualizada na amostra obtida após 3 horas de indução da expressão com IPTG (Figura 02).

Purificação da proteína quimérica recombinante

A proteína quimérica recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade ao níquel por conter resíduos de histidina em sua porção N-terminal (posteriormente confirmado por *Western Blotting* – Figura 03). A recuperação da proteína purificada foi elevada e o material obtido apresentou elevado grau de pureza (Figura 04). O total de proteína obtida foi de aproximadamente 5,6 mg. O volume de proteína purificada foi de 9,6 mL e a concentração obtida nesta preparação foi de 0,6 mg/mL. Como a proteína recombinante manteve-se insolúvel após a remoção dos agentes denaturantes durante a diálise, a quantificação foi realizada apenas após tratamento com NaOH, o qual permitiu sua quantificação sem interferência no teste utilizado (Lowry, 1950).

Análise da antigenicidade da proteína quimérica VIRB9VIRB10P0

Foi realizada a comparação entre as médias dos valores de densidade óptica do ELISA indireto com a proteína recombinante quimérica obtidos para cada um dos soros analisados, no qual foram incluídas amostras negativas e positivas para os agentes da TPB (*A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de amostras negativas e positivas ($p > 0,05$) (Figura 5). No entanto, a resposta para esse antígeno foi positiva para 3 amostras, como determinado pelo *cut-off* (0,274).

Para confirmar a baixa reatividade do teste ELISA foi realizado um ensaio de *Western blotting* utilizando-se as mesmas amostras (*pool* de amostras). Tampouco, houve reconhecimento da proteína quimérica pelo soro de animais naturalmente infectados (dados não mostrados).

DISCUSSÃO

O método de controle atual mais eficiente e econômico contra TPB é a vacinação, porém a única vacina disponível no mercado é baseada em microrganismos vivos atenuados, sendo capazes de proteger os animais da doença clínica, mas não de se tornarem persistentemente infectados. Esse tipo de vacina apresenta algumas desvantagens, dessa forma, uma vacina formulada com base em uma proteína recombinante quimérica é uma ferramenta promissora para estimulação de resposta imune duradoura e segura, fornecendo também uma alternativa para o desenvolvimento de vacinas capazes de promover proteção contra mais de um microrganismo (ZHAO et al. 2015), como pode ocorrer na TPB. Neste trabalho, uma proteína quimérica formada por porções ricas em epítomos de proteínas de *Anaplasma* e *Babesia* foi produzida a partir de um gene sintético.

A obtenção de genes sintéticos por vias comerciais é uma alternativa à obtenção do gene pelo método tradicional de clonagem, embora seja uma alternativa ainda considerada de alto custo. De qualquer forma, por se tratar de um gene quimérico, a realização de clonagem pelos métodos tradicionais seria altamente laboriosa, o que acaba compensando o investimento na aquisição deste produto sintético.

A exploração de novas tecnologias de DNA recombinante conduziu a um novo conceito de imunização, em que epítomos isolados capazes de estimular uma resposta imune específica são selecionados para novas formulações vacinais. Com isso proteínas quiméricas codificadas por genes inteiros ou mesmo por porções de genes tem sido alvo de estudos para vacinas contra diversos microrganismos, tanto para uso em animais como em humanos (PRICE & HOLMES 2014). Suínos imunizados com esse tipo de proteína, codificada por três genes inteiros de *Mycoplasma hyopneumoniae*, desenvolveram resposta imune contra todos os antígenos (MARCHIORO et al. 2014). Outro tipo de construção encontrada pode ser formada por proteínas de diferentes microrganismos com objetivos diversos, como por exemplo a combinação de MSP-1a de *Anaplasma marginale* e BM-95 de carrapato *R. (B.) microplus*, na qual MSP-1a é usada para o ancoramento da BM-95 na superfície de *E. coli* (CANALES et al., 2008). A antigenicidade e os epítomos foram mantidos mesmo na proteína fusionada. Neste mesmo contexto, estudos subsequentes mostraram que o uso desta e de outras construções de proteínas recombinantes quiméricas, contra infestação do carrapato *R. (B.) microplus*, é uma ferramenta promissora, pois obtiveram eficácia acima de 60% (ALMAZÁN et al., 2012).

Diversos estudos mostram que as proteínas VIRB9, VIRB10 e P0 mantém sua antigenicidade em sua conformação recombinante. No entanto, no presente estudo, quando testada a proteína recombinante quimérica, houve pouco reconhecimento desta por anticorpos de bovinos naturalmente infectados com *A. marginale*, *B. bovis* e/ou *B. bigemina*. As porções selecionadas para compor esta proteína quimérica foram sintetizadas de modo a conter principalmente epítomos de ligação a MHC classe II. Dessa forma, o reconhecimento por anticorpos é menos provável de ocorrer, comprovando a possibilidade de escolha correta das porções de cada uma das proteínas. A análise da sequência proteica resultante do gene quimérico, no *software* Protean – DNASTar, mostra que a proteína quimérica tem em sua estrutura determinantes antigênicos em potencial, característica esta determinada pela análise de diferentes parâmetros, a citar: hidrofobicidade, probabilidade de superfície e flexibilidade (JAMESON & WOLFF, 1988). O gráfico analisado por esta ferramenta apresenta múltiplos picos ao longo da sequência quimérica, cada um dos quais pode representar um determinante antigênico. Assim, é possível que uma avaliação da resposta imune celular de animais naturalmente infectados revele com maior clareza o potencial antigênico/imunogênico desta quimera.

É preciso considerar que a resposta imune específica induzida nos animais cujas amostras foram utilizadas neste estudo pode conter uma representatividade muito pequena em relação aos anticorpos específicos capazes de reconhecer estruturas lineares ou conformacionais apresentadas na proteína quimérica, que contem apenas fragmentos de cada uma das proteínas mencionadas. De fato de todas as amostras analisadas, os 3 animais que mantiveram o reconhecimento da proteína quimérica são animais que apresentaram uma resposta forte contra cada um dos patógenos em questão em análises anteriores (dados não mostrados).

As proteínas escolhidas para compor a quimera aqui apresentada correspondem a proteínas previamente avaliadas e com potencial para uso em vacinação. As proteínas VIRB9 e VIRB10 de *A. marginale* são pertencentes ao sistema de secreção do tipo IV (TFSS – type four secretion system), altamente conservadas e possuem grande capacidade de induzir IgG e estimular linfócitos T CD4⁺ (LOPEZ et al., 2007; MORSE et al., 2011). Foram identificadas como imunogênicas por reagirem com anticorpos de bovinos imunizados com membrana externa de *A. marginale* e IgG2 de bovinos naturalmente infectados (LOPEZ et al., 2005; ARAÚJO et al., 2008). Ademais, VIRB9 e VIRB10 já foram utilizadas em sua conformação recombinante para indução de resposta imune com produção de IFN-gama em camundongos (CASTELÃO et al., 2012). As porções de VIRB9 e VIRB10 que compõem a quimera estudada neste trabalho apresentam epítomos previamente avaliados pela capacidade de ligação a moléculas de classe II de bovinos (MORSE et al., 2012). Alguns destes, inclusive, foram identificados como capazes de estimular resposta linfoproliferativa. Assim, estes dados reforçam a possibilidade de que na quimera VIRB9VIRB10P0, epítomos de VIRB9 e VIRB10 sejam apresentados por MHC de classe II bovino favorecendo a indução de uma resposta celular.

A proteína P0 de *B. bovis* foi avaliada previamente quanto a sua conservação e antigenicidade, apresentando alta conservação entre as espécies de *Babesia*, bem como foi confirmado que anticorpos específicos de isotipo IgG2 de animais naturalmente infectados com *B. bovis* reagem com a proteína recombinante, indicando um direcionamento de resposta imune do tipo TH1 (RAMOS et al., 2009; TERKAWI et al., 2007). Soro de animais experimentalmente infectados com *B. bigemina* também foram capazes de reconhecer P0r, o que revelou a possibilidade de uso desta proteína em vacinação tanto para indução de resposta imune contra *B. bovis* como contra *B. bigemina*. Não há dados na literatura que apresentem peptídeos/epítomos para a proteína P0 de *Babesia* sp. Dessa forma, não é possível avaliar ou comparar se a porção de P0 selecionada para este estudo de fato apresenta potencial de ligação a MHC de classe II, como indicado pelas análises aqui realizadas.

Estudos sugerem que uma resposta crucial capaz de proteger os animais desses patógenos é mediada por macrófagos e células NK, através de produção primária de IL-12 e INF-gama. A resposta imune esperada como efetiva no controle da TPB é baseada em uma resposta predominantemente celular do tipo TH1 (BROWN 2012; AGUILAR-DELFIN et al., 2003). Assim, a proteína quimérica VIRB9VIRB10P0 deve ser analisada neste contexto. Estudos de resposta celular e imunização de camundongos estão sendo delineados para responder esta questão. Além disso, esta mesma proteína também será utilizada para estudo após produção *in vivo* mediante injeção de DNA, o que pode favorecer a indução do tipo de resposta esperada como protetora.

REFERÊNCIAS

- Aguilar-Delfin I., Wettstein P.J., Persing D.H. 2003. Resistance to acute babesiosis is associated with Interleukin-12 and gamma interferon mediated responses and requires macrophages and natural killer cells. *Infection and Immunity*, 71:2002-2008.
- Almazán C., Moreno-Cantú O., Moreno-Cid J.A., Galindo R.C., Canales M., Villar M., de la Fuente J. 2012. Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. *Vaccine*, 30:265-272.
- Araújo F.R., Costa C.M., Ramos C.A.N., Farias, T.A., Souza I.I.F., Melo E.S.P., Elisei C., Rosinha G.M.S., Soares C.O., Fragoso S.P. & Fonseca A.H. 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(2):186-190.
- Araújo F.R., Melo V.S.P., Ramos C.A.N., Madruga C.R., Soares C.O., Kessler R.H., Almeida N.F., Araújo G.S., Alves L.C., Júnior R.A.A.T., Fragoso S.P., Arauco P.R.C., Bacanelli G., Oliveira M.B., Santos L.R. 2005. Development of enzyme-linked immunosorbent assays based on recombinant MSP1a and MSP2 of *Anaplasma marginale*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100(7):765-769.
- Arteche C.C.P. 1992. Imunoprofilaxia da tristeza parasitária bovina (TPB) no Brasil: uso de cepas atenuadas de *Babesia* spp e de cepa heteróloga da *Anaplasma*. *A Hora Veterinária*, 11: 39-42.
- Brown W.C. 2012. Adaptive immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation: implication for bacterial persistence. *Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases*, 35(3):241-252.
- Castelão A.B.C., Araújo F.R., Santos L.R., Ramos C.A.N., Elisei C., Rosinha G.M.S., Soares C.O. 2012. Caracterização da imunogenicidade das proteínas recombinantes Virb9, Virb10 e fator termo instável de Elongação de Peptídeos de *Anaplasma marginale* em camundongos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci*, 49(5): 377-385.
- Dreher, U.M., Hofmann-Lehmann R., Meli M.L., Regula G., Cagienard A.Y., Stark K.D.C., Doherr M.G., Filli F., Hassig M., Braun U., Kocan K.M., Lutz H. 2005. Seroprevalence of anaplasmoses among cattle in Switzerland in 1998 and 2003: No evidence of an emerging disease. *Veterinary Microbiology*. 107(1/2):71-79.
- Grisi L., Leite C., Martins J.R.S., Barros A.T.M., Andreotti R., Cançado P.H.D., León A.A.P., Pereira J.B., Villela H.S. 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 23(2):150-156.
- IBGE (2014) Disponível em <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em dez de 2014.

- Jameson B.A. & Wolf H. 1988. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Computer Application in the Biosciences*, 4(1): 181-6.
- Junior D.S.G., Araújo F.R., Junior N.F.A., Adi S.S., Cheung L.M., Fragoso S.P., Ramos C.A.N., Oliveira R.H.M., Santos C.S., Bacanelli G., Soares C.O., Rosinha G.M.S. & Fonseca A.H. 2010. Analysis of membrane protein genes in a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 105(7):843-849.
- Kocan, K.M., Fuente J., Blouin E.F., Coetzee J.F., Ewing S.A. 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, 167(2-4):95-107.
- Lechtzier V., Hutoran M., Levy T., Kotler M., Brenner T., Steinitz M. 2002. Sodium dodecyl sulphate-treated proteins as ligands in ELISA. *Journal of Immunological Methods*, 270(1):19-26.
- Lopez J.E., Siems W.F., Palmer G.H., Brayton K.A., McGuire T.C., Norimine J., Brown W.C. 2005. Identification of novel antigenic proteins in a complex *Anaplasma marginale* outer membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping. *Infect Immun*. 73:8109-18.
- Lopez J.E., Palmer G.H., Brayton K.A., Dark M.J., Leach S.E., Brown W.C. 2007. Immunogenicity of *Anaplasma marginale* Type IV Secretion System Proteins in a Protective Outer Membrane Vaccine. *American Society for Microbiology*, 75(5):2999-2342.
- Mahoney D.F. & Ross D.R. 1972. Epizootiological factors in control of bovine babesiosis. *Australian Veterinary Journal*, 48(5):292-298.
- Marchioro S.B., Fish A., Gomes C.K., Jorge S., Galli V., Haesebrouck F., Maes D., Dellagostin O., Conceição F.R. 2014. Local and systemic immune responses induced by a recombinant chimeric protein containing *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens fused to the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin LTB. *173(1-2):166-171*.
- Morse K., Norimine J., Palmer G.H., Suttan E.L., Baszler T.V., Brown W.C. 2011. Association and evidence for linked recognition of type IV secretion system protein VirB9-1, VirB9-2, and VirB10 in *Anaplasma marginale*. *Infect Immun*, 80(1):215-227.
- Morse k., Norimine J., Hope J. C., Brown W. 2012. Breadth of the CD4+ T cell response to *Anaplasma marginale* VirB9-1, VirB9-2 and VirB10 and MHC class II DR and DQ restriction elements. *Immunogenetics*, 64:507-523.
- Price G.A. & Holmes R.K. 2014. Immunizing adult female mice with a TcpA-A2-CTB Chimera provides a high level of protection for their pups in the infant mouse model of Cholera. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(12):3356.
- Ramos C.A.N., Araújo F.R., Souza I.I.F., Oliveira R.H.M., Elisei C., Soares C.O., Sacco A.M.S., Rosinha G.M.S. & Alves L.C. 2009. Molecular and antigenic characterisation of ribosomal phosphoprotein P0 from *Babesia bovis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104(7):998-1002.

Riet-Correa F., Schild A.L., Mendez M.D.C., Lemos R.A.A. 2001. Doenças parasitárias In: Doenças de ruminantes e equinos. 2ª ed., Varela Editora e Livraria LTDA, São Paulo, 2:35-42.

Sacco A.M.S. 2001. Controle/Profilaxia da Tristeza Parasitária Bovina. Comunicado Técnico, EMBRAPA-CPPSul, Bagé, RS, ISSN 0100-8919.

Singh H e Raqhava G.P. 2001. ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics*, 17(12):1236-7

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

Terkawi M.A., Jia H., Gabriel A., Goo Y.K., Nishikawa Y., Yokoyama N., Igarashi I., Fujisaki K., Xuan X. 2007. A shared antigen among *Babesia* species: ribosomal phosphoprotein P0 as a universal babesial vaccine candidate. *Parasitology research*, 102:35-40.

Wright I.G. & Riddles P.W. 1989. Biotechnology in tick-borne diseases: present status, future perspectives. *FAO Expert Consultation of Biotechnology for Livestock Production and Health*, 325-340.

Zhao H., Li H.Y., Deng Y.Q., Zhu S.Y., Li X.F., Yang H.Q., Li Y.X., Zhang Y., Qin E.D., Chen R., Qin C.F. 2015. Novel recombinant chimeric virus-like particle is immunogenic and protective against both enterovirus 71 and coxsackievirus A16 in mice. *Scientific reports*, 5:7878.

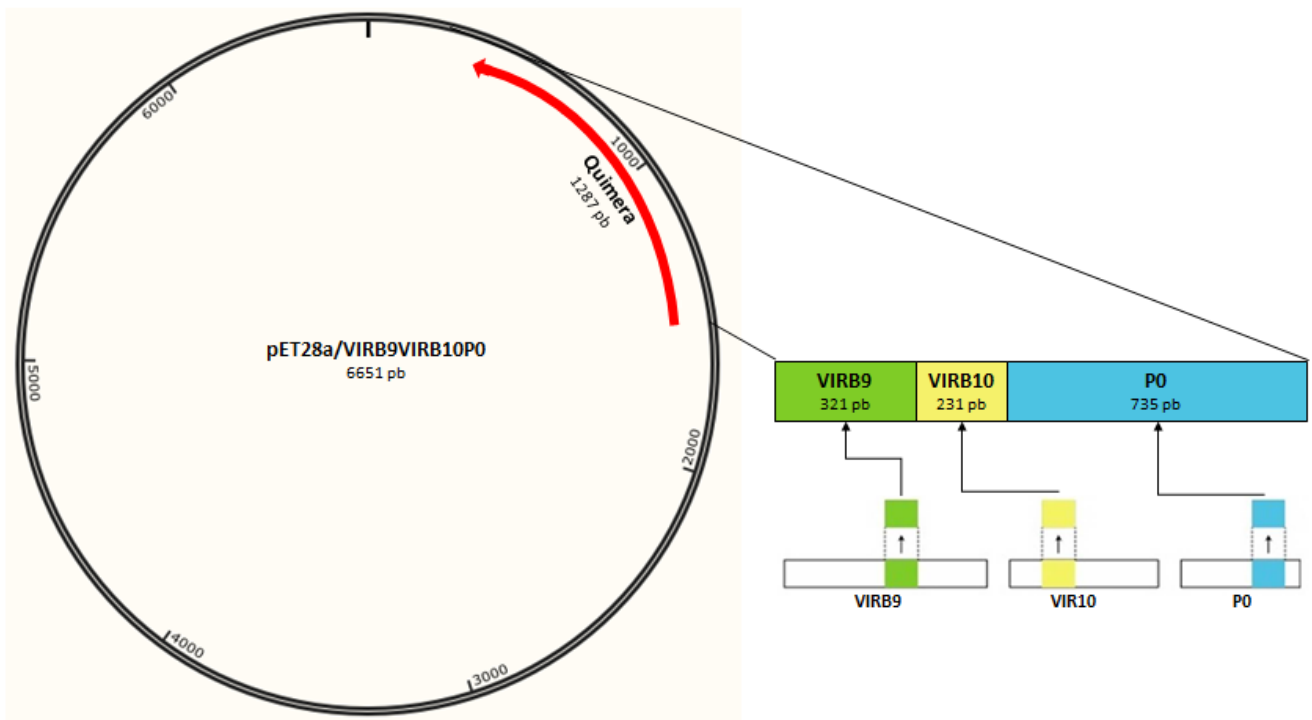


Figura 1. Modelo esquemático da elaboração do gene quimérico. A sequência completa de DNA de cada um dos genes escolhidos (*virb9*, *virb10* e *p0*) foi analisada. Uma pequena região de cada um dos genes foi selecionada para confecção do gene quimérico, o qual foi inserido em vetor de expressão em célula procariótica (pET28a - Promega).

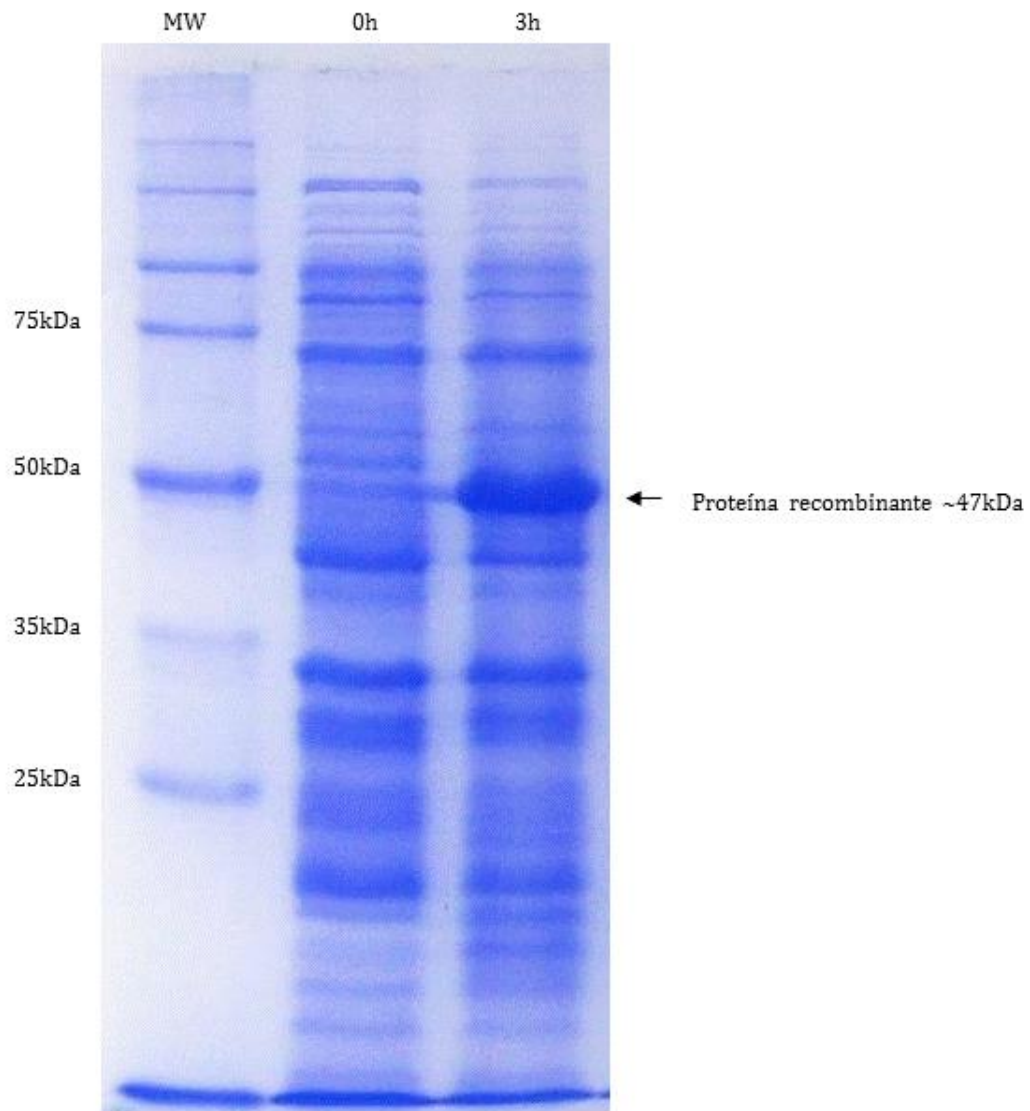


Figura 02. Análise da produção da proteína recombinante quimérica em *E. coli* pela indução da expressão do gene inserido em plasmídeo pET28a/VIRB9VIRB10P0. Gel de poliacrilamida 12% corado com *Comassie Blue*. Raia 1 – marcador de peso molecular; Raia 2 – lisado total de *E. coli* transformada com pET28a/VIRB9VIRB10P0 coletado exatamente no momento da indução; Raia 3 – lisado total de *E. coli* transformada com pET28a/VIRB9VIRB10P0 3 horas após a indução.

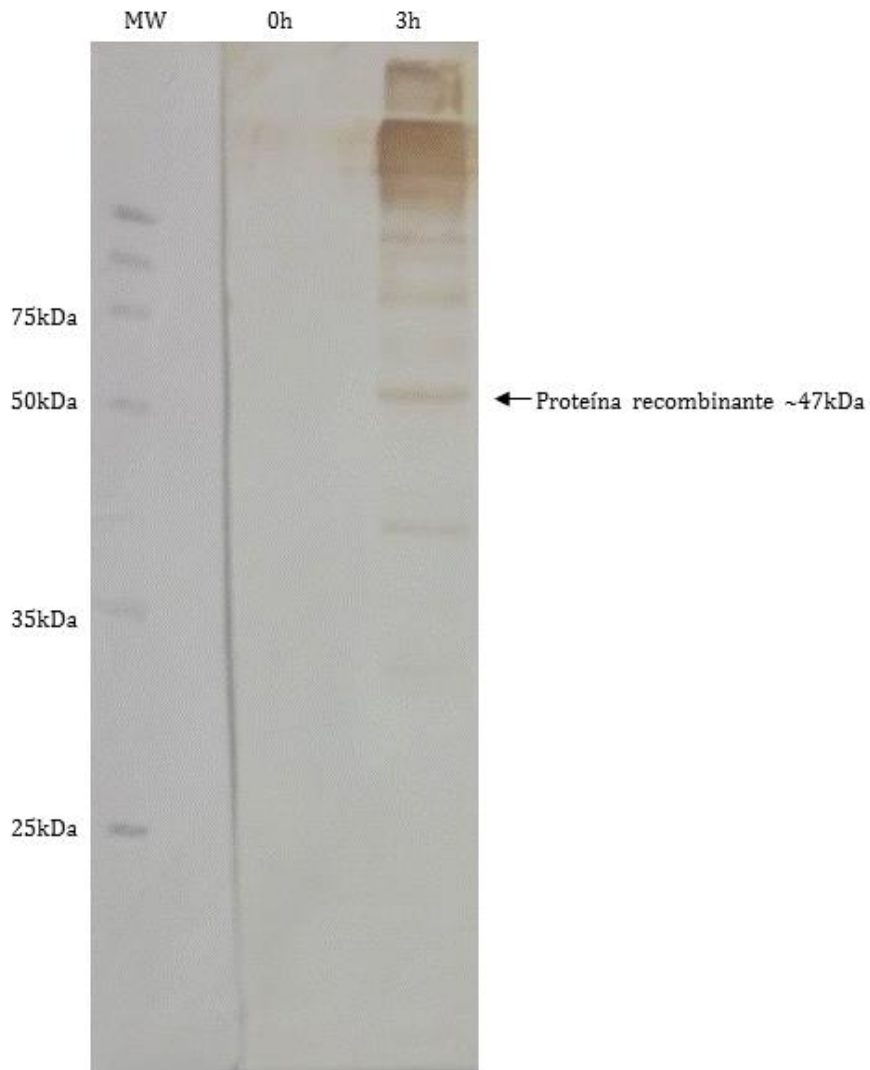


Figura 3 – *Western Blotting* da proteína recombinante com anticorpo anti-histidina. Raia 1-Marcador de peso molecular; Raia 2- lisado total de *E. coli* transformada com pET28a/VIRB9-VIRB10-P0 coletado exatamente no momento da indução; Raia 3 – lisado total de *E. coli* transformada com pET28a/VIRB9-VIRB10-P0 3 horas após a indução.

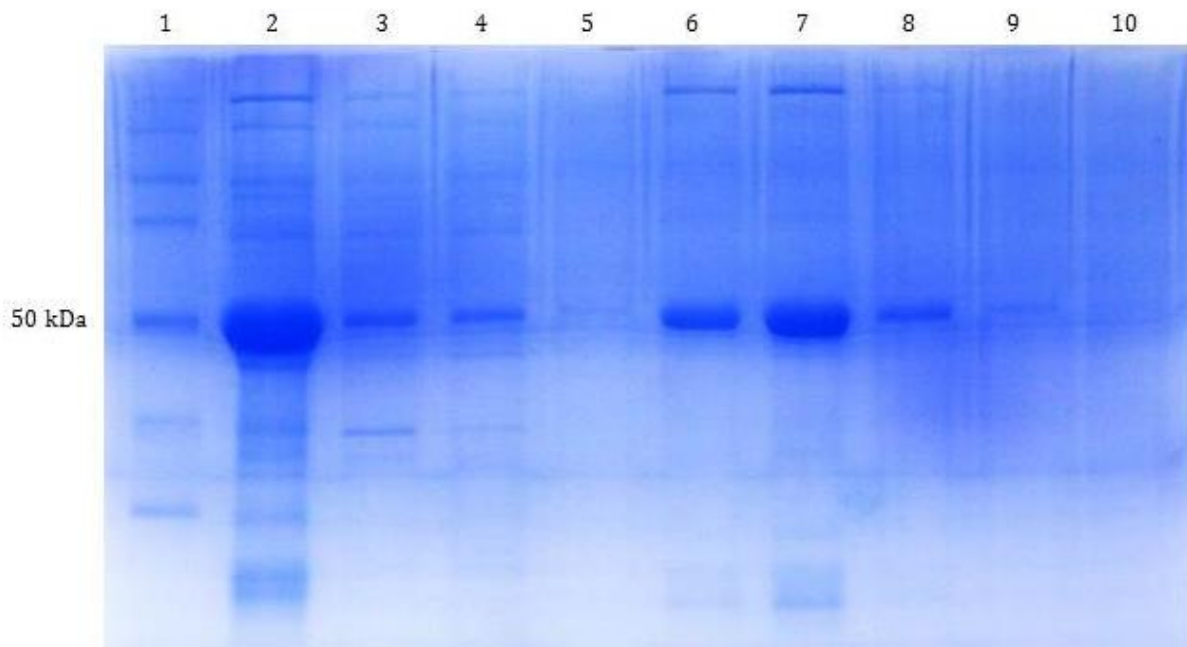


Figura 4 – Purificação da proteína recombinante pelo método de cromatografia de afinidade ao níquel. Raia 1 – marcador de peso molecular (Promega); Raia 2 – lisado total obtido 3 horas após a indução com IPTG (amostra utilizada para purificação); Raia 3- efluente; Raia 4- 1° lavagem da coluna com 60 mM de imidazol , Raia 5- 2° lavagem da coluna com 60 mM de imidazol, Raia 6 – 1° eluição com tampão contendo 480mM de Imidazol; Raia 7 – 2° eluição com tampão contendo 480mM de Imidazol; Raia 8 – 3° eluição com tampão contendo 480mM de Imidazol; Raia 9 – 4° eluição com tampão contendo 480mM de Imidazol; Raia 10 – 5° eluição com tampão contendo 480mM de Imidazol.

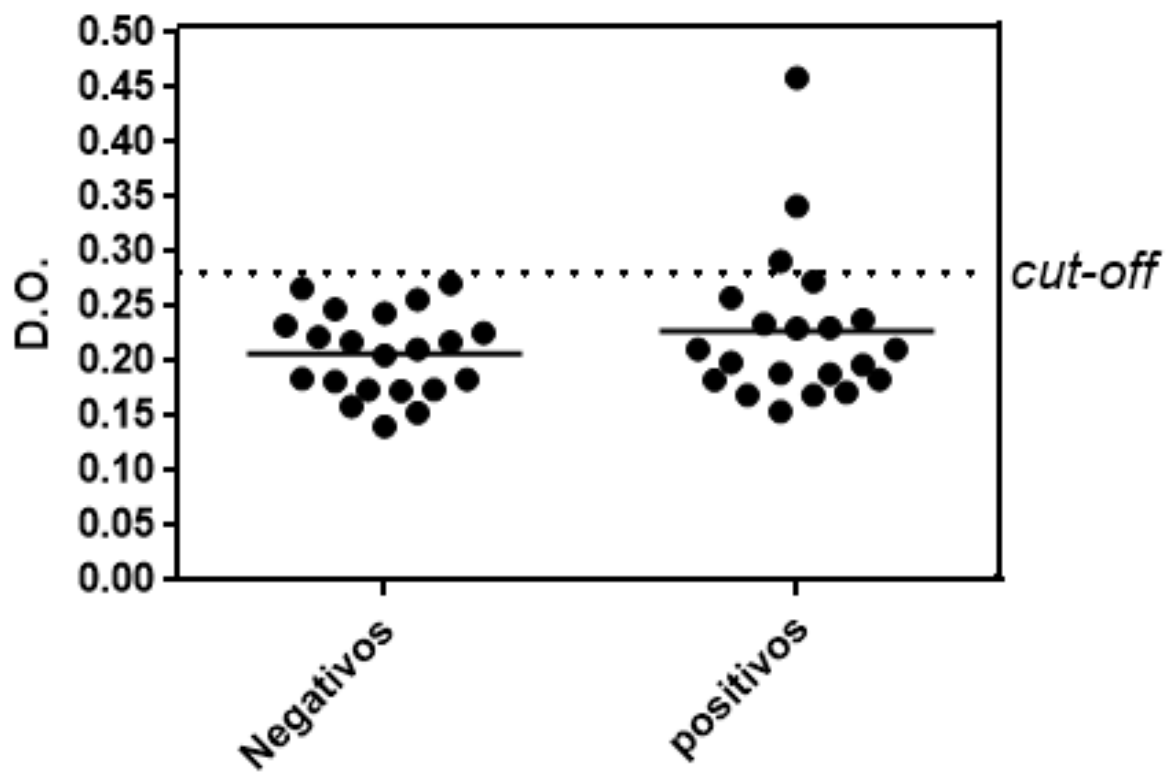


Figura 5 – Avaliação do reconhecimento da proteína recombinante quimérica por anticorpos de animais naturalmente infectados com o agente da TPB com a proteína recombinante quimérica VIRB9VIRB10P0. Soros de 21 bovinos naturalmente infectados e 21 bovinos não infectados foram selecionados e avaliados, em duplicata, em placas de 96 poços pré-sensibilizados com 100 μ L da proteína recombinante quimérica (1,56 μ g/mL) e as densidades ópticas foram determinadas por espectrometria em leitor de ELISA com filtro de 492 nm.