

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Relatório de Estágio

**Isolamento e propagação de *Anaplasma marginale* em
culturas de células embrionárias de carraças**

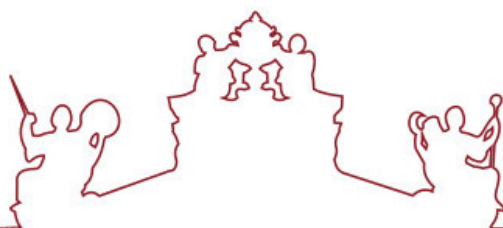
Patrícia Paulino Valentim

Orientador(es) | Adivaldo Henrique da Fonseca

Ludovina Neto Padre

Évora 2020





Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

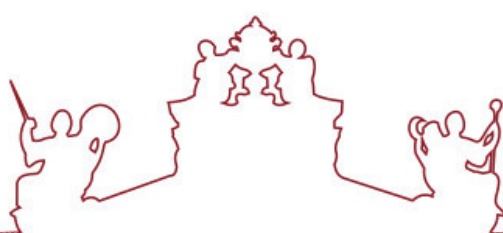
Relatório de Estágio

**Isolamento e propagação de *Anaplasma marginale* em
culturas de células embrionárias de carraças**

Patrícia Paulino Valentim

Orientador(es) | Adivaldo Henrique da Fonseca
Ludovina Neto Padre

Évora 2020



O relatório de estágio foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

- Presidente | Rita Payan Carreira (Universidade de Évora)
- Vogal | Sara Zuquete (Universidade de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária)
- Vogal-orientador | Ludovina Neto Padre (Universidade de Évora)

Em memória da minha avó Fernand

Agradecimentos

À Professora Ludovina Padre, pelo apoio e incentivo na realização deste estágio no Brasil e por toda a sua ajuda na elaboração deste trabalho.

Ao Professor Adivaldo Fonseca por todo o apoio no Brasil, pelo carinho paternal, integração, por me fazer sentir em casa e me ter recebido tão bem.

A toda a equipa do LDP, por me terem recebido de forma tão carinhosa e especial, pelas palavras acolhedoras, pelo carinho e amizade ao longo dos meses de estágio.

Às minhas amigas Isabela e Michele, por terem sido o meu maior apoio do outro lado do oceano, pelas conversas, carinho e amizade e por me mostrarem que os amigos são importantes em qualquer lugar do mundo.

À minha mãe, por me ter incentivado em aventurar-me no Brasil e por todo o apoio, palavras de força e amor incondicional ao longo de todos estes anos e por mais uma vez me mostrar que é a pessoa mais importante da minha vida.

À minha irmã, por ser a minha melhor amiga e por me dar força e incentivo sempre que preciso e por ter o dom de saber dizer as palavras certas nos momentos certos.

Ao meu pai, por todas as palavras de força e por acreditar sempre no meu potencial e por me incentivar para lutar sempre pelos meus sonhos.

Às minhas amigas de sempre, por me apoiarem em todas as fases, por me darem força e motivação, pelos conselhos para escrever este trabalho, por me ouvirem e partilharem tudo comigo, por me mostrarem que a nossa amizade supera todas as distâncias.

À Mafalda, por todas as palavras de incentivo, força e motivação e por me mostrar que a distância, além de não ter impacto na nossa amizade, consegue fortalecê-la ainda mais.

À Cristina e à Inês, por serem as minhas melhores amigas de universidade e da vida, por partilharem comigo os melhores momentos destes anos, pela amizade além fronteiras e por saberem sempre quais as palavras certas para me dizer.

Resumo

A anaplasmoze bovina é uma das hemoparasitoses mais importantes do mundo cujo agente é transmitido por ixodídeos. O agente etiológico desta doença é a bactéria *Anaplasma marginale*.

Nesta investigação desenvolveram-se duas metodologias para o isolamento, cultura e propagação de *A. marginale* em culturas de células embrionárias de carraças, vetores da bactéria: a partir de sangue e a partir de carraças recolhidas de bovinos experimentalmente infetados por *A. marginale*.

As células embrionárias de ixodídeos constituem uma importante ferramenta no estudo do ciclo biológico da bactéria, da interação entre agente patogénico e o vetor, fornecem material antigénico e reduzem a necessidade de utilização de animais de experimentação.

Palavras-chave: carraças; *A. marginale*; diagnóstico; células embrionárias de carraças; bovinos

Abstract

Isolation and propagation of *Anaplasma marginale* in embryonic tick cells

Bovine anaplasmosis it's one of the most important diseases in the world whose agent it's transmited by ticks. The etiologic agent of this disease it's the bacteria *Anaplasma marginale*.

In this investigation it was develop the isolation, culture and propagation of *A. marginale* in embrionary cells cultures of ticks, vetors of the bacteria. It was done two different: one from blood and other from ticks, from calfs who were experimental infected by *A. marginale*.

Embrionary cells of ticks are a important tool for the study of the biological cycle of the bacteria, for the interaction between the agent and the vector, for antigenic material and also decrease the use of animals in studies.

Key words: Ticks; *A. marginale*; diagnostic; embrionary cells of ticks; calfs

Índice Geral

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	II
Índice Geral	III
Índice de Tabelas	VI
Índice de Figuras	VII
Lista de Abreviaturas	IX
1. Introdução	1
1.1. <i>Anaplasma marginale</i>	1
1.1.1. Epidemiologia	2
1.1.2. História e classificação	2
1.1.3. Patogenia	4
1.1.4. Transmissão	8
1.1.5. Ciclo de vida	9
1.1.6. Proteínas maioritárias de superfície	11
1.1.7. Resposta imune contra <i>A. marginale</i>	13
1.1.8. Estirpes	14
1.1.9. Diagnóstico	16
1.1.9.1. Diagnóstico clínico	16
1.1.9.2. Diagnóstico laboratorial	17
1.1.9.2.1. Métodos diretos de diagnóstico	17
1.1.9.2.2. Métodos indiretos de diagnóstico	18
1.1.10. Medidas de controlo	19
1.1.10.1. Controlo dos vetores	19
1.1.10.2. Administração de antibióticos	20
1.1.10.3. Vacinação	21
1.1.10.3.1. Vacinas vivas	21
1.1.10.3.2. Vacinas inativas ou mortas	22
1.1.10.3.3. Desenvolvimento de vacinas através de culturas de células	22

1.2. Culturas de células embrionárias de carraças	23
1.2.1. Isolamento de <i>A. marginale</i>	24
1.2.1.1. Meios de cultura para as células de carraças	26
1.2.2. Linhagens de células de carraças disponíveis na atualidade	27
1.2.3. Vantagens das culturas de células de carraças	28
2. Materiais e Métodos	30
2.1. Isolamento a partir de amostras de sangue	32
2.1.1. Técnicas de isolamento de <i>A. marginale</i>	33
2.1.1.1. Cultura em células IDE8 a partir da técnica de lise de eritrócitos	33
2.1.1.2. Cultura em células IDE8 a partir da técnica das células brancas	33
2.1.1.3. Cultura em células IDE8 a partir da técnica utilizando Histopaque®	33
2.1.2. Monotorização das culturas infetadas	34
2.1.3. Extração de DNA e amplificação por PCR	35
2.2. Isolamento e propagação a partir de carraças	37
2.2.1. Lavagem das carraças	38
2.2.2. Macerado das carraças e isolamento em frascos de cultura com células IDE8	38
2.2.3. Monotorização das culturas de macerado	38
2.2.4. Extração de DNA e amplificação por PCR	39
3. Resultados	40
3.1. Isolamento e propagação a partir de amostras de sangue	40
3.1.1. Cultura em células IDE8 a partir da técnica de lise de eritrócitos	40
3.1.2. Cultura em células IDE8 a partir da técnica das células brancas	40
3.1.3. Cultura em células IDE8 a partir da técnica utilizando Histopaque®	41
3.1.4. Resultados da amplificação do DNA extraído às culturas por PCR	43
3.1.4.1. Resultados do PCR da cultura obtida pela técnica da lise de eritrócitos	43
3.1.4.2. Resultados do PCR da cultura obtida pela técnica com Histopaque®	44
3.2. Isolamento e propagação a partir de carraças	45
3.2.1. Resultados da amplificação do DNA extraído às culturas por PCR	47
4. Discussão	49
4.1. Isolamento e propagação a partir de amostras de sangue	49
4.2. Isolamento e propagação a partir de carraças	51

5. Conclusão	52
6. Bibliografia	53

Índice de Tabelas

Tabela 1: Distribuição geográfica e sero-prevalência da anaplasrose bovina em países da América (adaptado de Kocan *et al.*, 2003)

Tabela 2: Classificação atual da ordem Rickettsiales (adaptado de Kocan *et al.*, 2004)

Tabela 3: Espécies de carrças que transmitem *A. marginale* (adaptado de Lis, 2014)

Tabela 4: Formulação dos meios de cultura Leibovitz's L15 e L15B para 100 mL

Tabela 5: Linhagens de células de carrças atualmente disponíveis no Biobanco de Células de Carrças (Adaptado de Bell-Sakyi *et al.*, 2018)

Tabela 6: Linhagem de células de carrças utilizadas no estudo

Tabela 7: Volume dos reagentes para as reações PCR

Índice de Figuras

Figura 1: Eritrócitos de bovinos infetados com *A. marginale* (Kocan *et al.*, 2003)

Figura 2: Ciclos de bacteriemia de *A. marginale*. As variantes que surgem em três ciclos estão designados na figura como V1, V2 e V3. Os pontos em que a variante surge e é controlada estão designados por V2 (Palmer *et al.*, 1999)

Figura 3: Colónias de *A. marginale* em tecidos de machos *Dermacentor variabilis*. **A)** Colónias de *A. marginale* (setas) no músculo do intestino **B)** Colónias de *A. marginale* (setas) nos tubos de Malpighi (Adaptado de Kocan *et al.*, 2009b)

Figura 4: Colónias de *A. marginale* (setas) nas glândulas salivares de *Dermacentor reticulatis* (adaptado de Zivkovic *et al.*, 2007)

Figura 5: Colónias de *A. marginale* no intestino de machos *Dermacentor variabilis*. **A)** Colónia contendo formas reticuladas (seta) de *A. marginale* **B)** Célula do intestino contendo uma colónia de formas densas (seta) de *A. marginale* (Adaptado de Kocan *et al.*, 2009b)

Figura 6: Mecanismo de imunidade na infeção aguda (adaptado de Palmer *et al.*, 1999)

Figura 7: *A. marginale* em cultura de células de carraças IDE8. **A)** Colónias contendo formas reticuladas que se dividem por fissão binária (setas) **B)** Colónia contendo as formas densas (infetante) (Adaptado de Kocan *et al.*, 2004)

Figura 8: Bezerros utilizados no estudo (Esquerda: Vaca: Direita: Gordo).

Figura 9: Mucosas pálidas do bezerro Gordo. **A)** Mucosa bucal **B)** Mucosa oral

Figura 10: **A)** Microscópio invertido **B)** Células IDE8 visualizadas em microscópio invertido

Figura 11: Culturas em células IDE8 **A)** Técnica da lise dos eritrócitos **B)** Técnica das células brancas **C)** Técnica utilizando Histopaque®

Figura 12: Ciclo das reações PCR na BioRad T100°C Thermal Cycler

Figura 13: Carraças recolhidas do bezerro Gordo e armazenadas numa caixa de Petri

Figura 14: Culturas em células IDE8 a partir do macerado das carraças recolhidas

Figura 15: Lâmina cito-centrifugada da cultura com setenta e cinco dias. As setas indicam as mórulas presentes no interior das células IDE8.

Figura 16: Lâmina cito-centrifugada da cultura com sete dias. A seta preta indica as inclusões suspeitas no interior das células IDE8 e a seta azul indica *A. marginale* no interior dos eritrócitos remanescentes

Figura 17: Lâmina cito-centrifugada da cultura com quinze dias. A seta preta indica as inclusões suspeitas no interior das células IDE8

Figura 18: Lâmina cito-centrifugada da cultura com vinte e cinco dias. A seta preta indica os vacúolos no interior das células IDE8

Figura 19: Lâmina cito-centrifugada da cultura com trinta e cinco dias. **A)** A seta indica as colónias de bactérias fazendo compressão sobre o núcleo das células IDE8 **B)** A seta indica as bactérias soltas após rotura dos vacúolos

Figura 20: Resultado da eletroforese obtida através das reações de PCR. **Legenda:** PM – peso molecular; C+ controlo positivo; C¹⁻ - controlo negativo; C²⁻ - controlo negativo; S – amostra de sangue; C – amostra da cultura

Figura 21: Resultado da eletroforese obtida através das reações de PCR. **Legenda:** PM – peso molecular; Co⁺ - controlo positivo; C¹ , C², C³ – amostras da cultura; S – amostra de sangue; Co⁻ – controlo negativo

Figura 22: Lâmina cito-centrifugada da cultura do frasco 3 sete dias após o isolamento. A seta indica as inclusões suspeitas no interior das células IDE8

Figura 23: Lâmina cito-centrifugada da cultura do frasco 3 sessenta dias após o isolamento. As setas indicam colónias suspeitas no interior das células IDE8

Figura 24: Lâmina cito-centrifugada da cultura do frasco 3 cem dias após o isolamento. As setas indicam colónias suspeitas no interior das células IDE8

Figura 25: Resultado da eletroforese obtida através das reações de PCR. **Legenda:** PM – peso molecular; Co⁺ - controlo positivo; C¹ , C², C³ – amostras da cultura obtida através da técnica de isolamento a partir de sangue através da técnica com Histopaque®; S – amostra de sangue; Ca – amostras das culturas de carraças; Co⁻ – controlo negativo

Lista de Abreviaturas

<i>A. marginal</i>	<i>Anaplasma marginal</i>
CT	Teste de aglutinação em cartão
CF	Fixação do Complemento
dNTP	Deoxinucleótido Trifosfato
ELISA	Enzyme Linked Imunossorbet Assay
HEPES	Ácido Hidroxietil Piperazinoetanossulfônico
IFI	Imunofluorescência Indireta
IgG2	Imunoglobulinas G2
IgM	Imunoglobulinas M
LDP	Laboratório de Doenças Parasitárias
MAbs	Anticorpos monoclonais
MSPs	Proteínas maioritárias de superfície
PBS	Tampão fosfato salino
PE	Após exposição
PI	Persistentemente infetados
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SFB	Soro fetal bovino
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
TPB	Caldo de triptose fosfato

1. Introdução

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) da Universidade Federal e Rural do Rio de Janeiro, no período de setembro de 2018 a fevereiro de 2019. Os objetivos da realização deste trabalho foram: o isolamento, cultura e propagação de *Anaplasma marginale* proveniente do seu vetor, ixodídeos, em culturas de células embrionárias de ixodídeos; melhoramento da infraestrutura para manutenção das linhagens de células embrionárias das carraças a partir de culturas primárias; consolidação de conhecimentos sobre a relação entre hospedeiro e parasita (ixodídeos e *Anaplasma marginale*) e aquisição de conhecimento e implementação de normas de segurança em laboratório.

Os organismos do género *Anaplasma* pertencem à Ordem Rickettsiales e têm como alvo eritrócitos de animais selvagens e domésticos, bem como de humanos, relevando ter grande importância em saúde pública (Munderloh *et al.*, 2003).

1.1 *Anaplasma marginale*

A espécie *Anaplasma marginale* é um agente transmitido por carraças e que afeta ruminantes em todo o mundo e é responsável pela doença anaplasmoze (Lis, 2014). Entre as doenças cujos agentes são transmitidos por carraças, a anaplasmoze bovina é considerada uma das mais importantes (Zivkovic *et al.*, 2007).

Apesar de ser mais frequente em bovinos, a doença afeta também outros ruminantes incluindo o búfalo de água, bisonte, antílopes africanos e algumas espécies de veados (Aubry & Geale, 2010).

1.1.1. Epidemiologia

A anaplasmoze bovina ocorre em climas tropicais e subtropicais em todo o mundo, sendo mais prevalente em bovinos de produção (Kocan *et al.*, 2009). A doença é endémica na América do Norte, América do Sul e Central, Ilhas das Caraíbas, África, Europa, Ásia e Austrália, provocando perdas económicas importantes na indústria bovina (Kocan *et al.*, 2003; Lis, 2014).

No Brasil, *A. marginale* em conjunto com os piroplasmas *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* formam o complexo Tristeza Parasitária Bovina. Esta doença ocorre de acordo com distribuição dos vetores, que neste país encontram as condições para o seu desenvolvimento, tendo uma relevante importância económica (Amorim *et al.*, 2014).

Nos Estados Unidos da América a doença foi reportada em quase todos os estados, à exceção do estado do Hawai (Aubry & Geale, 2010). A sua alargada distribuição resulta do transporte de bovinos portadores, persistentemente infetados (PI), responsáveis pela transmissão mecânica ou biológica a animais suscetíveis (Kocan *et al.*, 2010).

As taxas de sero-prevalência de *A. marginale* variam de forma ampla entre os países da América (tabela 1), a variabilidade dessas taxas contribui para o desenvolvimento de regiões enzoóticas estáveis geograficamente (Kocan *et al.*, 2010).

Tabela 1: Distribuição geográfica e sero-prevalência da anaplasmoze bovina em países da América (adaptado de Kocan *et al.*, 2003)

País	Prevalência (%)	Referência
Estados Unidos da América (Louisiana)	5,6	Hugh-Jones, 1988
Estados Unidos da América (Oklahoma)	4,7-17,6	Rodgers <i>et al.</i> , 1994
Costa Rica	61–90	Herrero <i>et al.</i> , 1998
Venezuela	57.7	James <i>et al.</i> , 1985 Meléndez & Forlano, 1997
Colômbia	64 - 100	Otte, 1992
Brasil	67,3	Vidotto <i>et al.</i> , 1997
Paraguai	92	Payne & Osorio, 1990
Argentina	7 - 61	Lignieres, 1928
Jamaica	69, 9	McGinnis, 1988
Antilhas	18 - 71	Camus & Montenegro-James, 1994

1.1.2. História e classificação

A. marginale foi descrita em 1910 por Sir Arnold Theiler que observou inclusões marginais em eritrócitos de bovinos que apresentavam anemia. Theiler conseguiu demonstrar que a babesiose e a anaplasmoze eram doenças diferentes e que frequentemente co-existiam

no mesmo animal, conseguindo separar os dois agentes e produzir “infecções puras” de *A. marginale* (Kocan *et al.*, 2009).

A. marginale é classificada na Ordem Rickettsiales, recentemente reorganizada em duas famílias, Anaplasmataceae e Rickettsiaceae, com base em análises genéticas do gene 16S rRNA, groELS e proteínas de superfície (Dumler *et al.*, 2001). Os membros da família Anaplasmataceae à qual pertence *A. marginale* são encontrados exclusivamente em vacúolos citoplasmáticos de células do hospedeiro (Lis, 2014). Em adição, os organismos desta família multiplicam-se em células de hospedeiros vertebrados e invertebrados (Dumler *et al.*, 2001).

A partir de análises filogenéticas foi possível formar quatro grupos genéticos distintos de organismos desta família: *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Wolbachia* e *Neorickettsia* (Dumler *et al.*, 2001).

Antes de ser reclassificado, o género *Anaplasma* incluía as espécies *Anaplasma ovis*, *A. marginale* e uma subespécie de *A. marginale* menos patogénica, *Anaplasma centrale* (Lis, 2014).

Atualmente, as espécies *Anaplasma bovis* (anteriormente *Ehrlichia bovis*), *Anaplasma phagocytophilum* (anteriormente *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* e o agente da ehrlichiose granulocítica humana – HGE), *A. platys* (anteriormente *Ehrlichia platys*) e *Aegyptianella* (género incerto devido à falta de informação da sua sequência) estão também incluídas no género *Anaplasma*, como demonstra a tabela 2 (Dumler *et al.*, 2001).

Tabela 2: Classificação atual da ordem Rickettsiales (adaptado de Kocan *et al.*, 2004)

Ordem Rickettsiales	Família <i>Rickettsiaceae</i> : Bactérias intracelulares obrigatórias que crescem livremente no citoplasma das células eucarióticas dos seus hospedeiros	Género <i>Rickettsia</i>		
		Género <i>Orientia</i>		
	Família <i>Anaplasmataceae</i> : Bactérias intracelulares obrigatórias que se replicam em vacúolos citoplasmáticos no citoplasma das células eucarióticas dos seus hospedeiros	Género <i>Anaplasma</i>	<i>Anaplasma marginale</i>	
			<i>Anaplasma centrale</i>	
			<i>Anaplasma ovis</i>	
			<i>Anaplasma bovis</i>	
			<i>Anaplasma phagocytophilum phagocytophilum</i> , <i>E. equi</i> , agente da HGE	
			<i>Anaplasma platys</i>	
			<i>Aegyptianella</i>	
		Género <i>Ehrlichia</i>	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	
			<i>Ehrlichia ruminantum</i>	
			<i>Ehrlichia ewingii</i>	
			<i>Ehrlichia ovis</i>	
			<i>Ehrlichia canis</i>	
Género <i>Neorickettsia</i>	<i>Neorickettsia helminthoeca</i>			
	<i>Neorickettsia risticii</i>			
	<i>Neorickettsia sennetsu</i>			
Género <i>Wolbachia</i>	<i>Wolbavhia pipientis</i>			

1.1.3. Patogenia

Ao contrário da *Anaplasma phagocytophilum*, *A. marginale* é específica em relação ao hospedeiro, infetando apenas ruminantes e provocando doença principalmente em bovinos (Kocan *et al.*, 2009).

Os eritrócitos são a localização habitual de *A. marginale* em bovinos (Figura 1) (Kocan *et al.*, 2003). Raramente foi observada a presença de *A. marginale* fora de eritrócitos (Lis, 2014).

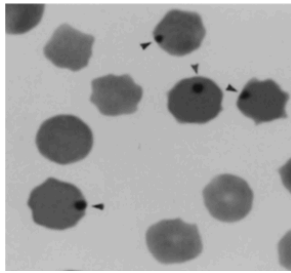


Figura 1: Eritrócitos de bovinos infetados com *A. marginale* (Kocan *et al.*, 2003)

A. marginale entra nos eritrócitos por endocitose e reside num vacúolo onde se divide por fissão binária (Zivkovic, 2010). Na infeção aguda são observadas múltiplas infeções em eritrócitos isolados e mais de 70% dos eritrócitos podem ficar infetados (Zivkovic, 2010; Lis, 2014). De acordo com Kocan *et al.* (2004), nesta fase da infeção *A. marginale* infeta dez a noventa por cento dos eritrócitos (mais de 10^8 de eritrócitos infetados por mL). O período de incubação da infeção varia conforme o número de organismos, entre sete a sessenta dias, com uma média de 28 dias (Kocan *et al.*, 2003).

Depois da infeção dos eritrócitos ser passível de ser detetada através de métodos laboratoriais de diagnóstico, o número de eritrócitos parasitados aumenta geometricamente e os eritrócitos alteram-se fisicamente ou quimicamente pela bactéria, sendo consequentemente fagocitados pelas células do sistema reticuloendotelial dos bovinos, resultando em anemia e icterícia sem hemoglobinémia nem hemoglobinúria (de la Fuente *et al.*, 2002b; Kocan *et al.*, 2003; Lis 2014).

A anaplasmoze ocorre em todas as idades, no entanto a infeção é mais frequente em bovinos jovens. Apesar da doença ser mais frequente em jovens, estes são mais resistentes à infeção por *A. marginal* do que os animais adultos (Ribeiro & Lima, 1996; Kocan *et al.*, 2003). Bezerros com idade inferior a seis meses são mais resistentes à doença do que bovinos mais velhos. Em animais com mais de dois anos de idade, a doença é muitas vezes fatal (Kocan *et al.*, 2003). O facto dos bezerros que se infetam nos primeiros anos de vida apresentarem maior resistência à doença é explicado por fatores como a absorção de anticorpos do colostro, imunidade celular e presença de fatores séricos de resistência (Madrugal *et al.*, 1987).

A maioria dos bovinos que sobrevive à doença aguda apresentam-se clinicamente saudáveis, no entanto ficam persistentemente infetados (PI) para o resto da vida, permanecendo como reservatórios da doença (Scoles *et al.*, 2006). Estes animais, apesar de

não apresentarem sinais clínicos, têm uma infecção persistente com uma bacteriemia de baixo nível (Kieser *et al.*, 1990). Os níveis flutuantes de *A. marginale* nos animais PI pode afetar tanto a proporção de carraças que se tornam infetantes como o número de organismos presentes nas carraças infetadas (Eriks *et al.*, 1993). Os níveis de bacteriemia em amostras referentes a intervalos bimestrais, apresentam uma variação acentuada em animais PI (de $<10^3$ a $<10^5$ eritrócitos infetados por mL) (Palmer *et al.*, 1999). Esta variação pode representar a multiplicação cíclica de *A. marginale*, um evento consistente com o aparecimento de variantes antigénicas que não foram reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro anteriormente (Kieser *et al.*, 1990). A persistência da bacteriemia nos animais PI, que é fundamental para a continuidade na transmissão de *A. marginale*, ocorre em função de uma resposta imune defensora e é caracterizada por ciclos de bacteriemia sequenciais, que ocorrem em intervalos de aproximadamente cinco semanas (figura 2) (Palmer *et al.*, 1999).

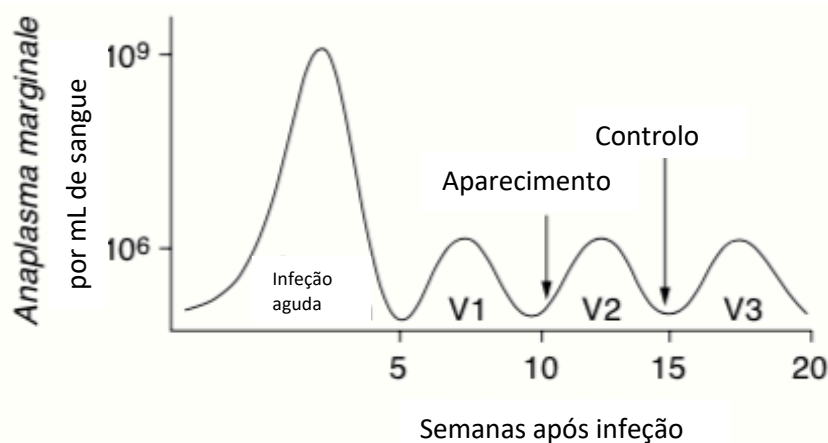


Figura 2: Ciclos de bacteriemia de *A. marginale*. As variantes que surgem em três ciclos estão designados na figura como V1, V2 e V3. Os pontos em que a variante surge e é controlada estão designados por V2 (Palmer *et al.*, 1999)

Os bovinos cronicamente infetados, geralmente não manifestam novos sinais clínicos da doença ao longo do tempo, no entanto podem ter uma recaída de anaplasmoses se, por exemplo, forem infetados por outros agentes patogénicos (Lis, 2014). A transmissão de *A. marginale* dos animais cronicamente infetados para bovinos suscetíveis revela ser um fator importante no estabelecimento da anaplasmoses como uma doença enzoótica (Kocan *et al.*, 1981).

A doença é caracterizada por febre, anemia, icterícia, estase ruminal, obstipação, perda de peso e por vezes, morte (Zweygarth *et al.*, 2006). Os bovinos infetados podem também apresentar um declínio na produção de leite (Howden *et al.*, 2010). A severidade dos sinais clínicos pode variar consideravelmente, dependendo da espécie e idade do animal infetado, bem como da estirpe de *Anaplasma* sp. envolvida na infecção (Howden *et al.*, 2010; Lis, 2014).

1.1.4. Transmissão

A espécie *A. marginale* pode ser transmitida de três formas distintas. Uma das formas mais comuns é a transmissão por um vector biológico, quando os eritrócitos infetados são ingeridos por carrças durante uma refeição de sangue, *A. marginal* replica-se no interior do intestino das carrças e nas glândulas salivares, sendo posteriormente transmitida através da saliva das carrças aos ruminantes que não infetados (Aubry & Geale, 2010). A transmissão também pode ser mecânica, através de fomites contaminadas com sangue infetado de bovinos suscetíveis ou, através do aparelho bucal de insetos hematófagos sugadores contaminado com sangue infetado (Kocan *et al.*, 2004). Os fomites que frequentemente participam na transmissão mecânica poderão ser agulhas, lâminas de descorna, pinças, instrumentos de tatuagem e de marcação das orelhas e instrumentos de castração (Kocan *et al.*, 2004). A terceira forma de transmissão possível é por transmissão transplacentária, em que os eritrócitos infetados se movem pela placenta para os fetos, neste caso sem amplificação de *A. marginale* (Aubrey & Geale, 2010).

A transmissão biológica de *A. marginal* através de ixodídeos pode ser transestadial, quando a carrça se infeta e transmite o agente no estágio seguinte do seu ciclo de vida ou intraestadial, quando a carrça se infeta e transmite o agente no mesmo estágio do ciclo de vida (Eriks *et al.*, 1993). Geralmente os ixodídeos associados a este tipo de transmissão são *Dermacentor spp.*, *Ixodes ricinus* e *Rhipicephalus spp.* (tabela 3) (Kocan *et al.*, 2004). A capacidade do vector para adquirir infeção com *A. marginal* varia consoante a espécie de carrça responsável pela transmissão (Kocan *et al.*, 2010).

Apesar de *A. marginale* já ter sido identificada no DNA de várias espécies de carrças onde a transmissão da doença foi experimental, isso não significa que a transmissão ocorra em condições naturais (Lis, 2014).

As carrças da espécie *Rhipicephalus microplus* encontram-se distribuídas amplamente na América do Sul e Central, sendo, por isso considerada a espécie transmissora de *A. marginale* no Brasil (Guglielmone, 1995).

A espécie *Dermacentor andersoni*, conhecida como a carrça da *The Rocky Mountain*, é o vector biológico predominante de *A. marginale* na zona oeste dos Estados Unidos, onde *A. marginal* é endémica (Scoles *et al.*, 2006).

Tabela 3: Espécies de carraças que transmitem *A. marginale* (adaptado de Lis, 2014)

Espécie	Referência
<u>Ixodídeos</u>	
<i>Amblyomma gemma*</i>	(Fyumagwa et al., 2009)
<i>Dermacentor albipictus</i>	(Lankester et al., 2007)
<i>Dermacentor andersoni</i>	(Anthony and Roby, 1966; Kocan et al., 1992a; Kocan et al., 1981; Lankester et al., 2007)
<i>Dermacentor hunteri</i>	(Stiller et al., 1999)
<i>Dermacentor occidentalis</i>	(Anthony & Roby, 1966)
<i>Dermacentor reticulatus</i>	(Zivkovic et al., 2007)
<i>Dermacentor variabilis</i>	(Anthony & Roby, 1966; Kocan et al., 1981; Lankester et al., 2007; Stich et al., 1989)
<i>Hyalomma asiaticum</i>	(Zahang et al., 2013)
<i>Hyalomma excavatum</i>	(Shkap et al., 2009)
<i>Hyalomma marginatum rufipes</i>	(Potgieter, 1979)
<i>Ixodes scapularis</i>	(Rees, 1934)
<i>Ixodes ricinus</i>	(Helm, 1924)
<i>Rhipicephalus (Boophilus) annulatus</i>	(Samish et al., 1993)
<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	(Fyumagwa et al., 2009)
<i>Rhipicephalus bursa</i>	(Sergent et al., 1945)
<i>Rhipicephalus (Boophilus) calcaratus</i>	(Sergent et al., 1945)
<i>Rhipicephalus compositus*</i>	(Fyumagwa et al., 2009)
<i>Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus</i>	(Potgieter, 1979; Theiler, 1912)
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	(Futse et al., 2003)
<i>Rhipicephalus praetextatus*</i>	(Fyumagwa et al., 2009)
<i>Rhipicephalus pulchellus*</i>	(Fyumagwa et al., 2009)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	(Shkap et al., 2009)
<u>Argasídeos</u>	
<i>Argas persicus</i>	(Howell et al., 1941)

A transmissão intraestadial de *A. marginale* parece ser epidemiologicamente importante. Depois do período inicial da refeição da carraça, o adulto macho da espécie *Dermacentor andersoni* pode facilmente ser transferido de um hospedeiro para outro devido ao comportamento social e de *grooming* dos bovinos, tornando evidente a importância primária dos adultos machos na transmissão de *A. marginale* (Eriks *et al.*, 1993)

Dois pontos determinantes para o sucesso dos vetores são, a capacidade das carraças em adquirir a infecção e a replicação de *A. marginale* nas glândulas salivares das carraças (Futse *et al.*, 2003).

1.1.5. Ciclo de vida

O ciclo de vida de *A. marginale* é coordenado pelo ciclo de alimentação das carraças, demonstrado na figura 2 (Kocan *et al.*, 2004).

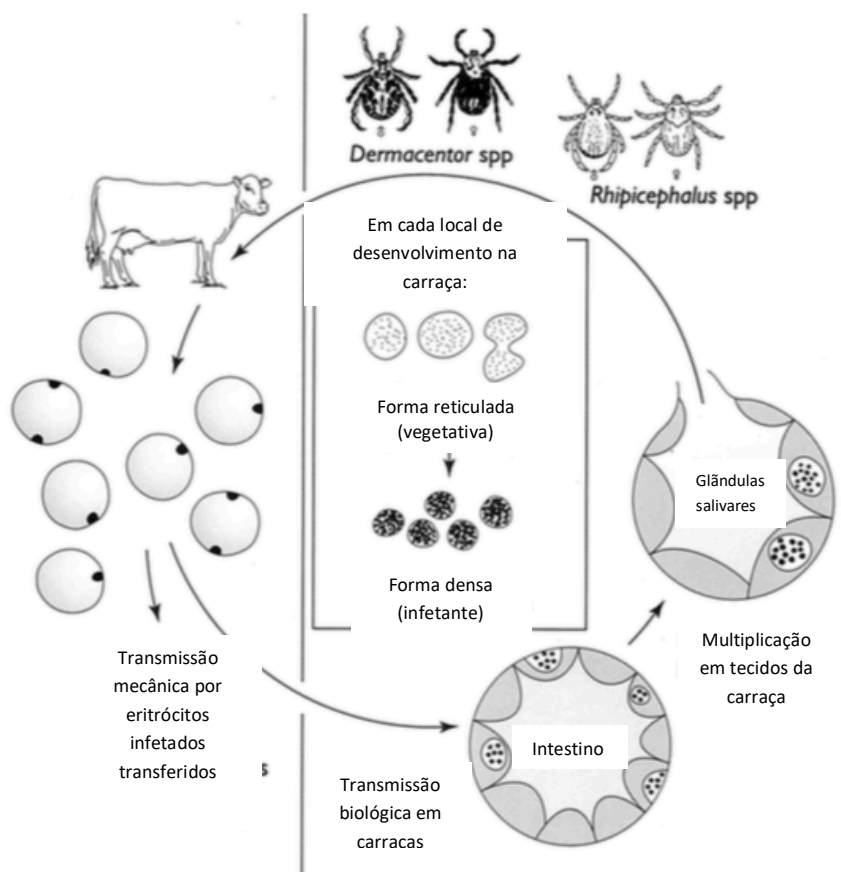


Figura 2: Esquema do ciclo do desenvolvimento de *A. marginale* em bovinos e carraças (adaptado de Kocan *et al.*, 2003)

Os eritrócitos de bovinos infetados com *A. marginale* são ingeridos pelas carraças quando estas se alimentam, sendo o primeiro local de infecção o intestino (figura 3A) e as células tubulares de Mapighi (figura 3B) das carraças. Nas refeições subsequentes da carraça, outros tecidos ficam infetados, incluindo as glândulas salivares (figura 4), de onde *A. marginale* pode ser transmitida para o hospedeiro vertebrado (Zivkovic, 2010).

Após a replicação inicial no intestino, *A. marginale* entra na hemolinfa e invade as glândulas salivares (figura 4) (Brayton, 2012; Lis, 2014).

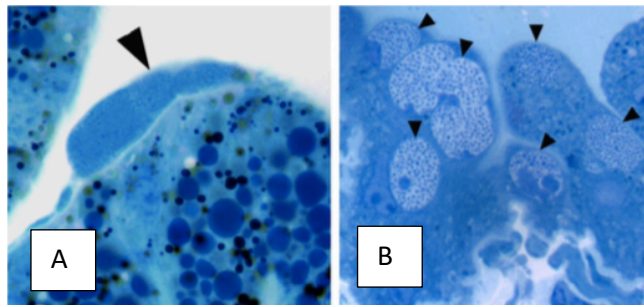


Figura 3: Colónias de *A. marginale* em tecidos de machos *Dermacentor variabilis*. **A)** Colónias de *A. marginale* (setas) no músculo do intestino **B)** Colónias de *A. marginale* (setas) nos tubos de Malpighi (Adaptado de Kocan *et al.*, 2009)

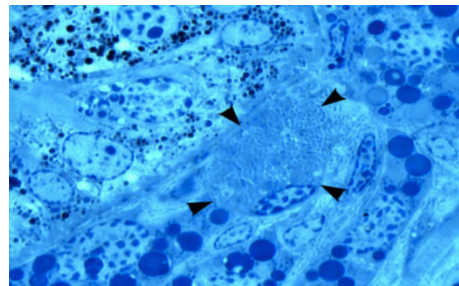


Figura 4: Colónias de *A. marginale* (setas) nas glândulas salivares de *Dermacentor reticulatus* (adaptado de Zivkovic *et al.*, 2007)

Existem duas formas de *A. marginale* dentro do vacúolo parasitóforo no citoplasma da célula das carraças. A primeira forma de *A. marginale* visível é a forma reticulada (vegetativa) (Figura 5A), que se divide por fissão binária, formando colónias grandes que contém centenas de organismos. A forma reticulada transforma-se na forma densa (Figura 5B), que é a forma infetante e que pode sobreviver no exterior das células dos ixodídeos (Kocan *et al.*, 2009).

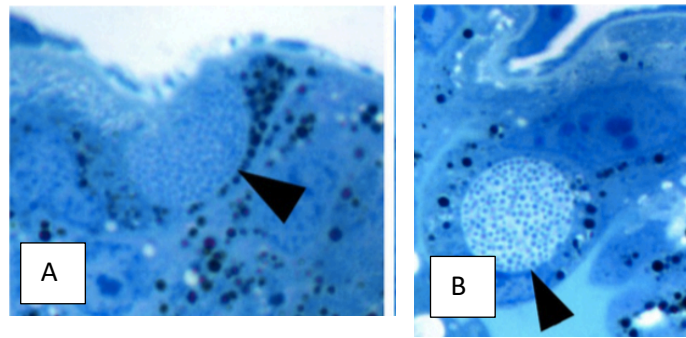


Figura 5: Colônias de *A. marginale* no intestino de machos *Dermacentor variabilis*. **A)** Colônia contendo formas reticuladas (seta) de *A. marginale* **B)** Célula do intestino contendo uma colônia de formas densas (seta) de *A. marginale* (Adaptado de Kocan *et al.*, 2009)

Os bovinos infetam-se com *A. marginal* quando a forma densa é transmitida através da saliva durante a alimentação da carrapa (Kocan *et al.*, 2003). A transmissão de *A. marginale* requer, portanto, uma invasão e replicação eficientes nos tecidos das carrapas, resultando no desenvolvimento de infecção nas glândulas salivares (Brayton, 2012). Enquanto abandona a célula, a colônia e as membranas da célula fundem-se, o que permite a saída de *A. marginal* sem provocar danos na célula do hospedeiro (Lis, 2014).

As carrapas têm a capacidade de adquirir infecção depois de se alimentarem em animais PI com baixos níveis de parasitemia (Zivkovic, 2010).

1.1.6 Proteínas maioritárias de superfície

A superfície das bactérias intracelulares transmitidas por carrapas apresenta várias proteínas que são remodeladas durante a transmissão do agente patogénico entre hospedeiros vertebrados e invertebrados (Lis, 2014). Foram caracterizadas proteínas maioritárias de superfície (MSPs) reconhecidas por anticorpos neutralizantes e com uma forte relação intermolecular na membrana dos organismos, desempenhando importantes funções (Palmer & McElwain, 1995). Estas proteínas modelam funções necessárias à sobrevivência, replicação e transmissão da bactéria e a sua expressão altera-se pela facilidade de sobrevivência desta no interior dos diversos hospedeiros (Lis, 2014). As MSPs têm um papel importante na interação entre *A. marginal* e as células do hospedeiro, uma vez que estas têm capacidade de provocar infecção (Aubry & Geale, 2010).

Estudos realizados sugerem que as MSPs podem não ser marcadores eficientes para estudos biogeográficos a nível global, no entanto podem ser úteis na comparação de estirpes

em regiões definidas, podendo fornecer informações sobre a evolução das relações entre o hospedeiro e o agente patogénico e entre o vetor e o agente patogénico (Kocan *et al.*, 2010).

Foram identificadas em eritrócitos seis MSPs: MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP4 e MSP5 (Kocan *et al.*, 2003). Das seis MSPs de *A. marginale* identificadas e caracterizadas, MSP1a, MSP4 e MSP5 são codificadas por apenas um gene e não variam entre os isolados enquanto MSP1b, MSP2 e MSP3 são codificadas por uma família de genes e os seus antígenos variam nos animais PI (de la Fuente *et al.*, 2001b; de la Fuente *et al.*, 2003b; Kocan *et al.*, 2003;).

Tem-se demonstrado que a MSP1 está envolvida na adesão aos recetores das células dos hospedeiros e das carraças e é reconhecida pelo sistema imunitário dos bovinos após a infeção. É um complexo formado por dois polipeptídeos: MSP1a, codificado por um gene (*msp1α*) e MSP1b, codificado por dois genes (*msp1β1* e *msp1β2*) (de la Fuente *et al.*, 2002b). Estudos realizados sugerem que os polipeptídeos MSP1 e MSP1b são específicos em ter funções de adesão possibilitando *A. marginal* de aderir aos eritrócitos dos bovinos, sendo possivelmente parte do processo de invasão (McGarey *et al.*, 1994). O peso molecular de MSP1a varia entre as estirpes de *A. marginale* devido ao diferente número de repetições de aminoácidos (Kocan *et al.*, 2004). É devido ao número e sequência de repetições do gene MSP1a que este tem sido usado como marcador genético para identificação geográfica de isolados. Enquanto MSP1a demonstrou estar envolvida na adesão de *A. marginal* aos eritrócitos de bovinos e às células de carraças, MSP1bβ1 apenas está envolvida na adesão aos eritrócitos bovinos (de la Fuente *et al.*, 2002b). Tem-se verificado também que MSP1a está envolvida na infeção e transmissão de *A. marginal* por carraças do género *Dermacentor* e contribui para a imunidade na infeção de *A. marginal* em bovinos (Kocan *et al.*, 2003).

MSP2 é uma proteína imuno-dominante codificada por uma família de genes polimórfica (Palmer *et al.*, 1994). A expressão da MSP2 é controlada por um operão de 3,5kb que é conservado entre linhagens de *A. marginal*, *Anaplasma ovis* e *Anaplasma central*, genotipicamente e fenotipicamente distintas e contém, na direção 5'-3', quatro fases de leitura aberta (open reading frames): *opag3*, *opag2*, *opag1* e *msp2* (Lohr *et al.*, 2002). O gene *msp2* consiste em nove pseudogenes que têm um papel importante em alcançar variações antigénicas múltiplas (Brown *et al.*, 2003 citado por Lis, 2014). Pensa-se que os linfócitos T específicos dos epítomos de MSP2 podem ativar macrófagos a agir como células ajudantes de linfócitos B, estimulando assim as respostas humorais primárias contra as várias regiões variáveis desta proteína, expostas na superfície de *A. marginale* a cada pico de bacteriemia (Brown *et al.*, 2001).

MSP3 é também uma proteína imuno-dominante codificada por uma família de genes polimórfica (Alleman *et al.*, 1997). Foi recentemente demonstrado que as variantes simples de

MSP3 são expressas em infecções de mamíferos e de carraças e as variantes antigénicas múltiplas surgem apenas sob pressão imune seletiva durante a infeção persistente (Palmer & Brayton, 2013 referido por Lis, 2014).

As proteínas MSP4 e MSP5 são codificadas por apenas por um gene (Oberle *et al.*, 1993; Visser *et al.*, 1992). O papel destas proteínas ainda não foi bem definido, no entanto, o facto de continuarem conservadas sugere que têm um papel importante no ciclo de vida de *A. marginal* (Lis, 2014). MSP4 pode revelar ter um grande potencial em proteger os bovinos de isolados heterólogos comparativamente a outras proteínas de superfície de *A. marginal*, que variam amplamente em tamanho e estrutura (Oberle *et al.*, 1993).

1.1.7. Resposta imune contra *A. marginale*

A imunidade conferida contra *A. marginale* é de duração variável e tem origem humoral e celular (Vidotto & Marana, 2001).

Para atingir proteção adequada contra a infeção é necessária a ativação de linfócitos T CD4+ e a produção de eritrócitos. *A. marginale* requer então a indução de títulos elevados de anticorpos de imunoglobulinas G2 (IgG2) contra a superfície das células B, em simultâneo com as células T CD4+ mediadas pela ativação dos macrófagos para opsonização e morte da bactéria (figura 6). Os linfócitos CD4+ são fundamentais para produção de diversas citocinas, entre as quais o interferão gama (IFN γ). O IFN γ é responsável por aumentar a atividade dos macrófagos para reconhecer o antígeno fagocitado, pela fagocitose destes e também pela estimulação da produção de óxido nítrico. Em adição, IFN γ tem ação sobre os linfócitos B, induzindo a produção de IgG2, que aumenta a capacidade de fagocitose por opsonização (Palmer *et al.*, 1999).

Este modelo de imunidade fornece a base de imunidade específica mediada por células contra um agente patogénico, que se limita ao parasitismo intraeritrocitário e que portanto, não pode ser marcado diretamente pelos linfócitos citotóxicos de classe I e II do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) (Palmer *et al.*, 1999)

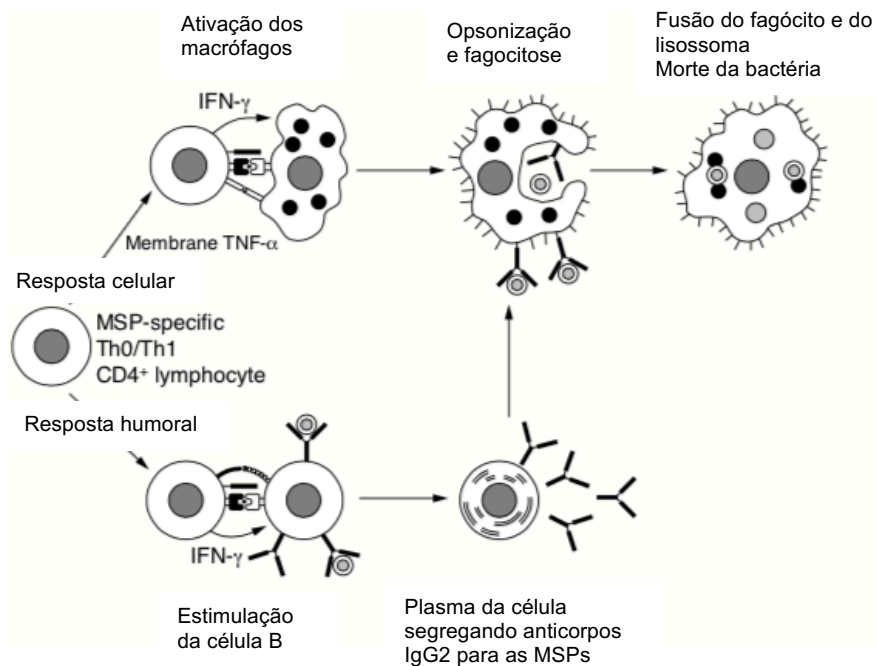


Figura 6: Mecanismo de imunidade na infecção aguda (adaptado de Palmer *et al.*, 1999)

Devido à capacidade de *A. marginale* resistir à defesa imunológica a partir da alteração da antigenicidade das suas MSPs, quando a infecção se estabelece no hospedeiro mantém-se durante toda a sua vida. A MSP2 é uma das principais proteínas que se relaciona com esta variação antigénica, uma vez que é codificada por uma família de genes polimórficos, como referido. Assim, após a fase aguda da doença, a ocorrência da emergência de variantes da MSP2 é frequente, o que justifica os picos de bacteriemia presentes da infecção persistente (Brown, 2012 referido por Mendonça, 2015).

A imunização de bovinos com as MSPs nativas e recombinantes de *A. marginale* induz proteção significativa contra a anaplasmoze bovina em aproximadamente 70% das vacinas, com proteção relacionada com anticorpos específicos contra MSP (Palmer *et al.*, 1999; Vidotto & Marana, 2001).

1.1.8. Estirpes

As relações filogenéticas e a evolução dos isolados de *A. marginal* são importantes para entender a biologia e o controlo da anaplasmoze (Kocan *et al.*, 2007).

Têm sido identificadas várias estirpes de *A. marginal* provenientes de diversas áreas geográficas (Aubry & Geale, 2010). Estas diferem pelas características morfológicas, origem

geográfica, diferenças na transmissão por carraças, nível de virulência, tamanho molecular das proteínas de superfície, fragmentos de restrição do DNA e reatividade perante um painel de anticorpos monoclonais (MAb) (Eriks *et al.*, 1994; Baêta, 2015). As diferenças antigénicas entre as estirpes de *A. marginal* são importantes uma vez que, para desenvolver vacinas que protejam contra desafios heterólogos, devem ser identificados epítomos de *A. marginal*. Os testes de diagnóstico para identificar animais infetados devem também ser baseados em sequências ou antígenos de *A. marginal* (Eriks *et al.*, 1994).

As MSPs são usadas para análises filogenéticas por estarem envolvidas na interação agente patogénico-hospedeiro e por estarem suscetíveis a evoluir mais rapidamente do que outros genes, devido às pressões seletivas exercidas pelo sistema imune do hospedeiro (de la Fuente *et al.*, 2003b; Kocan *et al.*, 2007).

Uma das características para identificar isolados de *A. marginal* é o peso molecular de MSP1a, cujo tamanho varia entre os isolados devido ao diferente número de repetições de 28-29 aminoácidos (de la Fuente *et al.*, 2001b).

Foram sequenciados genes que codificam MSP1a e MSP4, *msp1* e *msp4*, de nove isolados da América do Norte para análise filogenética. Essas análises apoiam a existência de um clado de *A. marginal* composto por isolados da Florida e da Virgínia (clado de sudeste). Foram realizadas análises de sequências de fragmentos de rDNA 16S de *Dermacentor variabilis*, carraça vetor de *A. marginale*, de diferentes regiões dos Estados Unidos para avaliar a possível evolução vetor – parasita. Uma árvore filogenética pode ser utilizada para estudar o padrão da distribuição geográfica (biogeográfica) e a co-evolução da interação entre o vetor e o parasita (de la Fuente *et al.*, 2001b).

Estes estudos foram também realizados usando isolados de *A. marginal* do Novo Mundo, provenientes dos Estados Unidos, México, Brasil e Argentina (Kocan *et al.*, 2003). Os isolados de *A. marginale* dos Estados Unidos foram agrupados em dois clados: o de sudeste, que consiste em isolados da Florida, Mississippi e Virgínia e um de oeste-central, que consiste em isolados da Califórnia, Idaho, Illinois, Oklahoma e Texas (Kocan *et al.*, 2003).

A partir de análises de códon e de aminoácidos foi demonstrado que estes se alteram na filogenia do DNA de MSP4, evidenciando que *msp4* não está sob pressão positiva de seleção. Em contraste, a filogenia do DNA de MSP1a e a sequência de proteínas de treze estirpes de Oklahoma, em comparação com sete estirpes da América Latina e catorze dos Estados Unidos, não mostrou agrupamento geográfico e evidenciou que o gene está sob pressão positiva de seleção. Dos estudos realizados foi possível inferir que a utilização de sequências de MSP1a para definir isolados geográficos de *A. marginal* mostraram-se questionáveis uma vez que a variação das sequências pareceu única entre diferentes isolados (Kocan *et al.*, 2002).

Ambos os clados dos Estados Unidos mostraram estirpes de Oklahoma, o que poderá ser indicativo da migração de gado. Em adição, na eventualidade da migração de gado ter criado novos genótipos, pode ter estabelecido a infecção por transmissão mecânica ou biológica a bovinos suscetíveis. De acordo com Kocan *et al.*, (2003), as sequências de msp4 mostraram ser bons marcadores genéticos para inferir padrões filo-geográficos de isolados de *A. marginale* em escala geográfica alargada.

1.1.9. Diagnóstico

A importância global de doenças provocadas por agentes transmitidos por carraças como a anaplasmose, tem vindo a aumentar à medida que os países em desenvolvimento procuram aumentar a produção, introduzindo raças de bovinos suscetíveis. É por isso de elevada importância a realização de testes efetivos de diagnóstico nestes países. Estes testes têm diversos objetivos, tais como: identificação de espécies e estirpes de hemoparasitas envolvidos na doença; determinação da distribuição das espécies de parasitas e avaliação do risco de doença a nível nacional ou regional; certificação do estado de infecção do animal para os requisitos de comércio e para erradicação da doença; identificação ou confirmação da causa da doença ou morte, em caso de surtos; identificação da espécie de artrópodes como vetores e de etapas de transmissão dos vetores (Bose *et al.*, 1995).

1.1.9.1. Diagnóstico clínico

Em áreas endémicas os produtores suspeitam de anaplasmose baseando-se em surtos anteriores de doença que já tenham ocorrido naquele local. Surtos clínicos acontecem mais frequentemente durante estações quentes e húmidas, épocas em que a transmissão pelos vetores é mais frequente. O primeiro sinal clínico detetado é normalmente a presença de piroxia. Em casos terminais, a febre com temperaturas superiores a 40°C pode persistir durante o período de aumento da parasitémia, antes da morte do animal. A severidade dos sinais clínicos apresentados pelo animal depende do nível de anemia e incluem palidez da pele e das mucosas e aumento das taxas respiratória e cardíaca. O animal fica progressivamente mais letárgico e anorético à medida que o volume celular diminui, conseqüente ao aumento da parasitémia. Com o avanço da doença, os bovinos podem apresentar atonia gastrointestinal, estase e obstrução do rúmen com conseqüente desidratação e perda de peso (Kocan *et al.*, 2009).

Algumas alterações macroscópicas são evidentes durante a necrópsia de animais com doença clínica. As alterações presentes são características de anemia aguda em que os eritrócitos são removidos pelo sistema retículo endotelial, mucosas anémicas e carcaças

emaciadas. As alterações evidentes são as mucosas anêmicas ou ictéricas, esplenomegália, resultante da destruição dos eritrócitos pelas células fagocíticas dos bovinos e distensão da vesícula, com acumulação de biliar. Outras alterações presentes são coração com coloração pálida, presença de hemorragias e petéquias no pericárdio e epicárdio, hepatomegália, linfonodos com coloração amarelada ou acastanhada ao corte e ligeiramente edemaciados (Kreier, 1977; Jaswal *et al.*, 2013).

1.1.9.2. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado através de métodos diretos e indiretos, dependendo da facilidade de execução, disponibilidade de reagentes, de infraestruturas e ainda da capacidade técnica de cada laboratório (Vidotto & Marana, 2001).

Durante a fase aguda, o diagnóstico de anaplasmoze bovina pode ser realizado através da presença de *A. marginal* em esfregaços sanguíneos corados com Giemsa, uma vez que os níveis de parasitemia são elevados. Em animais portadores da doença, como um nível de parasitemia menor, a infecção é geralmente diagnosticada através de testes serológicos, confirmados por métodos de detecção molecular (Aubry & Geale, 2010).

1.1.9.2.1. Métodos diretos de diagnóstico

Métodos diretos de diagnóstico incluem, para além da realização de um esfregaço sanguíneo para visualização dos organismos nos eritrócitos, PCR (reação em cadeia da polimerase), testes de aglutinação em cartão (CT) e isotestes.

O PCR é um método altamente sensível para amplificação *in vitro* de sequências específicas de DNA, desenvolvido para detetar pequenas quantidades de DNA de diferentes agentes em amostras de sangue ou de tecidos (Vidotto & Marana, 2001). O método de PCR usando os genes *msp4* e *msp1* de *A. marginale* tem sido utilizado para diferenciar isolados, sendo útil para rastrear a origem de um surto e para diferenciar entre espécies, como por exemplo entre *A. marginal* e *A. centrale* (Kocan *et al.*, 2009). Recentemente utiliza-se também o método de PCR em tempo real (RT-PCR), que deteta e quantifica o DNA de *A. marginale* (gene *msp1*) em sangue de bovinos infetados naturalmente (Carelli *et al.*, 2007). O RT-PCR é uma técnica quantitativa, rápida de realizar e não requer qualquer manipulação após a amplificação. Pode ser utilizada para estudar os níveis da expressão genética (Bell & Ranford-Cartwright, 2002). Foi também descrita outra técnica de PCR denominada nested-PCR que junta a análise das sequências e hibridização para identificar o DNA de *msp5* de *A. marginale* no sangue (Torioni de Echaide *et al.*, 1998). Num estudo realizado por Torioni de Echaide *et al.*

(1998), a partir no nested-PCR, foi possível detetar trinta eritrócitos infetados por mL de sangue, o que corresponde a um aumento de dez a cem vezes na sensibilidade em relação a outras técnicas quantitativas de PCR descritas.

O isoteste é um método de diagnóstico que atualmente é pouco utilizado, tendo o objetivo de identificar infeções latentes. O sangue de animais portadores é sub-inoculado em animais esplenectomizados e suscetíveis. Devido ao teste apresentar custos elevados e da necessidade de se usar animais de experimentação, tem-se optado pelo cultivo de células como alternativa (Bose *et al.*, 1995).

1.1.9.2.2. Métodos indiretos de diagnóstico

Métodos indiretos de diagnóstico incluem provas de aglutinação, teste de fixação do complemento (CF), teste de imunofluorescência indireta (IFI), testes de ELISA (Enzyme Linked Immunossorbent Assay) e “Western Blot”.

O teste de CF é baseado em reações de anticorpos IgM produzidos no início das infeções primárias. No entanto, apresenta uma baixa sensibilidade uma vez que a maioria dos animais testados são cronicamente infetados (Bose *et al.*, 1995).

Para a realização de testes de IFI são utilizadas amostras de sangue de bovino. Os anticorpos IgG presentes no soro reagem com o antigénio, sendo identificados por anticorpos anti-IgG, marcados com isotiocianato de fluoresceína (conjugado). Apesar de apresentar uma boa sensibilidade, este teste tem alguns inconvenientes como a subjetividade do operador e a fluorescência não específica, atribuída à adesão dos anticorpos aos eritrócitos infetados (Aubry & Geale, 2010; Vidotto & Marana, 2001). Devido à subjetividade do operador que realiza o teste, a padronização é difícil (Bose *et al.*, 1995)

Os testes de aglutinação apresentam como princípio básico a reação de anticorpos bivalentes e antigénios polivalentes, formando-se compostos macromoleculares visíveis (Vidotto & Marana, 2001). Os testes de aglutinação em cartão são muito fáceis de executar em campo e permitem a disponibilidade dos resultados em apenas alguns minutos. Estes testes de diagnóstico utilizam organismos de *Anaplasma* sp. corados com corante verde como antigénio. São misturadas quantidades estabelecidas de antigénio e plasma no cartão e este é inclinado, sendo o grau de aglutinação avaliado após um tempo definido (Wright, 1990). No entanto, podem desenvolver-se reações não específicas e a subjetividade da interpretação do resultado da reação pode resultar numa variação na interpretação do teste. Em adição, o antigénio utilizado na realização do teste pode ser difícil de preparar e pode variar entre os laboratórios, requer a infeção de bezerras esplenectomizadas por inoculação intravenosa com sangue contendo eritrócitos infetados de *Anaplasma* sp. (Aubry & Geale, 2010).

O método serológico disponível mais adequado para identificar bovinos infetados com *Anaplasma* sp. é o ELISA de captura em que é utilizado um MAb específico para MSP5, ANAF16C1. Este teste deteta especificamente a presença de anticorpos séricos que estão marcados na superfície de MSP5 de *Anaplasma* spp. (Aubry & Geale, 2010). Os testes de ELISA podem ter elevada sensibilidade e eficiência, permitindo o processamento de um grande número de amostras (Bose *et al.*, 1995). No entanto, este teste não diferencia entre *A. marginale* e outras espécies do género *Anaplasma* pois todas expressam o antígeno MSP5 e induzem o reconhecimento de anticorpos pelo MAb específico de MSP5 (Visser *et al.*, 1992 referido por Aubry & Geale, 2010).

O “Western Blot” é um teste que permite detetar a infeção por *A. marginale* em poucos dias após a exposição ao agente, sendo utilizado para o reconhecimento de antígenos específicos marcados que são revelados por um anti-soro marcado (Kwak & Smith, 1989 referido por Vidotto & Marana, 2001).

As metodologias de diagnóstico que têm surgido, com maior sensibilidade e especificidade, têm contribuído para a realização de estudos mais avançados sobre a epidemiologia da doença, permitindo a adoção de medidas profiláticas mais eficazes (Vidotto & Marana, 2001).

1.1.10. Medidas de controlo

As medidas de controlo da anaplasmoze bovina utilizadas atualmente, dependem da localização geográfica e consistem no controlo dos vetores (artrópodes), administração de antibióticos e vacinação. A escolha da estratégia a utilizar depende da epidemiologia da doença nas regiões afetadas e é influenciada pela gestão local de práticas de controlo (Kocan *et al.*, 2000).

1.1.10.1. Controlo dos vetores

O controlo dos vetores responsáveis pela anaplasmoze, é intensivo e dispendioso. A repetida aplicação de acaricidas e inseticidas tem tido como resultado o desenvolvimento de resistência nas populações de carraças e de insetos, além de que desenvolve o risco de criar uma população suscetível de bovinos em áreas endémicas (Kocan *et al.*, 2000).

O controlo dos artrópodes que transmitem a doença não é exequível em muitas regiões e apenas pode prevenir parcialmente a transmissão de *A. marginale*, que ocorre tanto por transmissão biológica por carraças, quanto por transmissão mecânica de sangue infetado por

insetos e fomites, (Kocan *et al.*, 2003). Enquanto, por exemplo, em África o controlo de carraças é muito utilizado, nos Estados Unidos este método é raramente empregue (Kocan *et al.*, 2000).

1.1.10.2. Administração de antibióticos

A utilização de antibióticos apenas previne a infeção ativa, não eliminando a infeção persistente nem prevenindo os bovinos de se tornarem persistentemente infetados com *A. marginale*. O uso extensivo de antibióticos implica riscos na saúde pública resultando não só na emergência de bactérias resistentes, mas também em prejuízos humanos, animais e ambientais (Kemper, 2007). Em adição, os bovinos que se tenham submetido a antibioterapia podem não estar livres de infeção (Kocan *et al.*, 2000).

A administração de tetraciclina aos bovinos tem sido efetiva por injeção, através de alimentos ou pela incorporação em suplementos alimentares. No entanto, quando usada através do alimento ou de suplementos torna-se difícil de garantir as doses adequadas para os bovinos. Ao contrário da maior parte do mundo, em várias áreas dos Estados Unidos as tetraciclina são utilizadas extensivamente para o controlo da anaplasmoze. Isto acontece porque nos Estados Unidos, a administração de antibióticos é muito importante enquanto medida de controlo uma vez que as vacinas mortas foram retiradas do mercado no país. As tetraciclina demonstram algumas desvantagens devido aos custos, necessidade de alimentação, períodos de retenção de carne e leite e o risco de desenvolvimento de resistência (Kocan *et al.*, 2000). Segundo Gotze *et al.* (2008), o uso de oxitetraciclina na dose de 20 mg/kg apresentou uma eficácia segura no tratamento de anaplasmoze em vacas leiteiras de produção (Alberton *et al.*, 2015)

A utilização de enrofloxacina no tratamento da anaplasmoze bovina através de altas concentrações plasmáticas num curto período de tempo demonstra uma ação bactericida mais rápida. A aplicação de uma dose única de 7,5mg/kg mostrou ter uma redução significativa da bacteriemia (Kaartinem *et al.*, 1995).

Outro tratamento para a anaplasmoze bovina muito difundido na prática veterinária é a utilização de dipropionato de imidocarb. Para eliminar a infeção, Akhter *et al.* (2010) relataram que a dose a administrar em duas injeções intramusculares é de 3 mg/kg, já Roby e Mazzola (1972) relataram a quimioesterilização com duas doses de 5 mg/kg, em intervalos de catorze dias (Aberton *et al.*, 2015)

1.1.10.3. Vacinação

O método de controlo de anaplasrose mais económico e efetivo em todo o mundo é a vacinação. Existe dois tipos de vacinas, vacinas vivas e vacinas inativas ou mortas, e ambas incidem no uso de eritrócitos de bovinos infetados com *A. marginale* e induzem imunidade que reduz ou previne a doença clínica. No entanto, as vacinas não previnem os bovinos de se tornarem PI com *A. marginale* (Kocan *et al.*, 2003).

1.1.10.3.1. Vacinas vivas

As vacinas vivas envolvem a infeção de bovinos através da inoculação de eritrócitos infetados com isolados menos patogénicos de *A. marginale* ou de *A. centrale* (Kocan *et al.*, 2003).

Vacinas vivas de estirpes de *A. centrale* são utilizadas em várias partes do mundo, incluído África, Austrália, Israel e América Latina. Estas vacinas são utilizadas devido ao facto de Theiler ter observado que *A. centrale* era menos patogénica que *A. marginale* e que os bovinos infetados com *Anaplasma central* desenvolveram imunidade protetiva contra infeção de *A. marginale* (Kocan *et al.*, 2003). As espécies menos patogénicas de *A. centrale* partilham vários antígenos comuns com *A. marginale*. Após a infeção produz uma doença clínica suave e confere, de forma significativa, um bom nível de proteção cruzada para a subsequente infeção com organismos *A. marginale* virulentos (Wright, 1990). Espera-se que o uso destas vacinas continue até que estejam disponíveis vacinas mais eficientes, especialmente em países como a Argentina, Austrália, Brasil, África do Sul e Uruguai, onde centenas de milhares de doses são vendidas anualmente (Kocan *et al.*, 2003). *A. central* não ocorre na América do Norte e por esse motivo não tem sido utilizada nos Estados Unidos (Kocan *et al.*, 2000). Apesar de todos os pontos positivos deste tipo de vacinas, é esperado que o sucesso da vacinação varie com os génotipos de *A. marginal* que os bovinos vacinados estão expostos (Kocan *et al.*, 2010).

O método de infeção e tratamento foi usado no passado e consiste em infetar bezerros com eritrócitos infetados com *A. marginal* e administrar tetraciclina na fase inicial de aumento da temperatura corporal ou da deteção da parasitémia. Este método requer uma cuidada monitorização dos bovinos por veterinários e não pode ser utilizada em rebanhos muito grandes, tornando este método difícil de praticar (Kocan *et al.*, 2010; Zivkovic, 2010).

Outra técnica para a produção de vacinas consiste em manter bezerros esplenectomizados sob quarentena e inocular experimentalmente estirpes definidas. Os bezerros servem de doadores de sangue infetado (Kocan *et al.*, 2003). Um risco inerente a esta

técnica é a transmissão de outros hemoparasitas através do sangue do dador (Kocan *et al.*, 2010).

Vacinas atenuadas de *A. marginal* são utilizadas na América do Sul e na Califórnia. Estas vacinas produzem também infecções moderadas ou inaparentes e resistência à anaplasmose clínica em bezerros (Kocan *et al.*, 2000). Nestas vacinas, há atenuação de *A. marginale* por irradiação, combinada com a passagem através de veados e ovelhas (Zivkovic, 2010). Estas vacinas podem tornar-se mais virulentas após a passagem sucessiva através dos bovinos ou de carraças (Aubry & Geale, 2010).

1.1.10.3.2. Vacinas inativas ou mortas

As vacinas inativas ou mortas foram desenvolvidas nos Estados Unidos nos anos sessenta. A primeira vacina produzida foi contaminada com membranas das células de bovino, surgindo bezerros que apresentaram anemia hemolítica neonatal, após terem ingerido colostro de mães imunizadas. As vacinas inativas que surgiram posteriormente foram purificadas para remover as células do hospedeiro, no entanto em 1999 foram retiradas do mercado (Kocan *et al.*, 2000)

Estas vacinas apresentam variadas vantagens em relação a outras vacinas, por exemplo: apresentam um baixo risco de contaminação com agentes infecciosos indesejáveis; podem ser armazenadas de forma económica e geralmente provocam reações pós inoculação mínimas. As desvantagens incluem a necessidade de impulsionadores prévios, elevados custos na purificação de *A. marginal* proveniente dos eritrócitos e falta de proteção cruzada entre os isolados de diferentes áreas geográficas separadas. Em adição, a imunidade concedida pelas vacinas mortas é geralmente inferior à das vacinas vivas (Kocan *et al.*, 2010). A extensa purificação, dependência de animais como fonte de antigénios e a necessidade de impulsionadores de imunizações e a dificuldade de padronização contribui para o elevado custo de produção e uso destas vacinas (Kocan *et al.*, 2000).

1.1.10.3.3. Desenvolvimento de vacinas a partir de culturas de células

O crescimento de bactérias em culturas de células de carraças tem sido investigado como fonte alternativa de produção de vacinas de *A. marginale* (Kocan *et al.*, 2003).

O uso deste tipo de vacinas pode evitar problemas associados com as vacinas anteriores derivadas de eritrócitos. Esta técnica tem a vantagem de permitir a inclusão de várias estirpes, facilidade de padronização, ausência de eritrócitos e agentes patogénicos de bovinos e não requer o uso dispendioso de bezerros esplenectomizados (Kocan *et al.*, 2003).

Bovinos imunizados com vacinas derivadas de estirpes de *A. marginal* desenvolvem uma imunidade protetiva e não desenvolvem sinais clínicos de anaplasmoses depois da infecção (Lis, 2014).

Apesar de todas as vantagens do desenvolvimento deste tipo de vacinas e dos progressos introduzidos pela sua utilização, é necessária mais pesquisa para avaliar o efeito das combinações de antígenos recombinantes a fim de melhorar a eficácia da vacina, para conferir proteção contra a infecção com *A. marginale* e bloquear a transmissão biológica do agente patogénico (Kocan *et al.*, 2003). É então necessário que se continuem a realizar ensaios para testar novas formulações e, para futuramente, se definir a eficácia da imunidade e proteção contra *A. marginale* a partir de culturas de células para a produção de vacinas inativas ou mortas (de la Fuente *et al.*, 2002b).

A vacina ideal para anaplasmoses é uma vacina que induza imunidade protetiva e que previna tanto a infecção de bovinos e carraças, como contrarie a capacidade vetorial das carraças (Kocan *et al.*, 2010).

1.2. Cultura de células embrionárias de carraças

Nas últimas décadas foram estabelecidas linhagens de células a partir de várias espécies de carraças (Passos, 2012). O isolamento e propagação nestas células de agentes patogénicos transmitidos por carraças, são uma ferramenta importante para o estudo do ciclo de vida dos parasitas e da interação parasita-hospedeiro, bem como podem representar uma fonte de material antigénico para testes de diagnóstico e para produção de anticorpos e vacinas (Bell, 1984; Bell-Sakyi *et al.*, 2007).

Estes sistemas *in vitro* permitem o estudo da interação entre as células do hospedeiro e o agente patogénico num ambiente controlado, o que anteriormente não estava disponível (Blouin & Kocan, 1998).

As primeiras culturas de células de carraças foram estabelecidas a partir de tecidos das carraças adultas da espécie *Rhipicephalus appendiculatus* (Munderloh *et al.*, 1994). A primeira linhagem de células derivou de ninfas de carraças e posteriormente a maior parte das linhagens de células derivaram de embriões de carraças por serem mais fáceis de processar (Bell-Sakyi *et al.*, 2012).

A maior parte das linhagens de células de carraças foram desenvolvidas a partir de células embrionárias, utilizando uma metodologia simples e sem usar nenhum tipo particular de tecido. As culturas primárias a partir de ninfas (após a remoção dos tecidos do sistema digestivo e excretor) e tecidos de larvas produziram também linhagens de células contínuas.

Desta forma, as culturas de células de carraças são constituídas geralmente por um ou mais tipos de células e esta mistura de células parece ser essencial para a sobrevivência da cultura. As células de carraças não mostram inibição de contacto e a maior parte cresce em três dimensões. Estas células não aderem fortemente, crescendo numa monocamada incompleta e em suspensão. Dividem-se de forma lenta e podem ser mantidas em altos níveis de densidade (10^6 - 10^7 células por mL) e muitas das linhagens não requerem subculturas regulares, tornando-a particularmente adequadas para isolamento de microrganismos com crescimento lento. Algumas das linhagens podem sobreviver muito tempo sem uma mudança regular no meio e subculturas, o que reflete a habilidade das carraças em existir por um longo período na natureza entre as refeições de sangue (Bell-Sakyi *et al.*, 2007).

As células de carraças são normalmente incubadas a temperaturas entre os 28 e os 34°C (Bell-Sakyi *et al.*, 2012).

1.2.1. Isolamento de *A. marginale*

Kessler *et al.* (1979) realizaram uma cultura de *A. marginale* em eritrócitos utilizando um sistema de cultura de sangue total, baseando-se num método com recurso a *Plasmodium sp.* Apesar dos organismos permanecerem viáveis durante vários dias, este sistema não resultou em propagação contínua (Baêta, 2015):

Com o melhor conhecimento do ciclo de vida do parasita nas carraças, foi possível estabelecer posteriormente diversas linhagens de células e inoculações nessas linhagens. Samish *et al.*, (1988) realizaram a primeira tentativa de infeção de uma linhagem de células de carraça utilizando a linhagem RML-15 da espécie de carraça *Dermacentor variabilis*. Os autores observaram diversas estruturas parecidas com *A. marginale* no citoplasma das células, no entanto não conseguiram estabelecer uma linhagem contínua (Baêta, 2015).

O maior avanço foi conseguido com a propagação em linhagens de células de *Ixodes scapularis* IDE8 (Munderloh *et al.*, 1994). A primeira cultura *in vitro* contínua de *A. marginale* foi descrita por Munderloh *et al.*, (1996). Estes inocularam eritrócitos de bovinos infetados em linhagens de células de carraças provenientes da espécie *Ixodes scapularis*, IDE8 (Kocan *et al.*, 2002; Zwegarth *et al.*, 2006).

De acordo com Blouin & Kocan (1998), os níveis de infeção atingem 100% das células da cultura e os organismos são infetantes para carraças e bovinos. Estes autores demonstraram que os organismos das culturas têm um ciclo de desenvolvimento semelhante ao descrito em carraças infetadas naturalmente e as colónias são semelhantes morfológicamente às células de carraças *in vivo*.

A infecção das células IDE8 ocorre 15 minutos após a exposição (PE). A invasão das células do hospedeiro inicia-se com a adesão da forma densa. A adesão entre a bactéria e a membrana da célula da carraça aumenta ao longo da secção, formando uma depressão na membrana da célula do hospedeiro. *A. marginal* é envolvida pela membrana da célula do hospedeiro e interiorizada num vacúolo, transformando-se na forma reticulada, que se divide por fissão binária (figura 7). Quarenta e oito horas PE as colónias contêm centenas de bactérias. Três dias PE as formas reticuladas transformam-se na forma densa (infetante) que contém uma distribuição mais densa e uniforme de ribossomas em que as fibrilhas de DNA ainda não são aparentes. No quarto dia PE, as membranas das colónias fundem-se com as membranas das células das carraças, seguindo-se a rotura do complexo. Ocorre então libertação das formas densas do vacúolo parasitóforo, sem perda do citoplasma das células do hospedeiro. A morte das células das carraças ocorre após a maior parte das células estar infetada, resultando num destacamento das monocamadas das células das carraças e num efeito citopático (Blouin & Kocan, 1998 referido por Kocan *et al.*, 2004).

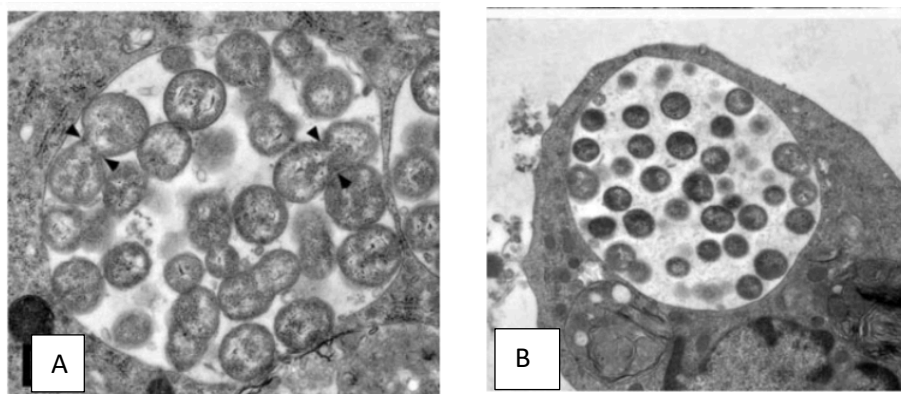


Figura 7: *A. marginale* em cultura de células de carraças IDE8. **A)** Colónias contendo formas reticuladas que se dividem por fissão binária (setas) **B)** Colónia contendo as formas densas (infetante) (Adaptado de Kocan *et al.*, 2004)

É possível congelar as culturas infetadas com *A. marginale* em nitrogénio líquido e posteriormente recuperá-las e usa-las para inocular células não infetadas. Desta forma, células infetadas com *A. marginale* congeladas em nitrogénio líquido, podendo ser utilizadas em stock e como uma amostra permanente do isolado original, no caso de ocorrer variação antigénica durante as passagens seguintes (Blouin *et al.*, 2002).

Apesar de *Ixodes scapularis* não ser uma espécie vetor ou com capacidade vectorial de transmissão de *A. marginale*, as células embrionárias fornecem um ambiente propício ao seu

crescimento e desenvolvimento (Blouin & Kocan, 1998). Vários isolados de *A. marginale* podem ser propagados nas linhagens de células de *Ixodes scapularis* IDE8, o que providencia uma fonte de antígenos para estudos em todo o mundo (Lis, 2014).

A adesão da bactéria às membranas das células de carraças durante a infecção sugere a presença de moléculas de adesão na superfície de *A. marginale*, que são reconhecidas pelos receptores das células das carraças (Kocan *et al.*, 2004). Todas as MSPs identificadas nos eritrócitos infetados com *A. marginale* foram também encontradas nos organismos que cresceram nas culturas de células IDE8. As culturas com isolados de *A. marginale* conservam a identidade antigénica das MSPs tal como determinado pelo peso molecular e sequência da MSP1a (Barbet *et al.*, 1999). MSP1, MSP2, MSP4 e MSP5 mostram ter um valor importante no desenvolvimento de testes de diagnóstico e vacinas para a anaplasmose. A presença das MSP nas culturas infetadas com *A. marginale* sugerem que estas podem servir de fonte de *A. marginale* com importância para aplicação em pesquisa (Barbet *et al.*, 1999).

Mais recentemente Munderloh *et al.* (2004) demonstrou a infecção e propagação de *A. marginale* em células endoteliais de bovinos, o que poderá oferecer novas oportunidades para o estudo das interações entre hospedeiros vertebrados e agentes patogénicos (Kocan *et al.*, 2010).

1.2.1.1. Meios de cultura para as células de carraças

O meio de cultura varia consoante a linhagem de células. A maior parte das linhagens crescem num meio basal composto parcialmente ou somente por meio Leibovitz's L-15, suplementado com caldo de triptose fosfato (TPB), sêrum fetal bovino (SFT) e por vezes com sêrum de albumina bovino (Kurtii *et al.*, 1982). O sêrum é o suplemento mais comum que tem sido utilizado na formulação dos meios para as culturas de célula para iniciar culturas de vertebrados e invertebrados (Najm, 2012).

O meio L15 foi modificado pela adição de minerais, vitaminas, aminoácidos, ácido cetoglutárico e glucose, que não estão presentes no meio L15. Este meio passou a ser referido como L15B (Munderloh & Kurtii, 1985). A formulação dos meios de cultura L15 e L15B está descrita na tabela 4.

Através da utilização de linhagens de células de carraças das espécies *Rhipicephalus appendiculatis* e *Rhipicephalus sanguineus*, ambos os suplementos SFB e TPB mostraram ser essenciais nas concentrações de 20 e 10%, respetivamente, para o crescimento das células (Najm, 2012).

Apesar da suplementação substancial dos meios, muitas das células crescem devagar com tempos de duplicação da população de cerca de quatro a sete dias e as sub-culturas são iniciadas habitualmente com uma densidade celular elevada (Kurtti *et al.*, 1982).

Tabela 4: Formulação dos meios de cultura Leibovitz's L15 e L15B para 100 mL

Componente	Meios	
	L15 (Leibovitz, 1963)	L15B (Munderloh & Kurtti, 1989)
Meio L15 incompleto	70 mL	-
Meio L15B incompleto	-	85 mL
TPB	10 mL	10 mL
SFB	20 mL	10 mL
L-glutamina 200nM	1 mL	1 mL
Lipoproteína bovina 10% em L15B	-	1 mL
Penicilina (10000 UI) e Estreptomicina (10 mg/mL)	1 mL	1 mL

1.2.2. Linhagens de células de carraças disponíveis na atualidade

Em 2009 foi criado um Biobanco de Células de Carraças (*"The Tick Cell Biobank"*) que pertence ao Institute of Infection and Global Health da Universidade de Liverpool com vista a facilitar o desenvolvimento e compreensão destes recursos. Além de ser um repositório de todas as linhagens de células de ixodídeos e argasídeos existentes, este banco fornece linhagens de células e programas de treino para investigadores em todo o mundo e concebe novas culturas a partir de espécies de carraças que ainda não estão na coleção. Atualmente estão disponíveis 63 linhagens de células que derivam de 18 espécies de ixodídeos e argasídeos e dos mosquitos de areia *Lutzomyia longipapisi* e de *Culicoides sonorensis* (tabela 5) (Bell-Sakyi *et al.*, 2018).

Independentemente da espécie e laboratório de origem, as linhagens de células de carraças partilham características, algumas das quais evidenciam as diferenças entre as

linhagens de células de vertebrados e de insetos. Em particular, ambas são geneticamente e fenotipicamente heterogêneas, sendo derivadas de múltiplos indivíduos. A maior parte destas culturas podem ser mantidas com mudanças semanais do meio durante vários meses ou anos. Apesar da criopreservação ser desafiante, as células de ixodídeos podem ser congeladas e descongeladas, mantendo-se viáveis depois de vários anos em nitrogênio líquido (Bell-Sakyie *et al.*, 2018).

Tabela 5: Linhagens de células de carraças atualmente disponíveis no Biobanco de Células de Carraças (Adaptado de Bell-Sakyi *et al.*, 2018)

Espécie de carraça	Origem geográfica	Linhagem
<i>Amblyomma americanum</i>	USA	AAE2, AAE12
<i>Amblyomma variegatum</i>	Southern Africa	AVL/CTVM13, AVL/CTVM17
<i>Carios capensis</i>	USA	CCE1, CCE2
<i>Dermacentor albipictus</i>	USA	DALBE3
<i>Dermacentor andersoni</i>	USA	DAE15, DAE100T
<i>Dermacentor nitens</i>	USA	ANE58
<i>Dermacentor variabilis</i>	USA	DVE1
<i>Hyalomma anatolicum</i>	India	HAE/CTVM8, HAE/CTVM9
<i>Ixodes ricinus</i>	UK	IRE/CTVM19, IRE/CTVM20
	Germany	IRE11
<i>Ixodes scapularis</i>	USA	IDE2, IDE8, ISE6, ISE18
<i>Ornithodoros moubata</i>	East Africa	OME/CTVM21, OME/CTVM22, OME/CTVM24, OME/CTVM27
<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	East Africa	RA243, RA257
	Kenya	RAE25, RAE/CTVM1, RAN/CTVM3
<i>Rhipicephalus decoloratus</i>	Kenya	BDE/CTVM14, BDE/CTVM16
<i>Rhipicephalus evertsi</i>	South Africa	REE/CTVM28, REE/CTVM29, REE/CTVM31, REN/CTVM32
<i>Rhipicephalus microplus</i>	Mexico	BmVIII-SCC
	Costa Rica	BME/CTVM2, BME/CTVM4
	Colombia	BME/CTVM5, BME/CTVM6
	Mozambique	BME/CTVM23, BME/CTVM30
<i>Rhipicephalus sanguineus sensu lato</i>	USA	RSE8, RML-RSE, RML-15*
	France	RSE/PILS35**

1.2.3. Vantagens das culturas de células de carraças

Os sistemas de cultura em células de carraças têm sido utilizados em vários estudos, para análises morfológicas, genéticas, proteômicas e estudos diferenciais entre isolados, permitindo a comparação entre as células dos hospedeiros e dos vetores. Constituem por isso uma nova abordagem para melhor entender as relações entre os agentes patogênicos e as células das carraças (Passos, 2012).

A compreensão do processo de invasão e desenvolvimento de *A. marginale* nas culturas de células foi necessária antes da realização de estudos de vários tratamentos, tais

como o efeito dos anticorpos neutralizantes nos agentes quimioterápicos (Blouin & Kocan, 1998).

O desenvolvimento continuado e a constante reinfeção nos sistemas de culturas de células infetadas com *A. marginale* fornece um sistema que permite o acompanhamento do progresso da infeção e do desenvolvimento em qualquer altura. A definição da morfologia e desenvolvimento de *A. marginal* nas culturas de células pode fornecer informações sobre a biologia da bactéria no vetor. Além disso, fornece também um meio de estudo em que podem ser avaliados os efeitos imunológicos e outros agentes do desenvolvimento (Blouin & Kocan, 1998). *A. marginale* pode ser utilizada em sistemas de linhagens de células como material antigénico, testes de diagnóstico ou para ensaios de imunização. As preparações de antigénios são úteis como ferramentas de diagnóstico, podendo ser aplicadas em testes de diagnóstico como por exemplo nos testes IFI, ELISA, CF. (Baêta, 2015).

A disponibilidade de culturas de isolados, particularmente isolados de campo, pode melhorar o uso de sistemas de cultura com uma fonte de antigénios (Blouin *et al.*, 2000).

Com a disponibilidade de ferramentas genómicas, as linhagens de células de carraças têm ganho cada vez mais importância nos estudos *in vivo* de carraças e doenças transmitidas por estas, já que a transformação genética e o silenciamento de genes utilizando RNA têm-se tornado uma rotina (Bell-Sakyi *et al.*, 2007).

Importante referir que estes sistemas contribuem para a redução do uso de animais de experimentação, uma vez que permitem a produção de grandes quantidades de material antigénico sem o uso de sistemas específicos *in vivo* (Passos, 2012).

2. Materiais e Métodos

Este estudo compreendeu duas metodologias para o isolamento e propagação de *A. marginale* em culturas *in vitro* de linhagens de células embrionárias de carraças: a partir de sangue e a partir de carraças recolhidas em dois bezerros, Vaca e Gordo (figura 8), infetados experimentalmente com as estirpes AmRio1 e AmRio2 de *A. marginale*. Estas estirpes foram isoladas por *Baêta et al.* (2015), sendo obtidas através de sangue recolhido de bovinos naturalmente infetados com *A. marginale* pertencentes à Universidade. Estes animais são mantidos para estudos no Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) da UFRRJ, em condições aprovadas pelo Comité de Ética da Universidade.



Figura 8: Bezerros utilizados no estudo (Esquerda: Vaca; Direita: Gordo).

Os bezerros Vaca e Gordo, infetados experimentalmente com as estirpes AMRio1 e AMRio2 de *A. marginale*, pertencem ao LDP como animais dadores de sangue para estudo. No dia em que se realizou a colheita de sangue dos animais, apenas o bezerro Gordo apresentava sintomatologia associada a anaplasmose. O animal apresentava as mucosas oral e ocular pálidas, como mostra a figura 9.

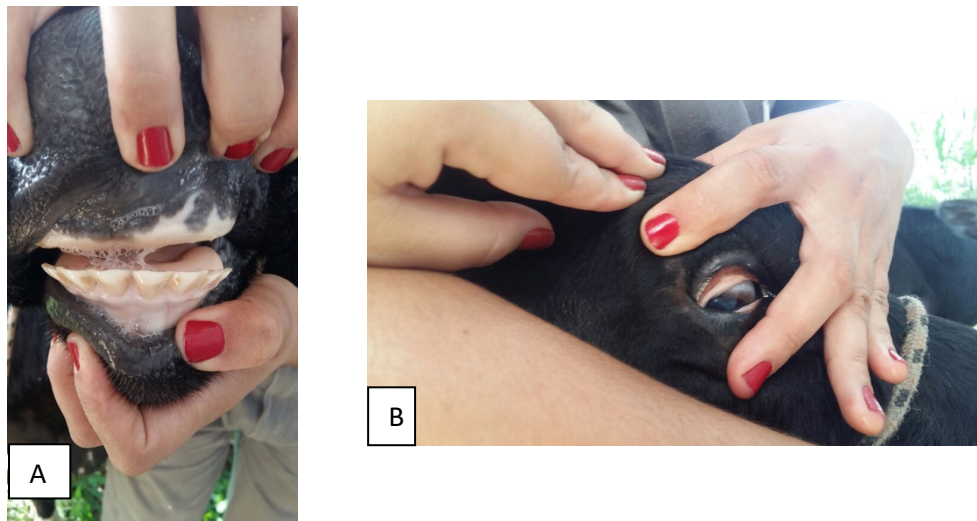


Figura 9: Mucosas pálidas do bezerro Gordo. **A)** Mucosa oral **B)** Mucosa ocular

As linhagens de células embrionárias das carraças são mantidas em frascos de cultura de 25 cm². Foi utilizada uma linhagem de células de carraças para a realização do estudo provenientes de embriões de *Ixodes scapularis*, IDE8 (tabela 6), que apesar de não ser vetor biológico de *A. marginale*, permite o desenvolvimento desta (Blouin & Kocan, 1998). A linhagem IDE8 disponível no LDP pertence ao Biobanco de Células de Carraças, gentilmente cedidas pela Dra. Leslie Bell-Sakyi (provenientes do Institute of Infection and Global Health da Universidade de Liverpool) para a realização de diversos estudos no laboratório. Esta é uma linhagem contínua de células embrionárias da espécie *Ixodes scapularis* que foi estabelecida em 1994 e é mantida em meio L15B, com pH próximo de 7,2 e com a suplementação descrita na tabela 4 (Bastos *et al.*, 2007). Não foram usados antibióticos nas culturas pois estes podem interferir na invasão inicial, bem como na propagação dos organismos de células em célula (Cory *et al.*, 1974).

Os frascos de células IDE8 não infetadas são mantidos no laboratório, em estufa, a 34°C. São realizadas sub-culturas das células quando atingem uma densidade celular elevada de aproximadamente 5 x 10⁶ células por mL (Blouin *et al.*, 2000). O meio é trocado semanalmente, o que permite a adesão e multiplicação das células para o seu dobro, em três a cinco dias (Munderloh *et al.*, 1996).

O acompanhamento do desenvolvimento das células é realizado a partir da visualização direta das culturas em microscópio ótico invertido (Olympus®) (figura 10). Todos os procedimentos são realizados em câmara de fluxo para evitar contaminação e garantir a maior assepsia possível dos materiais utilizados.

Tabela 6: Linhagem de células de carrças utilizadas no estudo

Linhagem de células de carrça	Espécie de carrça	Meio de cultura	Temperatura de incubação	Origem	Instar	Referência
IDE8	<i>Ixodes scapularis</i>	L15B	30° C	Estados Unidos da América	Embrião	Munderloh <i>et al.</i> , 1994

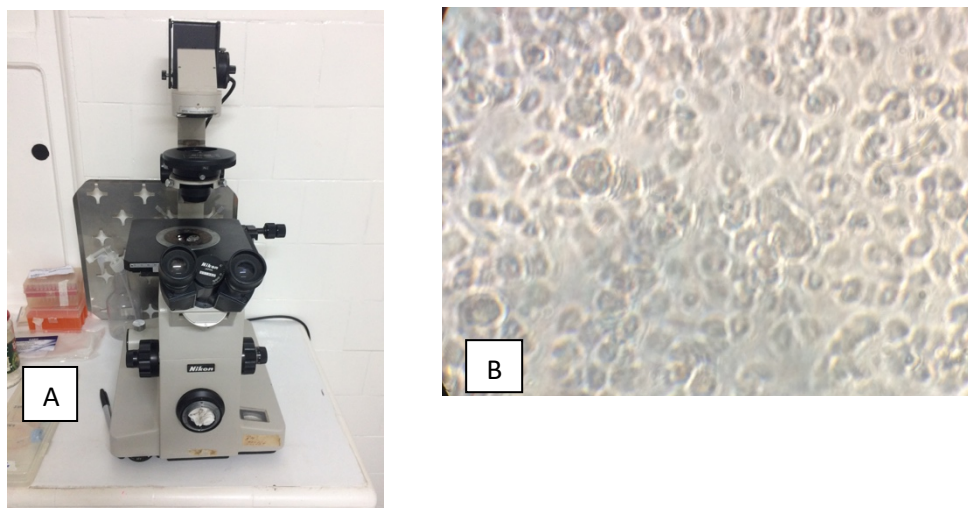


Figura 10: A) Microscópio óptico invertido B) Células IDE8 visualizadas em microscópio invertido

2.1. Isolamento e propagação a partir de amostras de sangue

As amostras de sangue dos animais usados para o estudo (bezerros Gordo e Vaca) recolhidas da veia jugular, a vácuo, em sistema vacuntainer® com Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA). No momento de colheita, apenas o bezerro Gordo apresentava sintomatologia clínica. O bezerro Vaca não apresentavam sintomatologia clínica, provavelmente devido a apresentar baixa parasitêmia.

Na tentativa de isolamento e propagação de *A. marginale* a partir de amostras de sangue, foram realizadas três técnicas distintas, descritas seguidamente.

2.1.1. Técnicas de isolamento de *A. marginale*

2.1.1.1. Cultura em células IDE8 a partir da técnica de lise de eritrócitos

Esta técnica foi realizada segundo a metodologia descrita por Blouin *et al.* (2000) para o isolamento de *A. marginale*, com as modificações descritas de seguida. A amostra de sangue para a realização desta técnica pertence ao bezerro Vaca.

A amostra de sangue foi colocada num tubo que foi centrifugado durante dez minutos a 582 G. Após centrifugação, as células brancas são removidas com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e os eritrócitos são lavados com tampão fosfato salino (PBS) e centrifugados mais duas vezes à velocidade e tempo descritos anteriormente. Após a última centrifugação, o sobrenadante é desprezado e o “pellet” formado é ressuspensão em criotubos na proporção 1:1 em meio Leibovitz's - L15B com DMSO a 10%. Os criotubos são congelados a -80°C.

Quarenta e oito horas depois, os tubos são descongelados em banho-maria a 37°C. São ressuspensos em meio Leibovitz's - L15B e centrifugados durante dez minutos a 5241 G. O “pellet” formado após centrifugação é ressuspensão em meio Leibovitz's-L15B com ácido hidroxietil piperazinoetanossulfónico (HEPES). A amostra é inoculada em frascos de 25 cm² contendo células IDE8 e incubados a 34°C (figura 11A).

2.1.1.2. Cultura em células IDE8 a partir da técnica das células brancas

Para a realização desta metodologia foi utilizada uma amostra de sangue do bezerro Vaca.

A amostra de sangue recolhida é colocada num tubo onde é adicionado PBS. O tubo é centrifugado durante dez minutos, a 582 G. Após a centrifugação, retira-se o sobrenadante e a capa leucocitária é removida com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e colocada num novo tubo. Nesse tubo, são adicionados 9 mL de água ultra pura e 1mL de HBSS (Hanks's Balanced Salt Solution), este último adicionado com o objetivo de restabelecer a osmolaridade.

O tubo é centrifugado durante 8 minutos a 327 G. Após centrifugação, o sobrenadante é descartado e o “pellet” formado é ressuspensão em meio Leibovitz's-L15B com HEPES e colocado em frascos com células IDE8 (figura 11B) e colocados na estufa a 37°C.

2.1.1.3. Cultura em células IDE8 a partir da técnica utilizando Histopaque®

A amostra de sangue recolhida para a realização desta metodologia pertence ao bezerro Gordo. Esta metodologia foi realizada segundo a metodologia descrita por Blouin *et al.*

(2000) para o isolamento de *A. marginale*, com as modificações descritas seguidamente e adotadas pelo LDP como técnica de rotina.

O sangue é colocado num tubo, onde é adicionado HBSS até perfazer 10 mL. O tubo é centrifugado durante dez minutos a 327 G. Após a centrifugação, o sobrenadante é descartado utilizando uma pipeta de Pasteur e são adicionados mais 3 mL de HBSS e homogeneiza-se. O conteúdo desse tubo é adicionado, muito lentamente, a um tubo com 3 mL de Histopaque®. O tubo é centrifugado durante vinte minutos a 1746 G. O Histopaque® é uma solução de polissacarose e diatrizoato de sódio que tem o objetivo de separar as densidades celulares, separando os eritrócitos das células mononucleadas. Desta forma, após centrifugação, obtêm-se os eritrócitos no fundo do tubo e a camada de células mononucleares suspensas. Com uma pipeta de Pasteur é retirada a camada de células mononucleadas para um novo tubo e são adicionados 10 mL de HBSS. Este tubo é centrifugado durante sete minutos a 436 G. Após centrifugação, o sobrenadante é desprezado, adicionam-se 5 mL de HBSS e realiza-se nova centrifugação durante cinco minutos, a 436 G. No final desta centrifugação, o sobrenadante é descartado e o pellet obtido é ressuspensão em meio L15B com HEPES e colocado em frascos com células IDE8 (figura 11C). Os frascos são colocados na estufa a 37°C.

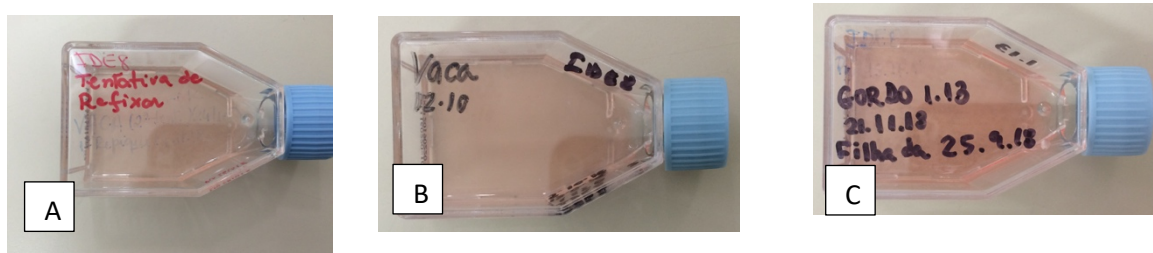


Figura 11: Culturas em células IDE8 **A)** Técnica da lise dos eritrócitos **B)** Técnica das células brancas **C)** Técnica utilizando Histopaque®

2.1.2. Monitorização das culturas infetadas

Os frascos inoculados são incubados na estufa a 37°C e a primeira troca de meio é realizada 24 horas após a inoculação, retirando-se todo o meio. As trocas subsequentes são realizadas semanalmente, retirando cerca de 60% de meio para o isolamento de *A. marginale* (Munderloh *et al.*, 1994).

À medida que as células começam a ser infetadas pelas bactérias, observa-se um destacamento das células da parede dos frascos, visível por exame visual direto das paredes. Assim, as células infetadas ficam em suspensão no meio de cultura, sendo possível, através da realização das lâminas cito-centrifugadas, visualizar as células infetadas em microscópio e desta forma acompanhar a infeção. Estas lâminas são obtidas através de amostras das

culturas de IDE8, pela centrifugação durante cinco minutos em Cytospin® de cerca de 50 µL de suspensão das células. As lâminas são fixadas durante cinco minutos com metanol, coradas durante vinte e cinco minutos com Giemsa a 10% e observadas no microscópio ótico (1000x).

Quando as células atingem a confluência com formação de uma monocamada na parede dos frascos, realizam-se sub-culturas destas para outros frascos de cultura. As sub-culturas são realizadas quando a monocamada corresponde a uma densidade celular de aproximadamente 5×10^6 células por mL (Blouin *et al.*, 2000). As sub-culturas são realizadas retirando-se cerca de 500 µL da cultura e ressuspendendo-se em novos frascos de células IDE8, com meio L15B com HEPES. Desta forma é possível propagar a cultura inicial ou primária.

2.1.3. Extração de DNA e amplificação por PCR

A partir de amostras das culturas de IDE8 inoculadas, é possível fazer extração de DNA e seguida amplificação por PCR para confirmar o agente responsável pela infecção das células (Bastos *et al.*, 2009).

O DNA é extraído a partir de 300 µL da cultura utilizando o Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), segundo as instruções do fabricante.

Foi realizada *semi-nested* PCR em que os produtos amplificados na primeira reação de PCR são utilizados para uma segunda reação, aumentando assim a sensibilidade do teste. Foi utilizado o gene *msp5* como primer uma vez que este é altamente conservado entre os diferentes isolados de *A. marginale* (Lis, 2014).

Os controlos negativos utilizados foram duas amostras de água destilada: uma colocada durante a preparação dos reagentes dentro da câmara de fluxo e outra colocada fora da câmara de fluxo. O controlo positivo para a amplificação do gene *msp5* foi DNA pertencente a um animal naturalmente infetado com *A. marginale*.

A mistura para a primeira reação compreendeu 2 µL de Deoxinucleótido Trifosfato (dNTP), 5 µL de tampão, 1,5 µL de cloreto de magnésio, 12,3 µL de água ultra-pura, 1 µL de primers e 0,2 µL de Taq polimerase. Foi adicionado no final 3 µL da amostra de DNA, perfazendo um total de 25 µL de volume final. Para a segunda reação, foram usados 2 µL de dNTP, 5 µL de tampão, 1,5 µL de cloreto de magnésio, 13,3 µL de água ultra-pura, 1 µL de primers e 0,2 µL de Taq polimerase e no final foram adicionados 2 µL do amplificado obtido na primeira reação (tabela 7).

A amplificação foi realizada na BioRad T100°C Thermal Cycler, segundo as condições descritas seguidamente: desnaturação inicial durante cinco minutos a 94°C seguida de trinta e

quatro ciclos de desnaturação durante um minuto a 94°C, anelamento durante um minuto a 58°C e extensão durante um minuto a 72°C, com uma extensão final a 72°C durante dez minutos (figura 12).

Após amplificação, o resultado foi separado por eletroforese em agarose a 1% durante cinquenta minutos a 75 Volts, corado com brometo e visualizado em luz ultra-violeta.

Tabela 7: Volume dos reagentes para as reações PCR

Reagentes	1ª Reação	2ª Reação
Água ultra-pura	12,3 µL	13,3 µL
Tampão	5 µL	5 µL
Cloreto de Magnésio	1,5 µL	1,5 µL
dNTPs	2 µL	2 µL
Primers	1 µL	1 µL
Taq polimerase	0,2 µL	0,2 µL
Amostra de DNA	3 µL	2 µL
Total	25 µL	25 µL

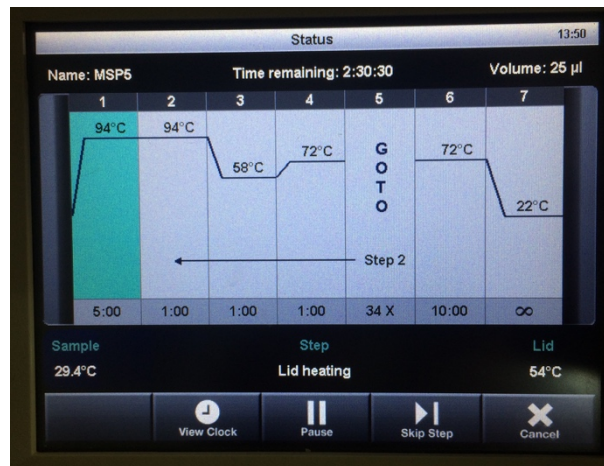


Figura 12: Ciclo das reações PCR na BioRad T100°C Thermal Cycler

2.2. Isolamento e propagação a partir de carraças

As carraças utilizadas nesta metodologia para isolamento e propagação de *A. marginale* foram recolhidas no bezerro Gordo, diretamente da cabeça e dorso do animal, com o auxílio de uma pinça.

Após colheita, as carraças são guardadas numa caixa de Petri (figura 13) e mantidas em jejum, na estufa a 37°C, durante quatro dias.

As metodologias de lavagem, macerado e isolamento em frascos de culturas com células IDE8 descritas em seguida são adaptadas das descritas por Yunker & Meibos (1979).



Figura 13: Carraças recolhidas do bezerro Gordo e armazenadas numa caixa de Petri

2.2.1. Lavagem das carraças

Antes de iniciar o isolamento em frascos de cultura de células IDE8, as carraças são lavadas em câmara de fluxo para esterilização das suas superfícies.

As carraças são lavadas em várias etapas, em que cada uma das etapas tem a duração de um minuto: lavagem com álcool a 70%; com hipoclorito de sódio; com clorohexidina e no final com água ultrapura estéril com adição de 1 mL penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 1 ng/mL e com 0,5 mL do antifúngico anfotericina B.

2.2.2. Macerado das carraças e isolamento em frascos de cultura com células IDE8

Após a lavagem das dez carraças recolhidas, estas são divididas em três copos de Becker diferentes. A cada copo é adicionado 2 mL de meio de cultura L15B com HEPES. É realizado o macerado através do esmagamento das carraças com o auxílio de um êmbolo de uma seringa de vidro. Após o esmagamento, retiram-se 2 mL da parte líquida do macerado, desprezando as partes sólidas, e coloca-se em frascos de cultura com células IDE8, enumerando-se os frascos de um a três (figura 14). A estes frascos adicionam-se 2 mL de meio L15B com HEPES. Os frascos são colocados na estufa a 37°C (Yunker & Meibos, 1979).

A primeira troca do meio de cultura é realizada vinte e quatro horas depois, retirando-se todo o meio. As mudanças de meio subsequentes são realizadas duas vezes por semana, retirando-se aproximadamente 60% do meio de cultura (Munderloh *et al.*, 1994).

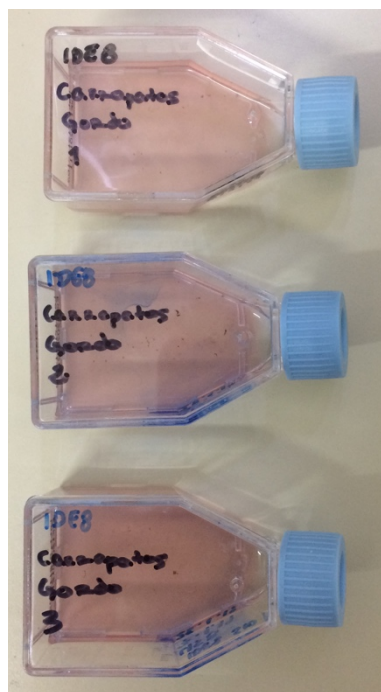


Figura 14: Culturas em células IDE8 a partir do macerado das carraças recolhida

2.2.3. Monitorização das culturas de macerado

À semelhança das culturas a partir de sangue, os frascos são incubados na estufa a 34°C e a primeira troca de meio é realizada 24 horas após a inoculação, retirando-se todo o meio. As trocas subsequentes são realizadas semanalmente, retirando cerca de 60% de meio.

O controlo da infeção é realizado de acordo com o descrito para as culturas a partir de sangue.

2.2.4. Extração de DNA e amplificação por PCR

A partir de amostras das culturas de IDE8 inoculadas a partir do macerado das carraças, é possível fazer extração de DNA seguida de amplificação por PCR, para confirmar o agente responsável pela infeção das células IDE8.

A extração de DNA e a seguida amplificação por PCR é idêntica à descrita anteriormente para as culturas obtidas através de sangue.

..

3. Resultados

3.1. Isolamento e propagação a partir de amostras de sangue

3.1.1. Cultura em células IDE8 a partir da técnica de lise de eritrócitos

Após quinze dias de cultura realizou-se a primeira lâmina cito-centrifugada a partir da cultura dos frascos de cultura da técnica de isolamento a partir da lise de eritrócitos. Nesta lâmina não foram visualizadas formas suspeitas no interior das células IDE8.

Nestes frascos verificou-se um destacamento das células da parede dos frascos, que é um sinal de infecção das células da cultura. Apenas aos setenta e cinco dias de cultura foi possível visualizar inclusões suspeitas no interior das células IDE8. Visualizaram-se mórulas no interior das células IDE8 (figura 15).

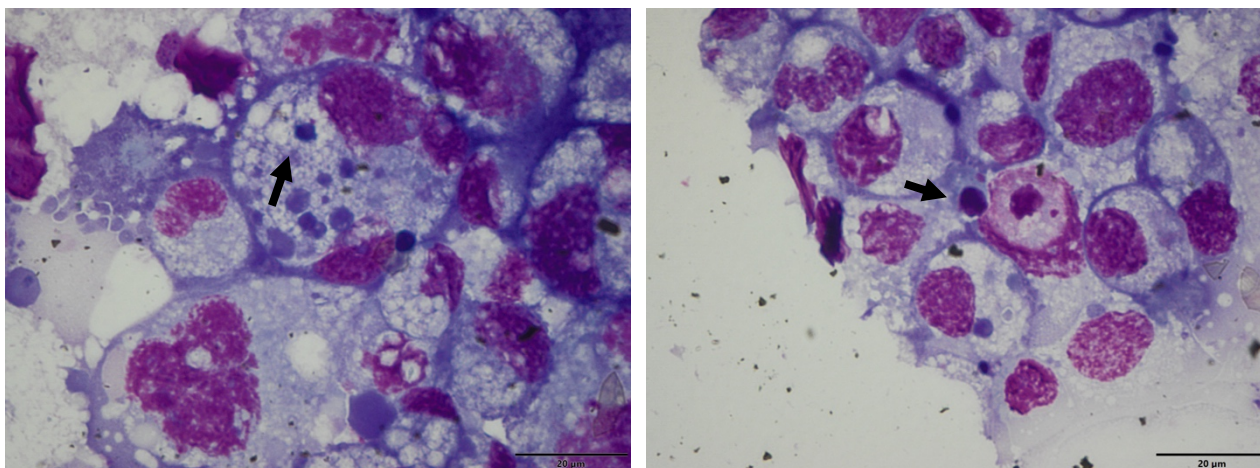


Figura 15: Lâmina cito-centrifugada da cultura com setenta e cinco dias. As setas indicam as mórulas presentes no interior das células IDE8.

3.1.2. Cultura em células IDE8 a partir da técnica das células brancas

Nos frascos onde se realizou a técnica a partir das células brancas, não se observou destacamento das células da parede dos frascos de cultura pelo que não terá havido infecção das células.

3.1.3. Cultura em células IDE8 a partir da técnica com Histopaque®

Após sete dias de cultura, a partir de lâminas cito-centrifugadas, foram visualizadas no interior das células IDE8 algumas inclusões suspeitas (figura 16). Nesta lâmina foi possível visualizar eritrócitos remanescentes, nos quais se observava *A. marginale*.

Após quinze dias, as células IDE8 apresentavam algumas inclusões suspeitas (Figura 17). Aos vinte e cinco dias de cultura, algumas das células IDE8 apresentavam-se vacuolizadas, observando-se vacúolos no interior das células contendo colônias suspeitas (figura 18). Aos trinta e cinco dias de cultura, visualizou-se o crescimento de colônias nas células IDE8. Aos quarenta e cinco dias, as células IDE8 apresentavam colônias de bactérias de grandes dimensões que provocaram compressão e deslocação do núcleo das células (figura 19A). A formação das colônias foi seguida do rompimento das membranas vacuolares, libertando as bactérias para o meio de cultura figura (19B).

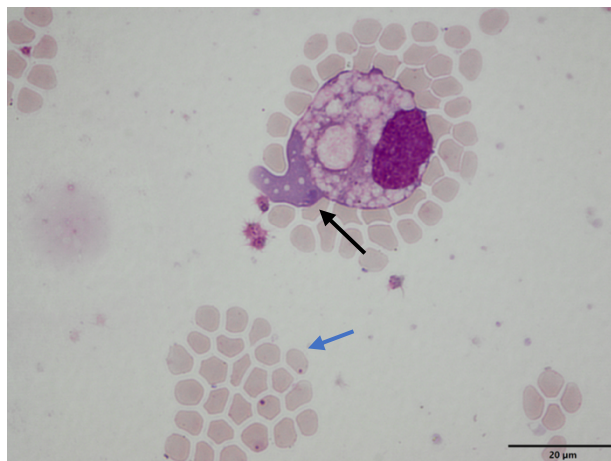


Figura 16: Lâmina cito-centrifugada da cultura com sete dias. A seta preta indica as inclusões suspeitas no interior das células IDE8 e a seta azul indica *A. marginale* no interior dos eritrócitos remanescentes

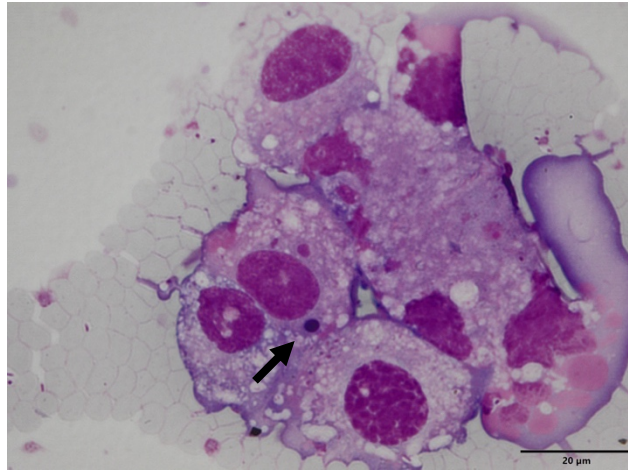


Figura 17: Lâmina cito-centrifugada da cultura com quinze dias. A seta preta indica as inclusões suspeitas no interior das células IDE8

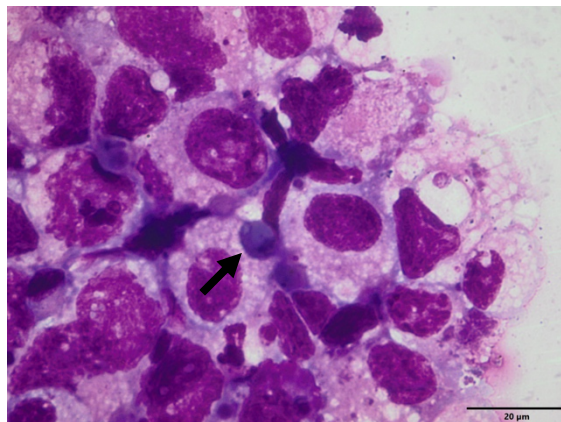


Figura 18: Lâmina cito-centrifugada da cultura com vinte e cinco dias. A seta preta indica os vacúolos no interior das células IDE8

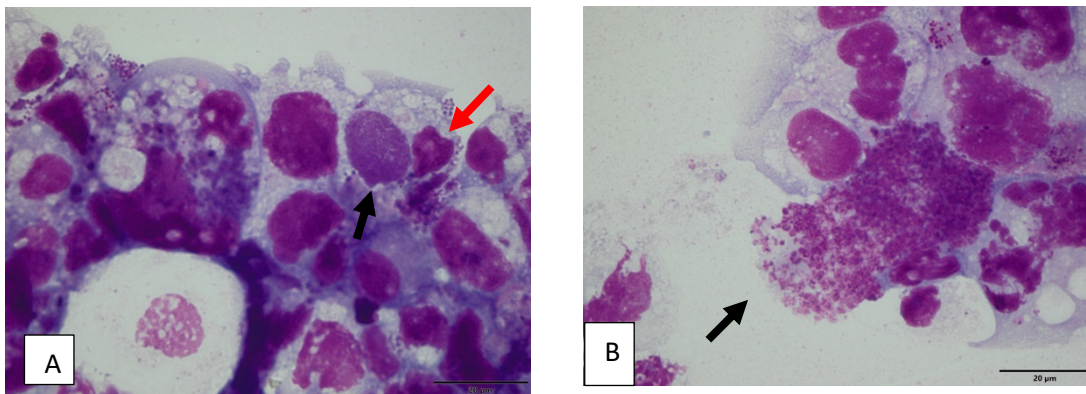


Figura 19: Lâmina cito-centrifugada da cultura com quarenta e cinco dias. **A)** A seta preta indica as colónias de bactérias com compressão do núcleo das células IDE8 (seta vermelha) **B)** A seta indica as bactérias soltas na cultura após rotura dos vacúolos

3.1.4. Resultados da amplificação do DNA extraído às culturas por PCR

A partir de amostras das culturas de IDE8 inoculadas extraiu-se DNA e de seguida amplificou-se por PCR para confirmar o agente responsável pela infeção das células.

Foi realizado PCR a amostras de DNA recolhidas dos frascos das culturas de IDE8 inoculadas a partir da técnica de lise de eritrócitos e a partir da técnica com Histopaque®. Os frascos resultantes da tentativa de isolamento de *A. marginale* recorrendo à técnica de células brancas não apresentaram resultados e por esse motivo, não foi realizada extração de DNA e amplificação por PCR.

3.1.4.1. Resultados do PCR da cultura obtida pela técnica da lise de eritrócitos

A extração de DNA do frasco da cultura inoculada resultante da técnica de lise de eritrócitos, foi realizada trinta dias após a cultura, juntamente com a amostra do sangue do bezerro Vaca.

O resultado para a presença *A. marginale* através do gene *msp5* foi negativo para a amostra da cultura inoculada e positivo para o sangue do animal. Na eletroforese são visíveis várias bandas referentes ao peso molecular (PM), controlo positivo e negativo, amostra de

sangue e amostra proveniente da cultura, sendo o resultado positivo demonstrado pelo aparecimento de uma banda, como demonstra a figura 20.

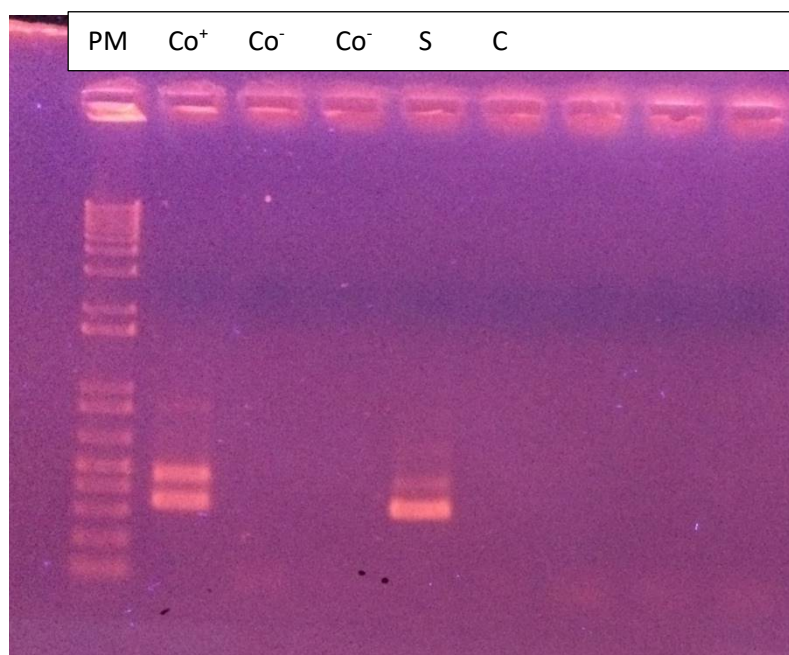


Figura 20: Resultado da eletroforese obtida através das reações de PCR. **Legenda:** PM – peso molecular; Co⁺ - controlo positivo; Co⁻ - controlo negativo; S – amostra de sangue; C – amostra da cultura

3.1.4.2. Resultados do PCR da cultura obtida pela técnica com Histopaque®

A extração de DNA do frasco da cultura inoculada resultante da técnica com Histopaque® foi realizada quarenta e cinco dias após a cultura, juntamente com a amostra do sangue do bezerro Gordo. O resultado para a presença *A. marginale* através do gene *msp5* foi positivo para a amostra da cultura inoculada e positivo para o sangue do animal. Os resultados da eletroforese apresentam-se na figura 21, confirmando-se ser positivo através do aparecimento de bandas nas culturas (C¹, C² e C³) e no sangue (S).

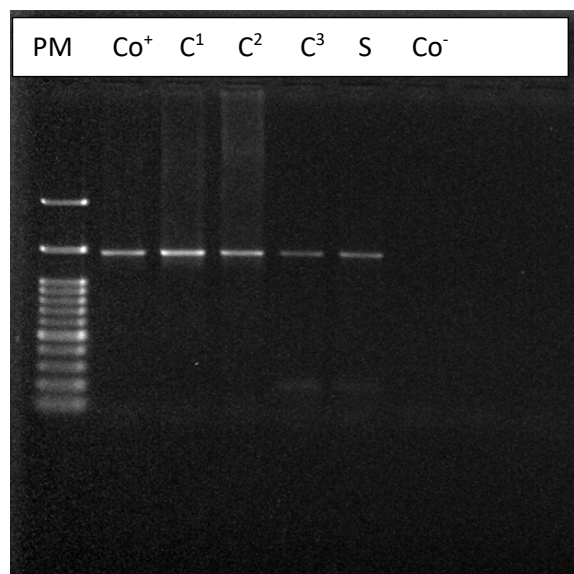


Figura 21: Resultado da eletroforese obtida através das reações de PCR. **Legenda:** PM – peso molecular; Co⁺ - controlo positivo; C¹, C², C³ – amostras da cultura; S – amostra de sangue; Co⁻ – controlo negativo

3.2. Isolamento e propagação a partir de carraças

Quarenta e oito horas após o isolamento o frasco 2 apresentou um destacamento total das células da parede, o que poderá ter sido provocado pela reação das células IDE8 ao macerado. Nesse frasco, foi repetido o procedimento de centrifugação e ressuspensão em meio L15 com HEPES num novo frasco de células IDE8. Os restantes frascos apresentaram as células aderentes à parede dos frascos.

Sete dias após o isolamento foi observável no frasco 3 algum destacamento das células. Realizou-se uma lâmina cito-centrifugada (figura 22), onde foram observadas células vacuolizadas com algumas inclusões suspeitas.

Nas lâminas cito-centrifugadas realizadas nas semanas seguintes, não foram visualizadas alterações significativas, para além das já observadas no frasco 3 sete dias após o isolamento.

Sessenta dias após o isolamento observou-se um maior destacamento das células no frasco 3. Na lâmina cito-centrifugada realizada com uma amostra retirada deste frasco, foram observadas algumas colónias suspeitas (figura 23).

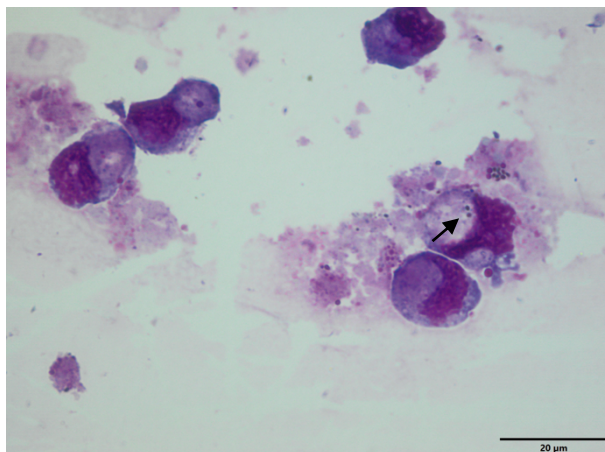


Figura 22: Lâmina cito-centrifugada da cultura do frasco 3 sete dias após o isolamento. A seta indica as inclusões suspeitas no interior das células IDE8

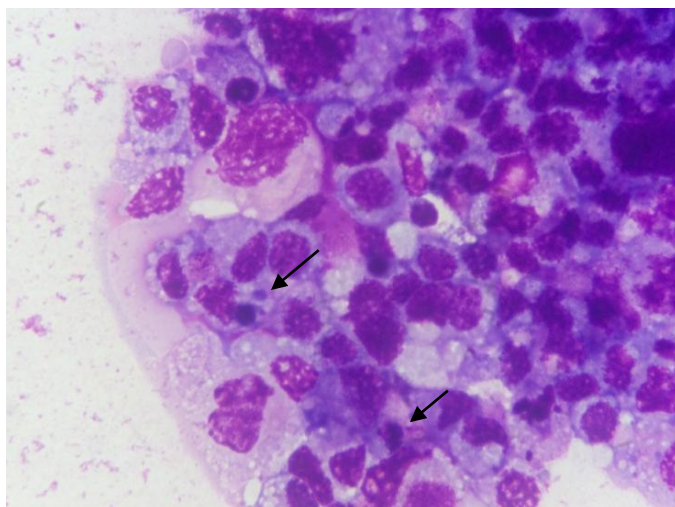


Figura 23: Lâmina cito-centrifugada da cultura do frasco 3 sessenta dias após o isolamento. As setas indicam colónias suspeitas no interior das células IDE8

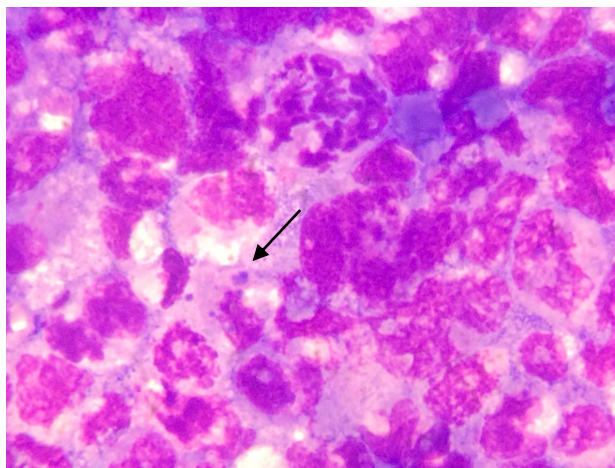


Figura 24: Lâmina cito-centrifugada da cultura do frasco 3 cem dias após o isolamento. As setas indicam colónias suspeitas no interior das células IDE8

3.2.1. Resultados da amplificação do DNA extraído às culturas por PCR

O único frasco de cultura onde se verificou presença de infeção foi no frasco 3, onde se verificou destacamento de células da parede dos frascos. Para se verificar que a infeção das células da cultura deste frasco foi provocada por *A. marginale*, foi realizada extração de DNA. A extração de DNA do frasco da cultura de carraças foi realizada setenta e cinco após a cultura, juntamente com a amostra do sangue do bezerro Gordo e as amostras das culturas obtidas através da técnica de Histopaque®. Os resultados da eletroforese apresentam-se na figura 25.

O resultado para a presença *A. marginale* através do gene *msp5* foi negativo para a amostra da cultura de carraças e positivo para o sangue do animal, bem como para a técnica com Histopaque®, já demonstrado na figura 21.

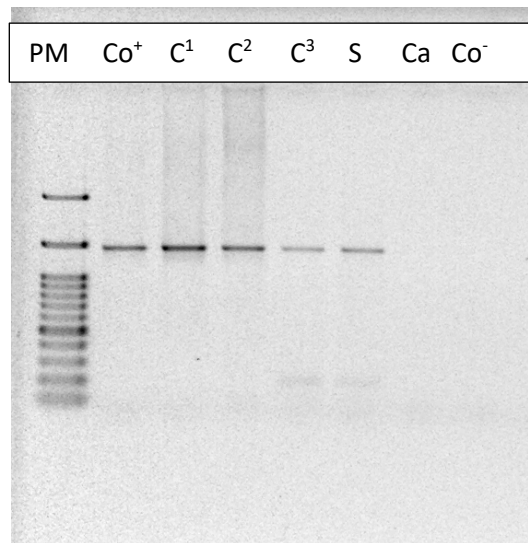


Figura 25: Resultado da eletroforese obtida através das reações de PCR. **Legenda:** PM – peso molecular; Co⁺ - controlo positivo; C¹ , C², C³ – amostras da cultura obtida através da técnica de isolamento a partir de sangue através da técnica com Histopaque®; S – amostra de sangue; Ca – amostras das culturas de carraças; Co⁻ – controlo negativo

4. Discussão

Num estudo realizado por Blouin & Kocan (1998), os autores verificaram que o ciclo de vida de *A. marginale* em culturas de células é semelhante ao encontrado em carraças naturalmente infetadas pela bactéria.

As fases do ciclo de vida de *A. marginale* foram verificadas nos frascos de cultura com as técnicas da lise de eritrócitos e com técnica com Histopaque®. Na tentativa de isolamento a partir de carraças, estas etapas foram também observadas.

A invasão das células IDE8 (células hospedeiras) inicia-se por uma adesão das formas densas de *A. marginale* à membrana da célula. A adesão entre a bactéria e a membrana da célula IDE8 aumenta e os organismos de *A. marginale* são interiorizados na célula hospedeira, formando um vacúolo parasitóforo. Neste vacúolo, *A. marginale* divide-se por fissão binária na sua forma vegetativa. Formam-se então colónias que contêm milhares de bactérias. Posteriormente, a membrana das colónias funde-se com a membrana plasmática das células hospedeiras, havendo rotura deste complexo com libertação de bactérias para o meio de cultura, sem que haja perda de citoplasma. As bactérias livres no meio de cultura iniciam assim um novo ciclo de infeção, infetando outras células IDE8, resultando na formação de mais colónias. Pensa-se que a forma infetante é a forma densa de *A. marginale* (Blouin & Kocan, 1998).

O mecanismo de entrada de *A. marginal* nas células de carraças por endocitose e a saída por um processo que envolve a fusão das membranas dos vacúolos e da célula hospedeira parece ser um mecanismo controlado pela célula e pelo parasita, sugerindo uma molécula de adesão na superfície de *A. marginale* reconhecida pelo recetor de células hospedeiras. Suspeita-se que a bactéria possua proteínas de superfície únicas que estão envolvidas na entrada, em adição às MSPs conhecidas, que se conservam nas culturas provenientes de eritrócitos. O mecanismo pelo qual *Anaplasma sp.* sai da célula hospedeira permite a sua libertação sem danos nas células IDE8 e a fusão entre o vacúolo com a membrana da célula IDE8 previne a perda de citoplasma. Este mecanismo pode ocorrer em carraças naturalmente infetadas e pode permitir elevados níveis de infeção nas carraças, sem alterações patológicas (Blouin & Kocan, 1998).

4.1. Isolamento e propagação a partir de amostras de sangue

O isolamento foi apenas possível com a técnica de lise de eritrócitos e com a técnica com Histopaque®. Na técnica das células brancas não foi observada infeção das células IDE8, o que era expectável uma vez que o único local conhecido de infeção de *A. marginale* são os

eritrócitos (Kocan *et al.*, 2003). Assim, nesta técnica onde se separam as células brancas, era expectável que não fosse possível isolar *A. marginale*.

Nos frascos de cultura em que se utilizou a técnica de lise de eritrócitos, a primeira deteção da infeção foi observada com a formação de vacúolos parasitóforos aos setenta e cinco dias de cultura, enquanto que, com a técnica com Histopaque®, estes foram observados aos vinte e cinco dias de cultura. Apenas com a técnica com Histopaque® foi observável rotura das colónias com libertação das bactérias para o meio de cultura. Para ambas as técnicas, o tempo até à primeira deteção em lâminas cito-centrifugadas foi consideravelmente superior ao registado em estudos já realizados, em que o período de deteção variou entre oito e trinta e quatro dias (Munderloh *et al.*, 1996; Blouin *et al.*, 2000; Bastos *et al.*, 2009). Apesar do período até à primeira visualização ter sido mais longo, as colónias desenvolveram-se de forma semelhante às descritas nesses estudos.

Foi realizado PCR a uma amostra da cultura dos frascos referentes à técnica da lise de eritrócitos e a uma amostra de sangue do bezerro Vaca. O resultado da PCR foi negativo para a amostra da cultura e positivo para a amostra de sangue (figura 20). O resultado negativo da cultura poderá ter ocorrido porque o nível de parasitémia do animal é baixo e por isso *A. marginale* não foi detetável por PCR. Por outro lado, este resultado pode também ser explicado por uma possível extração de DNA da amostra da cultura que não foi realizada de forma correta, não tendo sido extraída quantidade suficiente de DNA da cultura que fosse detetável por PCR.

Para a técnica com Histopaque®, foi realizado PCR a uma amostra da cultura e a uma amostra de sangue do bezerro Gordo. O resultado da PCR foi positivo para ambas as amostras, sendo possível confirmar que a bactéria isolada nas culturas obtidas com esta técnica se trata de *A. marginale*.

O expectável seria que a única técnica possível de isolamento de *A. marginal* fosse a técnica da lise de eritrócitos, uma vez que este é o único local conhecido de infeção de *A. marginale* (Kocan *et al.*, 2003). Esta técnica permite a lise dos eritrócitos, libertando as bactérias do interior dos eritrócitos para que desta forma possam invadir as células hospedeiras. Contudo, apesar de ter sido observável aos setenta e cinco dias vacúolos no interior das células IDE8 (figura 15), não é possível garantir, com certeza, que se trate de isolamento de *A. marginale* uma vez que o resultado de PCR da amostra de DNA extraído da cultura foi negativo para *A. marginale*.

A técnica em que se conseguiu obter isolamento de *A. marginale* com maior sucesso e com confirmação por PCR foi com a técnica com Histopaque®. Este resultado é controverso, uma vez que o Histopaque® é uma solução de polissacarose e diatrizoato de sódio que separa, por densidades, as células mononucleadas dos eritrócitos e é comumente utilizada em

laboratório para o isolamento de organismos provenientes de células brancas (Aguiar *et al.*, 2008).

Uma explicação para se ter obtido sucesso no isolamento de *A. marginale* com esta técnica poderá ter sido o facto do Histopaque® não ter funcionado na realização da técnica e não ter separado as células mononucleadas dos eritrócitos. Assim, a bactéria poderá ter conseguido desenvolver-se nos eritrócitos.

4.2. Isolamento e propagação de *A. marginale* a partir de carraças

As metodologias realizadas para o isolamento de *A. marginale* a partir de carraças (lavagem, macerado e isolamento) são idênticas às descritas para a realização de culturas primárias e estabelecimento de linhagens celulares de carraças. Enquanto na formação de uma cultura primária o objetivo é estabelecer uma nova linhagem celular através da formação de uma camada de células confluentes e passíveis de nova cultura nova, neste estudo utilizou-se a linhagem IDE8 para isolar e propagar *A. marginale* proveniente das carraças recolhidas a animais experimentalmente infetados pela bactéria (Baêta, 2015).

Dos três frascos de culturas obtidas através do isolamento através do macerado das carraças recolhidas ao bezerro Gordo, apenas foi verificado destacamento das células IDE8 da parede do frasco 3. Após sete dias da realização da técnica, as lâminas cito-centrifugadas de amostras das culturas deste frasco mostraram inclusões suspeitas. Aos sessenta dias, verificou-se a presença de colónias suspeitas. As etapas do ciclo de desenvolvimento descrito por Blouin & Kocan (1998) foram também verificadas nesta cultura, em semelhança às culturas obtidas através do sangue pelas técnicas de lise de eritrócitos e com Histopaque®.

Aos sessenta dias de cultura, foi retirada uma amostra do frasco 3 – frasco que demonstrou sinais de infeção, com o destacamento das células da parede do frasco e presença de colónias nas lâminas citocentrifugadas - e foi realizado PCR. O PCR foi realizado para verificar se as colónias visualizadas em lâmina se tratavam de colónias de *A. marginale*., isto é, as cadeias de DNA corresponderem a *A. marginale*. O resultado da PCR foi negativo para a amostra. O facto do resultado do PCR das amostras de carraças ser negativo a *A. marginale* pode ser explicado pelo facto das carraças recolhidas do animal não estarem infetadas pela bactéria – as carraças poderão não ter realizado a sua refeição de sangue infetado antes da sua colheita, não se apresentando por isso infetadas pela bactéria. Outra explicação para estes resultados pode ser um reduzido nível de parasitémia, pelo que não foi detetável por PCR.

Em adição, a cultura obtida através do isolamento do macerado de carraças tinha setenta e cinco dias aquando da realização do PCR, pelo que poderá não ter sido tempo suficiente para o desenvolvimento de *A. marginale* no interior das células em quantidades detetáveis por PCR.

5. Conclusão

A linhagem de células embrionárias de carraças da espécie *Ixodes scapularis* IDE8 mostrou-se efetiva para o isolamento, cultura e propagação de *A. marginale*, tendo-se cumprido o principal objetivo deste trabalho. Foi possível isolar e propagar *A. marginale* nesta linhagem através de diferentes metodologias: a partir do sangue e a partir de carraças recolhidas de animais experimentalmente infetados por *A. marginale*.

Através dos procedimentos de rotina do LDP, foi possível manter as linhagens de células embrionárias a partir de culturas primárias e utilizá-las na realização deste estudo, com sucesso.

A realização destas metodologias para isolamento e propagação de *A. marginale* providenciam um meio para o estudo do ciclo biológico da bactéria na ausência de resposta imune dos hospedeiros, permitindo uma melhor compreensão da interação entre o vetor (carraça) e o agente patogénico (*A. marginale*). Através da observação das fases do ciclo de vida de *A. marginale nos frascos de cultura*, foi possível compreender essa interação e cumprir assim um dos objetivos deste trabalho.

Este tipo de estudos permite ainda a redução na utilização de animais para a realização de ensaios experimentais. Segundo Lis (2014), linhagens celulares infetadas são uma notável fonte de bactérias uma vez que permitem a replicação das bactérias em títulos elevados num curto período de tempo.

Em adição, este tipo de sistemas de células *in vitro* constitui uma boa fonte de material antigénico, o que permite o desenvolvimento de vacinas e métodos de diagnóstico, principalmente nas regiões onde a anaplasose é uma doença endémica. Constitui também um modelo de estudos, tanto para análises moleculares, genéticas, celulares, quanto para a comparação entre estudos *in vivo* e *in vitro* (Passos, 2012).

Por fim, este trabalho permitiu também a implementação de normas de segurança em laboratório, essenciais para o sucesso das metodologias realizadas.

Bibliografia

- Aguiar DM, Hagiwara MK, Labruna MB (2008) *In vitro* isolation and molecular characterization of an *Ehrlichia canis* strains from São Paulo, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, **39**: 289-493
- Akther N, Lal C, Gadaji JÁ (2010) Efficacy of various antiprotozoam drugs on bovine babesiosis, anaplasmosis and theileriosis. Vet World, **3**: 272-274
- Alleman AR, Palmer GH, McGuire TC, McElwain TF, Perryman LE, Barbet AF (1997) *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 3 Is Encoded by a Polymorphic, Multigene Family. Infection and immunity, **65** (1): 156 – 163
- Amorim LS, Wenceslau AA, Carvalho FS, Carneiro PL, Albuquerque GR (2014) Bovine babesiosis and anaplasmosis complex: diagnosis and evaluation of the risk factors from Bahia, Brazil. Braz. J. Vet. Parasitology, **23** (3): 328-336
- Araújo FR, Madruga CR, Soares CO, Kessler RH (2003) Progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. Pesq. Vet. Bras, **23**(4):139-148
- Aubry P & Geale DW (2010) A Review of Bovine Anaplasmosis. Transboundary and Emerging Diseases. **58**: 1–30
- Baêta BA (2015) Isolamento e caracterização molecular de duas novas cepas de *Anaplasma marginale* e estabelecimento de linhagens de células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Tese de doutoramento em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil
- Bastos CV, Vasconcelos MMC, Ribeiro MFB, Passos LMF (2017) Manutenção *in vitro* de células IDE8 em dois tipos de soro bovino. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., **59** (2): 543-546
- Barbet AF, Blentlinger R, Yi J, Lundgren AM, Blouin EF, Kocan M (1999) Comparison of Surface Proteins of *Anaplasma marginale* Grown in Tick Cell Culture, Tick Salivary Glands, and Cattle. Infection and immunity, **67** (1): 102-107
- Bell AS & Ranford-Cartwright LC (2002) Real-time quantitative PCR in parasitology. Trends in Parasitology, **18** (8): 337-342
- Bell LJ (1984) Tick tissue culture techniques in the study of arthropod-borne protozoa: the development of *Theileria annulata* in organ cultures of *Hyalomma anatolicum anatolicum*. Medical and veterinary acarology, **VI** (2): 1089-1095
- Bell-Sakyi L, Zwegarth E, Blouin EF, Gould EA, Jongejan F (2007) Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. Trends in parasitology, **23** (9): 450-457
- Bell-Sakyi L, Kohl A, Bente D, Fazajerley J (2012) Tick Cell Lines for Study of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus and Other Arboviruses. Vector-borne and zoonotic diseases, **12** (9): 760-781
- Bell-Sakyi L, Darby A, Baylis M, Makepeace BL (2018) The Tick Cell Biobank: A global resource for *in vitro* research on ticks, other arthropods and the pathogens they transmit. Tick and Tick-borne Diseases, **9** (5): 1364-1371

Blouin EF & Kocan KM (1998) Morphology and development of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in cultured *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) cells. *J med Entomol*, **35** (5): 788-797

Blouin EF, Barbet AF, Yi J, Kocan KM, Saliki JT (2000) Establishment and characterization of an Oklahoma isolate of *Anaplasma marginale* in cultured *Ixodes scapularis* cells. *Veterinary Parasitology*, **87**: 301-313

Blouin EF, de la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Sauer JR, Saliki JT, Kocan KM (2002) Applications of a cell culture system for studying the interaction of *Anaplasma marginale* with tick cells. *Animal Health Research Reviews*, **3** (2); 57–68

Bose R, Jorgensen WK, Dalgliesh RJ, Friedhoff KT, de Vos AJ (1995) Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Veterinary parasitology*, **57**: 61-74

Brayton KA (2012) Tick transmission of *Anaplasma marginale*. *Rev Mex Cienc Pecu*, **3** (1): 41-50

Brown WC, McGuire TC, Zhu D, Lewin HA, Sosnow J, Palmer GH (2001) 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*, **166**: 1114-1124

Brown WC (2012) Adaptive immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation: implications for bacterial persistence. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*, **35**: 241-252

Carelli G, Decaro N, Lorusso A, Elia G, Lorusso E, Mari V, Ceci L, Buonavoglia C (2007) Detection and quantification of DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. *Veterinary Microbiology*, Elsevier, **124** (1-2): 107

Corona B, Machado H, Rodríguez M, Martínez S (2009) Characterization of recombinant MSP5 *Anaplasma marginale* Havana isolate. *Brazilian Journal of Microbiology*, **40**: 972-979

Cory J, Yunker CE, Ormsbee RA, Peacock M, Meibos H, Tallet G (1974) Plaque assay of rickettsiae in a mammalian cell line. *Appl Microbiol*, **27**: 1157-1161

de la Fuente J, Bussche RAVD, Kocan KM (2001) Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). *Veterinary Parasitology*, **97**: 65-72

de la Fuente J, Kocan KM, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Claypool PL, Saliki JT (2002) Vaccination of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture and bovine erythrocytes followed by challenge-exposure with infected ticks. *Veterinary Microbiology* **89**: 239 - 251

de la Fuente J, Thomas EJJ, Bussche RAVD, Hamilton RG, Tanaka EE, Druhan SE, Kocan KM (2003) Characterization of *Anaplasma marginale* Isolated from North American Bison. *Applied and Environmental Microbiology*, **69** (8): 5001-5005

Dumler JS, Barbet AF, Bekker, CPJ, Dascal GA, Palmer GH; Ray SC; Rikihisa Y, Rurangirwa FR (2001) Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia*

phagocytophila. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **51**: 2145–2165

Eriks IS, Stiller D, Palmer G (1993) Impact of Persistent *Anaplasma marginale* Rickettsemia on Tick Infection and Transmission. Journal of Clinical Microbiology, **31 (8)**: 2091 – 2096

Eriks IS, Stiller D, Goff WL, Panton M, Parish SM, McElwain TF, Palmer GH (1994) Molecular and biological characterization of a newly isolated *Anaplasma marginale* strain. J Vet Diagn Invest, **6**: 435-441

Futse JE, Uete MW, Knowles DP, Palmer GH (2003) Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: Retention of Vector Competence in the Absence of Vector-Pathogen Interaction. Journal of Clinical Microbiology, **41 (8)**: 3829 - 3834

Guglielmone AA (1995) Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. Veterinary Parasitology, **57**: 109-119

Howden KJ, Geale DW, Paré J, Golsteyn-Thomas EJ, Gajadhar AA (2010) An update on bovine anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) in Canada. CVJ, **51**: 837-840

Jaswal H, Bal MS, Singla LD, Gupta K, Brar APS (2013) Pathological observations on clinical *Anaplasma marginale* infection in cattle. Journal of Parasitic Diseases, **39 (3)**: 495-498

Kaartinen L, Salonen M, Alli L, Pyorala S (1995) Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous, intramuscular and subcutaneous injections in lactating cows. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, **18 (5)**: 357-62

Kemper N (2007) Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. Ecological indicators, **8**: 1-13

Kieser S, Eriks I, Palmer G (1990) Cyclic Rickettsemia during Persistent *Anaplasma marginale* Infection of Cattle. Infection and Immunity, **58 (4)**: 1117 - 1119

Kocan KM, Hair JA, Ewing SA, Stratton LG (1981) Transmission of *Anaplasma marginale* Theiler by *Dermacentor andersoni* Stiles and *Dermacentor variabilis* (Say). American Journal of Veterinary Research, **42 (1)**: 15-18

Kocan KM, Blouin EF, Palmer GH, Eriks IS, Edwards WL (1996) Strategies to interrupt the development of *Anaplasma marginale* in its tick vector. The effect of bovine derived antibodies. AM NY Academy Science, **791**: 157-165

Kocan KM, Blouin EF, Barbet AF (2000) Anaplasmosis control Past, Present and Future. Annals New York Academy of Sciences, **916**: 501-509

Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Garcia-Garcia JC (2002) Adaptations of the tick-borne pathogen, *Anaplasma marginale*, for survival in cattle and ticks. *Experimental and Applied Acarology* **28**: 9–25

Kocan KM, de la Fuente J, Guglielmone AA, Meléndez RD (2003) Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. Clinical Microbiology Reviews, **16 (4)**: 698–712

- Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Garcia-Garcia JC (2004) *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host–pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*, **129**: 285–300
- Kocan KM, Zivkovic Z, Blouin EF, Naranjo V, Almazán C, Mitra R, de la Fuente J (2009) Silencing of genes involved in *Anaplasma marginale*-tick interactions affects the pathogen developmental cycle in *Dermacentor variabilis*. *BMC Developmental Biology* 2009, **9**: 42
- Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing AS (2010) The natural history of *Anaplasma Marginale*. *Veterinary Parasitology*, **167**: 95–107
- Kurtti TJ, Munderloh UG, Samish M (1982) Effect of medium supplements on tick cells in culture. *Journal of Parasitology*, **68 (5)**: 930-935
- Kuttler KL (1975) Diagnosis of anaplasmosis: a review. E.A. Well, Workshop on Hemoparasites (Anaplasmosis and Babesiosis), **93-103**
- Kwak YR & Smith RD (1989) Evaluation of the diagnostic performance of *Anaplasma marginale* antigens identified by Western Blotting. Proc of Eight Nat Vet Hemop Disease, Conf. 281-288.
- Leibovitz A (1963) The Growth and Maintenance of Tissue-Cell Cultures in Free Gas Exchange with Atmosphere. *American Journal of Hygiene*, **78**: 173-180
- Lis K (2004) Analysis of *Anaplasma marginale* strains grown in vitro. Tese de doutoramento em Ciências, Universidade de Neuchâtel, Suíça
- Lohr CV, Brayton KA, Shkap V, Molad T, Barbet AF, Brown WC, Palmer GH (2002) Expression of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 2 Operon-Associated Proteins during Mammalian and Arthropod Infection. *Infection and Immunity*, **70 (11)**: 6005 - 6012
- Madrugal CR; Honer MR, Schenkl MAM, Curvo JBE (1987) Avaliação preliminar de parâmetros epidemiológicos da Tristeza Parasitária Bovina no Mato Grosso do Sul. *EMBRAPA*, **38**: 1-7
- McGarey DJ, Barbet AF, Palmer GH, McGuire TC, Alred RD (1994) Putative Adhesins of *Anaplasma marginale*: Major Surface Polypeptides Ia and Ib. *Infection and immunity*, **62 (10)**: 4594 - 4601
- Mendonça FLM (2015), Dissertação de mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil
- Munderloh UG & Kurtti TJ (1985) Malarial parasites complete sporogony in axenic mosquitoes. *Experientia*, **41 (9)**: 1205-1207
- Munderloh UG & Kurtti TJ (1989) Formulation of Medium for Tick Cell Culture. *Experimental & Applied Acarology*, **7**: 219-229
- Munderloh UG, Liu Y, Wang M, Chen C, Kurtii TJ (1994) Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*. *Journal of parasitology*, **80 (4)**: 533-543
- Munderloh UG, Blouin EF, Kocan KM, Lin Ge N, Edwards WL, Kurtii TJ (1996) Establishment of the Tick (Acari: Ixodidae)-Borne Cattle Pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Tick Cell Culture. *J. Med. Entomol.*, **33**: 656- 664

- Munderloh UG, Tate CM, Lynch MJ, Howerth EW, Kurtti TJ, Davidson WR (2003) Isolation of an *Anaplasma* sp. Organism from White-Tailed Deer by Tick Cell Culture. *Journal of Clinical Microbiology*, **41** (9): 4328–4335
- Munderloh UG, Lynch MJ, Herron MJ, Palmer AT, Kurtti TJ, Nelson RD, Goodman JL (2004) Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Veterinary Microbiology*, **101**: 53-64
- Najm NA (2012) In vitro culture studies of tick cell lines. Tese de doutoramento, Universidade de Munique, Alemanha
- Oberle SM, Palmer GH, Barbet AF (1993) Expression and Immune Recognition of the Conserved MSP4 Outer Membrane Protein of *Anaplasma marginale*. *Infection and immunity*, **61** (12): 5245 - 5251
- Palmer GH, Eid G, Barbet AF, McGuire TC, McElwain TF (1994a) The Immunoprotective *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 2 Is Encoded by a Polymorphic Multigene Family. *Infection and immunity*, **62** (9): 3808-3816
- Palmer GH, Munodzana D, Tebele N, Ushe T, McElwain TF (1994b) Heterologous strain challenge of cattle immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes. *Vet Immunology Immunopathology*, **42**: 265-273
- Palmer GH & McElwain TF (1995) Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Veterinary Parasitology*, **57**: 233 - 253
- Palmer GH, Rurangirwa FR, Kocan KM, Brown WC (1999) Molecular Basis for Vaccine Development against the Ehrlichial Pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitology Today*, **15** (7): 281-286
- Passos L (2012) In vitro cultivation of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in tick cell lines: a review. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal, **21** (2): 81-86
- Ribeiro MFB, Lima JD (1996) Morphology and development of *Anaplasma marginale* in midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, **61**: 31-39
- Řehacek J, Brzostowski H (1969) A tick tissue culture medium based on analyses of tick haemolymph. *Journal of Insect Physiology*, **15** (8): 1431-1436, 1969.
- Roby TO & Mazzola V (1972) Elimination of the carrier state of bovine anaplasmosis with imidocarb. *Am. J. Vet. Res.*, **33**: 1931-1933
- Scoles GA, McElwain TF, Rurangirwa FR; Knowles DP, Lysyk TM (2006) A Canadian Bison Isolate of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) Is Not Transmissible by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae), Whereas Ticks from Two Canadian *D. andersoni* Populations Are Competent Vectors of a U.S. Strain. *JOURNAL OF MEDICAL ENTOMOLOGY*, **43** (5): 971-975
- Tebele N, McGuire TC, Palmer GH (1991) Induction of protective immunity using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infection & Immunity*, **59**: 3199-3204
- Torioni de Echaide S, Knowles DP, McGuire TC, Palmer GH, Suarez CE, McElwain TF (1998) Detection of Cattle Naturally Infected with *Anaplasma marginale* in a Region of Endemicity by

Nested PCR and a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5. *Journal of Clinical Microbiology*, **36 (3)**: 777-782

Varma MG, Pudne M, Leake CJ (1975) The establishment of three cell lines from the tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) and their infection with some arboviruses. *Journal Med Entomol*, **11**: 698-706

Vidotto O & Marana ERM (2001) Diagnosis in bovine anaplasmosis. *Ciência Rural*, **31 (2)**: 361 - 368

Visser ES, McGuire TC, Palmer GH, Davos WC, Shkap V, Pipano E, Knowles DP (1992) The *Anaplasma marginale* msp5 Gene Encodes a 19- Kilodalton Protein Conserved in All Recognized *Anaplasma* Species. *Infection and immunity*, **60 (12)**: 5139 - 5144

Wright IG (1990) Immunodiagnosis of and immunoprophylaxis against the haemoparasites *Babesia* sp. and *Anaplasma* sp. in domestic animals. *Rev. sci. tech. Off, int. Epiz*, **9 (2)**: 345-356

Yunker CE & Meibos H (1979) Culture of embryonic tick cells (Acari: Ixodidae). *TCA Manual*, **5**: 1015-1017

Zivkovic Z, Nijhof AM, de la Fuente J, Kocan KM, Jongejan F (2007) Experimental transmission of *Anaplasma marginale* by male *Dermacentor reticulatus*. *BMC Veterinary Research*, **3**: 32

Zivkovic Z (2010) Tick-pathogen interactions in bovine anaplasmosis. *Teste de doutorado em Ciências Veterinárias, Universidade de Utrecht, Holanda*

Zweygarth E, Josemans AI, Spickett AM, Steyn HC, Putterill J, Troskie PC, Mtshali MS, Bell-Sakyi L, Shkap V, Fish L, Kocan KM, Blouin EF (2006) In vitro cultivation of a South African isolate of *Anaplasma* sp. In tick cell cultures. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **73**: 251 – 255