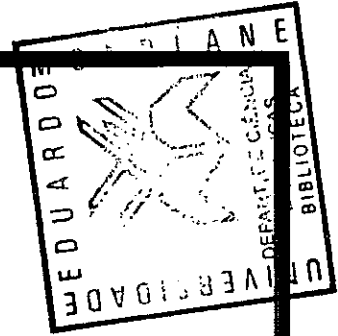


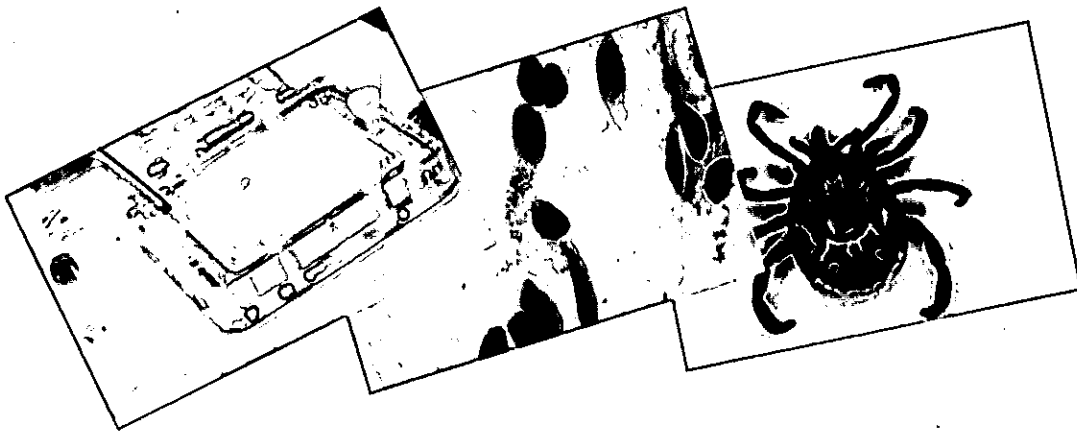
B10-32



**Universidade Eduardo Mondlane**  
**Faculdade de Ciências**  
**Departamento de Ciências Biológicas**

Trabalho de Culminação de Curso

**Detecção Molecular de *Ehrlichia ruminatum* nos Diferentes  
Estágios de Crescimento da *Amblyomma hebraeum***



Autor: Edgar Manuel Cambaza

**Universidade Eduardo Mondlane**  
**Faculdade de Ciências**  
Departamento de Ciências Biológicas

Trabalho de Culminação de Curso

**Detecção Molecular de *Ehrlichia ruminatum* nos Diferentes  
Estágios de Crescimento da *Amblyomma hebraeum***

Supervisores:  
Dr. Luís Neves  
dra. Cristina Beatriz  
Co-Supervisora:  
dra. Olívia Pedro



Maputo, Dezembro de 2007



## Agradecimentos

Em primeiro lugar, do fundo do coração, à dra. Cristina Beatriz pela inesgotável paciência, pelo apoio e, acima de tudo, pela dedicação e amizade. Bem aventuradas serão sempre as mentes brilhantes e espíritos cheios de virtudes como a doutora. Muito obrigado!

Ao Dr. Luís Neves, sempre bem disposto e que, apesar de tão atarefado, ofereceu-me a oportunidade de contemplar de perto e participar do combate contra um problema e debate tão interessante relacionado com a triste mas promissora realidade do meu país. A sabedoria não tem preço e a ciência saberá sempre reconhecê-lo por isso. As mesmas palavras uso para agradecer as doutoras Filomena dos Anjos e Sónia da Faculdade de Veterinária.

Não poderia, de modo nenhum e por todo e qualquer motivo, deixar de agradecer à dr<sup>a</sup>. Olivia Pedro, também sempre sorridente, conversadora e dedicada, pela orientação prática e teórica, pois parte da qualidade do meu trabalho deve-se à sua disponibilidade para oferecer ajuda a qualquer momento. Não me esquecerei do seu apoio no sentido de interpretar cada aspecto relacionado com a experiência. Ivete Maquia, minha irmã, agora estás uma *expert* no laboratório. Como não agradecer tanto a ti, como à Paula e ao Válder? Vós sois meus *big brothers*.

Não me esqueço também da ajuda prestada pela doutora Tufária, doutor Ermógenes, pelos senhores Basílio, Damião e Chimunga. Obrigado, Adelaide e Yara.

Mariamo, Nídia e Khalid, estivemos no mesmo barco. Em grande parte, participamos de problemas semelhantes, convosco me identifiquei e pude-me espelhar, sentir segurança, sabendo que em momento algum estive sozinho no grande trabalho que poderá ser a ponte entre a minha vida estudantil e profissional. Obrigado, colegas.

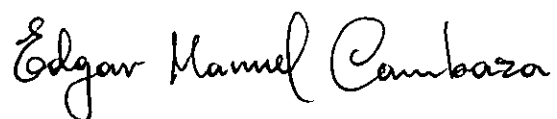
Vânia Eurídice Guiloviça, nunca vi tanta moral numa pessoa. É claro que te agradeço por isso, pois a moral é contagiosa e extremamente benéfica! Do mesmo modo agradeço Lina Buque e Eunice Leong, companheiras de combate.

Meu irmão Dudo, pelos debates inteligentes, Rosy (*my shorty*), aos meus pais, Lilando, Dino, Nhataque (*big bro*), mr. Bara pela paciência e dedicação. Por fim... mr. *Joséf* que me dá boléia desde a nona classe (pensa que me esqueci?). Aos que não mencionei.

## Declaração de Honra

É por minha honra que declaro que o presente trabalho foi por mim realizado e que os dados apresentados correspondem à mais perfeita realidade.

**Edgar Manuel Cambaza**



## Dedicatórias

*A Dudo, meu irmão,*

*És um granda brô, bué da fixe! Este trabalho também é teu, pois, também gastaste a tua massa cinzenta nisto e choraste as minhas dores e os meus temores. Ao contrário do que isto pode significar para muitos, isto é apenas o começo da minha longa maratona pelo mundo da ciência e tu és, com certeza, o meu ícone do portal da ciência.*

*Aos meus pais, à doutora Cristina e todos os meus mentores,*

*Aqui estou eu, Edy, vosso filho e, acima de tudo, mais um ser humano pronto para enfrentar a vida. Eu sou vosso produto e tudo o que sair destas mãos, todas as honras que eu conquistar farão parte do vosso domínio e dos vossos pertences. Tudo farei para não vos desapontar e na escura imensidão do futuro incerto, os meus braços erguerei de modo a fazer prevalecer a chama que por mim vós acendestes.*

*A Rosy e aos meus amigos que ainda vêm a caminho,*

*Dou-vos a dobrar todas as forças que me vêm dando ao longo do tempo, porque vocês fizeram de mim um vencedor.*

## Lista de Tabelas

**Tabela 1.** Os diferentes pontos de colheita de carraças adultas no distrito de Matituíne.

**Tabela 2.** Quantidades dos reagentes que serão misturados e submetidas a PCR.

**Tabela 3.** Programação do número de ciclo, da temperatura e da respectiva duração para serem aplicados no termociclador, durante a PCR.

## Lista de Anexos

**Anexo 1.** RLB (*reverse line blot*).

**Anexo 2.** Protocolos.

**Anexo 3.** Figuras.

**Anexo 4.** Tabelas de Resultados da Espectrofotometria .

## Lista de Abreviaturas

A	Adenina
A <sub>260</sub>	Absorvância a comprimento de onda igual a 260 nanómetros
A <sub>280</sub>	Absorvância a comprimento de onda igual a 280 nanómetros
A <sub>320</sub>	Absorvância a comprimento de onda igual a 320 nanómetros
An	<i>Anaplasma Ehrlichia</i>
ARNr	Ácido ribonucleico ribossómico
Ba	<i>Babesia</i>
C	Citosina
CB-UEM	Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane
CH <sub>3</sub> COONa	Acetato de sódio
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNAL	Direcção Nacional da Administração Local
dNTP	Trifosfato de desoxinucleótido
ECL	Substrato quimioluminescente.
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
G	Guanina.
INIV	Instituto Nacional de Investigação Veterinária
MilliQ	Água desionizada, preparada num aparelho de miliporos
pb	Pares de bases (de nucleotídeos)
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> (tampão do fosfato salino)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacção em Cadeia da Polimerase)
POD	Peroxidase
RLB	<i>Reverse Line Blot</i>
S	Coefficiente de sedimentação
s. d.	Sem data conhecida
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i> (duodecil sulfato de sódio)
SSPE	Sódio sódio fosfato etilenodiaminotetracetato
T	Timina
Taq polimerase	Polimerase extraída da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
TBA	Tris-borato EDTA

Th	<i>Theillera</i>
U	Unidades
UEM	Universidade Eduardo Mondlane



## Resumo

*Ehrlichia ruminantium*, a bactéria causadora da ehrliquiose, é transmitida por carrças do género *Amblyomma*. O método de detecção molecular designado *reverse line blotting* (RLB), que consiste na hibridização usando sondas de oligonucleotídeos com a região dos domínios conservados no interior do gene 16S ARNr designada *loop VI* hipervariável amplificada usando-se a reacção em cadeia da polimerase (PCR), foi usado para a comparação entre as frequências de infecção de *A. hebraeum* em três diferentes estágios de crescimento (larvas, ninfas e adultas). Foram colhidas 110 amostras das quais 39 larvas e 39 ninfas de *A. hebraeum* foram obtidas no *campus* da Faculdade de Veterinária da Universidade Eduardo Mondlane e 32 carrças adultas da mesma espécie foram colectadas na pelagem de bovinos em diversos pontos do distrito de Matitúne. A hibridação dos controles positivos com as respectivas sondas mostraram que o processo de RLB foi efectuado com sucesso tendo sido, entretanto, todas as amostras testadas negativas, o que sugere primariamente a ausência do microrganismo nas amostras estudadas.

## Índice

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
2.1	Etiologia.....	4
2.2	Espécies Afectadas.....	5
2.3	Distribuição Geográfica .....	5
2.4	Transmissão .....	5
2.5	Período de Incubação.....	6
2.6	Sinais Clínicos.....	6
2.7	Lesões <i>Post Mortem</i> .....	7
2.8	Mortalidade.....	7
2.9	Diagnóstico.....	8
2.9.1	Clínico .....	8
2.9.1	Diferencial .....	8
2.9.1	Testes Laboratoriais .....	8
2.10	Controle.....	9
<b>3</b>	<b>OBJECTIVOS</b> .....	<b>10</b>
3.1	Geral.....	10
3.2	Específicos .....	10
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>11</b>
4.1	Áreas de Estudo.....	11
4.1.1	Faculdade de Veterinária da UEM .....	11
4.1.2	Centro de Biotecnologia da UEM .....	11
4.1.3	Distrito de Matituíne .....	11
4.2	Material.....	12
4.2.1	Equipamento.....	12
4.2.2	Reagentes .....	12
4.3	Métodos .....	13
4.3.1	Amostragem .....	13
4.3.2	Extracção do ADN a partir das Carrças .....	14
4.3.3	Electroforese em Gel de Agarose .....	14
4.3.4	Espectrofotometria .....	14
4.3.5	Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR).....	14
4.3.6	Reverse Line Blotting (RLB) .....	16
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>16</b>

6	DISCUSSÃO .....	17
7	CONCLUSÃO .....	18
8	RECOMENDAÇÕES .....	18
9	BIBLIOGRAFIA .....	19

## 1 Introdução

A *cowdriose* ou *heartwater*, actualmente designada por ehrliquiose, é uma doença infecciosa (Mahan *et al.*, 1999; Collins *et al.*, 2005) aguda e fatal (Mahan *et al.*, 1999) não contagiosa (Losos, 1986) transmitida por carraças (Losos, 1986; Mahan *et al.*, 1999; Bekker *et al.*, 2001) que ataca o gado bovino, caprino e ovino (Losos, 1986; Mahan *et al.*, 1999; Kleef *et al.*, 2002), para além de ruminantes selvagens (van Heerden *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2005).

A ehrliquiose é causada por uma riquetsia, *Ehrlichia ruminantium* (Bekker *et al.*, 2002; Faburay *et al.*, 2007) e a infecção do gado ocorre após a picada de carraças do género *Amblyomma* (Losos, 1986; Bekker *et al.*, 2002; van Heerden *et al.*, 2004; Faburay *et al.*, 2007), que são os principais vectores da ehrliquiose. Estes artrópodes são membros da família Ixodidae (Faburay *et al.*, 2007), carraças caracterizadas por possuírem um escudo dorsal e as componentes bucais (capítulo) projectadas para frente quando observados dorsalmente. Para além disso, possui um rostro alongado com o segundo segmento do palpo pelo menos duas vezes mais longo do que largo, um par de olhos simples, festões marginais e o escudo ornamentado (Rey, 1992).

O ciclo biológico dos ixodídeos compreende três fases evolutivas activas: larva, ninfa e adulto. Durante as fases activas, os ixodídeos alternam entre períodos de intensa actividade (procura de hospedeiro e alimentação) e períodos não activos (metamorfose e diapausa), necessitando sempre de uma refeição de sangue para passarem ao estado evolutivo seguinte (Silva *et al.*, 2006).

Juntamente com a babesiose, anaplasiose e teileriose bovinas, a ehrliquiose é uma das doenças hemoparasíticas mais importantes em escala global (Uilenberg, 1995), pois representa um grande constrangimento para o monitoramento da criação do gado na África Sub-sahariana (Bekker *et al.*, 2002; Faburay *et al.*, 2005). Segundo Faburay *et al.* (2007), nas áreas endémicas onde existem vastos sistemas agrícolas e o controle das carraças é limitado ou inexistente, o número de vectores é alto e os animais estão sujeitos a constantes infecções. Apesar de programas profilácticos de imunização e tratamento terapêutico específico, esta doença resulta em perdas severas de gado susceptível ao longo da África Subsahariana (Uilenberg, 1995; Tutt, 2002; van Heerden *et al.*, 2004).

A ehrliquiose é um forte obstáculo para a criação de animais na África Sub-sahariana (Jongejan e Uilenberg, 2004; van Heerden *et al.*, 2004; Faburay *et al.*, 2005),

podendo causar taxas de mortalidade superiores a 90% nas espécies susceptíveis (Mahan *et al.*, 1999).

Bekker *et al.* (2001) e Asselbergs *et al.* (1993) afirmam que, em Moçambique, verifica-se a ocorrência de ehrliquiose ao longo de todo o país, sendo a prevalência extremamente alta (Bekker *et al.*, 2001) e havendo evidências de ocorrência da forma hiperaguda (Losos, 1986).

O conhecimento da ehrliquiose é muito importante para o seu controle. Assim, a avaliação e a validação das técnicas moleculares de diagnóstico podem constituir um contributo valioso para o aprofundamento dos conhecimentos sobre a epidemiologia desta doença em Moçambique.

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Etiologia

A ehrliquiose resulta da infecção por *Ehrlichia ruminantium* (antigamente *Cowdria ruminantium*) (Bekker *et al.*, 2002; van Heerden *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2005), riquetsia classificada na ordem Rickettsiales (Bezuidenhout *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 2005), família Rickettsiaceae, tribo Ehrlichiae, género *Ehrlichia* (Bezuidenhout *et al.*, 1994). Este microrganismo é um parasita intracelular obrigatório (Harrison, 2002; van Heerden *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2005). Entretanto, os autores van Vliet *et al.* (1994) afirmam que, tal como nas espécies de *Chlamydia*, o ciclo de desenvolvimento da *E. ruminantium* consiste de um estágio extracelular capaz de infectar células hospedeiras (corpúsculos elementares) e intracelular que se multiplica no interior de células hospedeiras (corpúsculo reticulado).

Geralmente, a *E. ruminantium* apresenta-se como cocobacilo Gram-negativo ou bacilo curto (Losos, 1986; Harrison, 2002) com 0,2 a 0,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e pode ser observado em esfregaços de células endotélicas dos capilares do cérebro (Martinez *et al.*, 1994; Uilenberg, 1995) formando colónias de cor púrpura quando coradas por *Giemsa* (Losos, 1986; Williams, 2003) (anexo 2, figura 10).

As estirpes de *E. ruminantium* variam na sua patogenicidade (Tutt, 2002). Pelo menos uma estirpe parece não ser patogénica para o gado bovino. Entretanto, todas as estirpes são patogénicas para caprinos e ovinos (Bezuidenhout *et al.*, 1994; Anónimo, 2005).

## 2.2 Espécies Afectadas

Bovinos, caprinos, ovinos o búfalo selvagem são severamente afectados pela ehrliquiose, apesar de algumas raças africanas apresentarem apenas sintomas ligeiros. As espécies *Damaliscus dorcas*, *Connonachaetes gnou* e *C. taurinus* da família Bovidae, aves pertencentes à família Numididae, tartarugas da espécie *Geochelone pardalis* e lebres da espécie *Lepus saxatilis* são reservatórios naturais da *E. ruminantium*. Este microrganismo pode também infectar os antílopes *Taurotragus oryx* e *T. derbianus* e outros, a cabra-de-leque (*Antidorcas marsupialis*), o veado cariacu (*Odocoileus virginianus*), furão (*Mustela putorius*), os roedores do género *Lemniscomys*, o camundongo albino (*Mus musculus*) e o roedor da espécie *Mastomys natalensis* (Bezuidenhout *et al.*, 1994; Anónimo, 2005).

## 2.3 Distribuição Geográfica

A ehrliquiose é endémica e grande parte da África Subsahariana (Bezuidenhout *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 2005; Faburay *et al.*, 2007), incluindo Madagascar (Bezuidenhout *et al.*, 1994) e outras ilhas do Oceano Índico (Martinez *et al.*, 1994). Esta doença é também encontrada nalgumas ilhas da Caraíbas (van Heerden *et al.*, 2004; Faburay *et al.*, 2007) e já foi reportada na Tunísia e antiga Jugoslávia (Bezuidenhout *et al.*, 1994; Anónimo, 2005). A figura 4 (no anexo 2) mostra a distribuição potencial da ehrliquiose em África.

## 2.4 Transmissão

A ehrliquiose pode ser transmitida por pelo menos doze espécies de carraças do género *Amblyomma*, dez delas existindo no continente africano (Bezuidenhout *et al.*, 1994). As carraças são infectadas quando larvas ou ninfas e podem transmitir a doença enquanto ninfas ou adultas (Bezuidenhout *et al.*, 1994). Não há passagem transovárica.

A *A. variegatum* é o principal vector em África e nalgumas partes das Caraíbas. Outros vectores incluem a carraça *A. hebraeum* (na África Austral), *A. lepidum* (na África Oriental e no Sudão) (Tutt, 2002; Muramatsu *et al.*, 2005), *A. astrion* e *A. pomposum*. A *A. sparsum*, *A. gemma*, *A. cohaerans*, *A. marmoreum* e *A. tholloni* são capazes de transmitir em infecções experimentais. Existem duas espécies americanas, nomeadamente *A. maculatum* (Bezuidenhout *et al.*, 1994) e *A. cajennense* (Camus e Barre, 1995), também podem transmitir a *E. ruminantium* em laboratório (Tutt, 2002).

A *E. ruminantium* é muito frágil e não sobrevive fora do hospedeiro por mais que algumas horas à temperatura ambiente. Contudo, as vacas podem transmitir a infecção ao vitelos pelo colostro (Bezuidenhout *et al.*, 1994; Anónimo, 2005).

Entretanto, a doença não é contagiosa e mesmo a transmissão experimental usando-se uma agulha é difícil (Williams, 2003).

## 2.5 Período de Incubação

O período de incubação em infecções naturais é normalmente de duas semanas, mas pode atingir um mês. O período de incubação a partir da inoculação intravenosa é 7 a 10 dias nos caprinos e ovinos, e 10 a 16 dias em bovinos (Bezuidenhout *et al.*, 1994).

## 2.6 Sinais Clínicos

A doença hiperaguda é normalmente observada em África nas raças não nativas de bovinos, caprinos e ovinos. Vacas prenhes são particularmente susceptíveis a esta forma. Os sinais clínicos podem incluir uma febre, perturbações na respiração, hiperestesia, lacrimação, convulsões terminais e morte súbita. Algumas raças de gado bovino podem desenvolver diarreia severa. A forma hiperaguda de ehrliquiose é relativamente rara (Bezuidenhout *et al.*, 1994).

A forma mais comum de ehrliquiose é a doença aguda. Esta síndrome é observada tanto nos bovinos, caprinos e ovinos não nativos como nos indígenas. Os sintomas começam com um febre súbita (cerca de 42 °C), anorexia, respiração rápida e perturbada. Ocasionalmente, os animais têm diarreia. Estes sintomas são seguidos pelos sinais nervosos, particularmente movimentos de mastigação, saliência da língua, contracção das pálpebras, movimentos circulares do animal, muitas vezes com passos incomumente grandes. Os animais afectados algumas vezes mantêm a cabeça baixa e as patas separadas. Alguns podem se tornar agressivos ou ansiosos. À medida que a doença progride, os sinais neurológicos tornam-se mais severos e o animal sofre de convulsões. Nos estágios terminais, movimentos de galopagem, opistonos, hiperestesia, nistagmo e espuma na boca são comuns. Os animais com a forma aguda de ehrliquiose normalmente morrem dentro de uma semana depois do início da manifestação da doença (Bezuidenhout *et al.*, 1994).

Em raras ocasiões, a ehrliquiose aparece como uma doença subaguda. Nesta forma, os sinais clínicos incluem febre prolongada, tosse e ligeira descoordenação. O animal tanto pode recuperar como morrer em uma ou duas semanas (Bezuidenhout *et al.*, 1994).

As infecções ligeiras ou subclínicas são observadas em vitelos com menos de três semanas de idade, bovinos ou ovinos parcialmente imunes, antílopes ou nalgumas raças indígenas de bovinos ou ovinos. O único sintoma é uma febre transiente. Esta forma da doença é conhecida como “febre de ehrliquiose” (Bezuidenhout *et al.*, 1994; Anónimo, 2005).

### **2.7 Lesões Post Mortem**

A lesão *post mortem* característica da ehrliquiose é o hidropericárdio, com um fluido pericardial acastanhado ou avermelhado. O hidropericárdio é encontrado com mais consistência em caprinos e ovinos do que bovinos. Outras lesões comuns incluem o edema pulmonar (figura 10 no anexo 3) e mediastinal, hidrotórax e as ascites. Hemorragias subendocardiais petequiais são frequentes (figura 11 no anexo 3), as submucosais e subserosais podem ser observadas noutros órgãos, especialmente o abomaso (figura 12 no anexo 3). Os animais podem também ter esplenomegália (mais severa em caprinos e ovinos do que nos bovinos), edemas e hemorragias nos nódulos linfáticos. A congestão, os edemas e as hemorragias são encontrados algumas vezes no cérebro (figura 13 no anexo 3) (Bezuidenhout *et al.*, 1994; Anónimo, 2005).

### **2.8 Mortalidade**

Segundo Tutt (2002), a ehrliquiose é responsável por uma taxa de mortalidade três vezes superior à que se atribui a patologias como anaplasnose e babesiose nas áreas endémicas.

As infecções sintomáticas em bovinos, caprinos e ovinos não nativos sem o devido tratamento são muitas vezes fatais. No gado bovino, a taxa de mortalidade de 60% é comum e, nalguns ovinos, pode atingir 80%. Mahan *et al.* (1999) afirmam que as taxas de mortalidade em ruminantes domésticos susceptíveis podem atingir 90%. Existem também caprinos extremamente susceptíveis a esta doença. Os animais nativos são muitas vezes resistentes à infecção. Entretanto, existem raças de ovelhas com uma taxa de mortalidade de apenas 6%.

O tratamento com antibióticos é muito eficaz, particularmente quando o tratamento inicia logo após ao aparecimento dos sintomas. A imunização com estirpes virulentas, seguida por tratamento com antibióticos é muitas vezes praticada em áreas endémicas e confere uma boa iminidade (Bezuidenhout *et al.*, 1994; Anónimo, 2005).



## 2.9 Diagnóstico

### 2.9.1 Clínico

A ehrliquiose deve ser suspeitada em animais com os sinais clínicos típicos que incluem a febre, perturbações respiratórias, sintomas nervosos característicos e morte súbita. A presença de carraças do género *Amblyomma* e as lesões *post mortem* típicas apoiam ao diagnóstico da ehrliquiose (Bezuidenhout *et al.*, 1994).

### 2.9.1 Diferencial

A forma hiperaguda da ehrliquiose pode ser confundida com antrax. A forma aguda assemelha-se à febre, ao tétano, à meningite ou encefalite bacteriana, babesiose, tripanossomose cerebral ou teileriose. Também deve ser diferenciada do envenenamento por estricnina, chumbo, ionóforos e outras toxinas miocárdicas, organofosfatos, arsénico, hidrocarbonetos clorinados ou algumas plantas venenosas (*Cestrum laevigatum*, espécies dos géneros *Pavetta* e *Pachystigma*). Acumulações de fluidos similares à ehrliquiose são muitas vezes observadas em fortes infestações de helmintes (Bezuidenhout *et al.*, 1994).

### 2.9.1 Testes Laboratoriais

A *E. ruminantium* é muitas vezes diagnosticada por exame microscópico de preparações do cérebro. As melhores amostras são as porções muito vascularizadas do cérebro tais como o cerebelo ou hipocampo. Tais preparações são secadas ao ar, fixadas com metanol e coradas com *Giemsa*. A *E. ruminantium* será vista como organismos de cor púrpura nas células endotélicas do capilar. Os organismos podem ser encontrados em dois dias nos cérebros armazenados à temperatura ambiente e cerca de 34 dias em cérebros refrigerados. Os microrganismos podem também ser encontrados em preparações de grandes vasos sanguíneos durante o exame histopatológico do cérebro, dos glomérulos renais e nódulos linfáticos (Bezuidenhout *et al.*, 1994).

Testes serológicos podem incluir o teste de anticorpo de fluorescência indirecta (IFA), o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) e o *immunoblotting* (*western blotting*). Reacções cruzadas com outras espécies de *Ehrlichia* ocorrem em grande parte destes testes, mas as variantes de ELISA que usam antígenos recombinantes são mais específicos e confiáveis. Ocasionalmente, o microrganismo é isolado do sangue pelo cultivo em células endoteliais dos ruminantes. A inoculação de sangue fresco em caprinos ou ovinos susceptíveis também pode ser usada (Bezuidenhout *et al.*, 1994; Anónimo, 2005).

A ehrliquiose também pode ser diagnosticada em amostras de tecidos com sondas de ADN. Este método é eficaz em casos clínicos, mas não é suficientemente sensível para identificar em muitos reservatórios. Os testes de reacção em cadeia de polimerase (PCR) podem detectar infecções clínicas em alguns animais (Bekker *et al.*, 2002).

Recentemente, foi desenvolvido um método de diagnóstico que consiste num ensaio baseado na PCR seguido de uma técnica de hibridização designada *reverse line blot* (RLB). Esta técnica permite a análise de amostras múltiplas *versus* sondas múltiplas ao mesmo tempo, o que pode ser visto como uma vantagem (Bekker *et al.*, 2002). Por esta razão, o RLB está rapidamente a tornar-se um método padrão de diagnóstico e estudos epidemiológicos, utilizado em vários laboratórios do mundo (Grubbels *et al.*, 1999).

A técnica de hibridização RLB foi inicialmente desenvolvida para a identificação de serótipos de *Streptococcus* por Kaufhold *et al.* (1994) e a primeira aplicação na detecção e diferenciação de dos patógenos em carraças foi desenvolvida para *Borrelia spirochetes* por Rijpkema *et al.* (1995). Em Moçambique, Guinda (2004) demonstrou, num estudo feito em gado bovino, que o RLB é uma técnica versátil para a detecção e diferenciação simultânea de espécies parasitárias em comparação com esfregaço de sangue, apesar de ser necessária a padronização definitiva desta técnica nos nossos laboratórios.

Bekker *et al.* (2002) acrescentam que o RLB pode ser usado para a detecção e diferenciação de espécies microbianas pertencentes aos géneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* que ocorrem em ruminantes nos subtrópicos com base em diferenças existentes no gene da subunidade 16S do ARNr. Os domínios conservados no interior do gene 16S ARNr foram utilizados para amplificar o *loop* VI hipervariável por PCR. Após a amplificação e sequenciação desta região do gene 16S ARNr, foram desenhadas sondas de oligonucleotídeos específicas para cada espécie, baseadas nas diferenças encontradas. Estes autores desenvolveram um ensaio que pode detectar simultaneamente *E. ruminantium*, *A. ovis*, *A. centrale*, *A. marginale*, *A. bovis*, *E. ovina*, *Ehrlichia* sp Variedade Omatjenne e *A. phagocytophila*.

## 2.10 Controle

Segundo Losos (1986) controle desta doença baseia-se principalmente no controle do vector com a ajuda de acaricidas como, por exemplo, o DDT, BHC, toxafeno, a dieldrina, o clordano e os organofosfatos. Peregrine (1994) acrescenta que os

antibióticos de tetraciclina, nomeadamente a clorotetraciclina, oxitetraciclina e rolitetraciclina, têm sido durante muitos anos usados para o controle das infecções por *E. ruminantium*. Para além do controle químico, é possível a aplicação de um método integrado que inclui o controle ecológico (por exemplo, alteração da vegetação natural), biológico (uso de hiperparasitas e predadores) e genético (esterilização dos machos).

### 3 Objectivos

#### 3.1 Geral

Detectar molecularmente a *Ehrlichia ruminantium* nos diferentes estágios de desenvolvimento da *Amblyomma hebraeum*.

#### 3.2 Específicos

- Validar o RLB na detecção do ADN da *E. ruminantium* presente nas carraças *A. hebraeum*;
- Comparar as frequências de infecção por *E. ruminantium* em larvas, ninfas e adultos da espécie *A. hebraeum*.

## 4 Metodologia

### 4.1 Áreas de Estudo

#### 4.1.1 Faculdade de Veterinária da UEM

A Faculdade de Veterinária da Universidade Eduardo Mondlane é uma instituição pública de ensino superior, cuja função social é a Educação Veterinária a nível de graduação, pós-graduação e formação profissional contínua, nas áreas de saúde animal, produção animal e saúde pública (Anónimo, 2007). Ela está localizada na cidade de Maputo, Avenida de Moçambique, Km 1,5.

Por toda a área descoberta da faculdade circula um efectivo de 12 cabeças de gado bovino, 23 de caprino (Damião, em comunicação pessoal, 2007), um burro (*Equus asinus*), todos estes pertencentes à faculdade. Algumas vezes, circulam também 17 cabeças de gado ovino (Chimunga, em comunicação pessoal, 2007) provenientes do INIV (Damião, em comunicação pessoal, 2007). A sua alimentação baseia-se predominantemente nas gramíneas *Cynodon* spp. e *Panicum* spp. da área de pasto, onde o gado também repousa e passa a maior parte do tempo durante o dia (dos Anjos, em comunicação pessoal, 2007). Para o presente estudo, as carraças serão recolhidas na área de pasto (figuras 5 e 6 no anexo 3).

#### 4.1.2 Centro de Biotecnologia da UEM

O Centro de Biotecnologia da UEM (CB-UEM) é uma entidade com gestão e infra-estruturas autónomas, que tem como função a formação, a investigação e a prestação de serviços na área de Biologia Molecular. O centro é constituído por grupos de investigação das faculdades de Agronomia, Ciências, Medicina e Veterinária e está aberto a qualquer instituição interessada (CB-UEM, 2005).

O CB-UEM está fisicamente localizado na Faculdade de Veterinária, contando com uma área laboratorial de 200 m<sup>2</sup>, com potencial de expansão para mais de 400 m<sup>2</sup>.

#### 4.1.3 Distrito de Matituíne

O distrito de Matituíne está localizado no extremo sul da província de Maputo e do país, entre os paralelos 26° e 27° de latitude sul e 32° e 33° de longitude este. O norte é limitado pela baía da cidade de Maputo, a sul pela República da África do Sul, com a província de Kuazulo-Natal, a este é banhado pelo Oceano Índico, e a oeste confina com os distritos de Namaacha e Boane e com o Reino da Suazilândia (MAE, 2005).

O clima de Matitúine é sub-tropical. Ocorrem, ao longo do ano, duas principais estações, a chuvosa que vai de Outubro a Abril e a seca que vai de Maio a Setembro. A precipitação média anual encontra-se na ordem dos 1000 mm e a temperatura média anual é superior a 24 °C, sendo a humidade relativa entre 55% e 75%.

## 4.2 Material

### 4.2.1 Equipamento

- Aparelho de banho-maria;
- Cassete de exposição;
- Centrífuga *Eppendorf* 5415 D;
- Equipamento de electroforese;
- Espectofotómetro *BioRad Smartspec* 3000.
- Filme para raios X;
- Forno de hibridização;
- Forno de microondas;
- Membrana;
- Micropipetas;
- *Miniblotter*;
- Termociclador *Biorad iCycler*.

### 4.2.2 Reagentes

- Acetato de sódio (CH<sub>3</sub>COONa) a 3M;
- Brometo de etídio;
- Conjugado estreptavidina-POD;
- dNTP's (10 mM);
- EDTA;
- Etanol a 70% e 100%;
- Fenol/clorofórmio/álcool isolamílico (P/C/AI na proporção 25:24:1);
- Fixador;
- MgCl<sub>2</sub> (15 mM);
- PBS-0;
- *Primers* (100 pmol);

- Reagentes de detecção ECL;
- Revelador de raios X;
- SDS a 1% e 10%;
- SSPE;
- Taq (5 U/  $\mu$ l);
- TBE.

### 4.3 Métodos

#### 4.3.1 Amostragem

Foram obtidas 110 amostras, tendo sido colectadas 39 larvas e 39 ninfas de *A. hebraeum* na área do *campus* da Faculdade de Veterinária da Universidade Eduardo Mondlane e 32 carraças adultas da mesma espécie na pelagem de bovinos em diversos pontos do distrito de Matituíne.

Para a colheita de larvas e ninfas, foi usado o método *dragging*, descrito por Guerra *et al.* (2002), que consiste no arrastamento de um conjunto formado por onze tecidos peludos, alongados, iguais em dimensão e dispostos paralelamente, pela área de pasto em percursos lineares de 100 m. Estes tecidos estão unidos perpendicularmente a uma vara que foi puxada com a ajuda de uma corda (figura 7 no anexo 2).

As carraças adultas foram colectadas directamente da pele de bovinos no distrito de Matituíne. A tabela 1 mostra os pontos de amostragem:

Tabela 1. Os diferentes pontos de colheita de carraças adultas no distrito de Matituíne.

Ponto de amostragem	Latitude			Longitude		
	Graus	Minutos	Segundos	Graus	Minutos	Segundos
Zitundo	26	44	59	32	49	12
Mudada	26	26	53	32	38	12,5
Tinonganine	26	29	36	32	34	28,6
Sadula	26	16	58,3	32	38	40,9
Indane	26	19	24,6	32	25	10,9

As amostras foram conservadas em tubos contendo etanol a 99,9%. Os mesmos foram rotulados indicando-se o local, a data e o respectivo estágio de desenvolvimento.

Observações realizadas com a ajuda de uma lupa binocular permitiram a identificação dos espécimes, o que assegurou que se tratasse realmente de *A. hebraeum*, de acordo com a descrição de Occi (2004) e Ruedisueli e Manship (s.d.) (ver figura 8 no anexo 3). A distinção entre as larvas e ninfas foi feita principalmente com base no número de apêndices, pois estas possuem três e quatro pares, respectivamente. Os adultos identificaram-se facilmente pelo facto de possuírem um escudo dorsal visivelmente ornamentado, com cores mais vivas.

#### **4.3.2 Extracção do ADN a partir das Carraças**

A extracção do ADN foi feita com base no método desenvolvido por d'Oliveira *et al.* (1997) como descrito no anexo 2.

#### **4.3.3 Electroforese em Gel de Agarose**

A electroforese foi feita em gel de agarose 1% onde adicionou-se brometo de etídio e deixou-se solidificar numa cuba de electroforese. Após a mudança de fase, as amostras foram misturadas com 2 µl de tampão de carregamento (*leading buffer*) e depositadas nos poços. Em seguida, ligou-se o eléctrodo, fazendo-se correr as amostras a 100 volts durante 1 h. Depois, observou-se o resultado num transluminador de luz ultravioleta.

#### **4.3.4 Espectrofotometria**

As amostras de cada estágio de crescimento, após a extracção, foram submetidas a este processo. Para tal, fez-se uma diluição das amostras de 1:20 em água milliQ. Depois de se calibrar o espectrofotómetro usando-se 100 µl de água milliQ, registaram-se os índices de quantidade de ADN ( $A_{260}$ ), contaminação por ARN ( $A_{280}$ ) e quantidade de impurezas ( $A_{320}$ ), pureza do ADN ( $A_{260}/A_{280}$ ) e concentração do ADN.

#### **4.3.5 Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Esta reacção foi efectuada de acordo com o protocolo descrito por Rosário *et al.* (2005) citado por CB-UEM (s.d.). Foi usado um *primer reverse* B-GA1B (biotina - 5'CGGGATCCCGAGTTTGCCGGGACTTCT) conjugado com uma molécula de biotina na extremidade 5' e um *primer forward* 16S8FE (GGAATTCCAGAGTTGGATCMTGGYTTCAG).

O volume de reacção foi 50 µl e usou-se 5 µl de ADN, tendo-se preparado a mistura de acordo com a descrição da tabela 2 e a programação do termociclador está descrita na tabela 3.

Tabela 2. Quantidades dos reagentes que serão misturados e submetidas a PCR.

Reagente	Concentração de reacção
H <sub>2</sub> O	-
Tampão	1x
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
dNTPs	200 µM
<i>Primer forward</i>	0,02 pmol
<i>Primer reverse</i>	0,02 pmol
Taq	1,25 U/µl
ADN	-

Tabela 3. Programação do número de ciclo, da temperatura e da respectiva duração para serem aplicados no termociclador, durante a PCR (Muramatsu *et al*, 2005).

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Processo
1	94	10	Desnaturação inicial
2	94	20	Desnaturação
	67	30	Anelamento dos <i>primers</i>
	72	30	Extensão dos <i>primers</i>
2	94	20	Desnaturação
	65	30	Anelamento dos <i>primers</i>
	72	30	Extensão dos <i>primers</i>
2	94	20	Desnaturação
	63	30	Anelamento dos <i>primers</i>
	72	30	Extensão dos <i>primers</i>
2	94	20	Desnaturação
	61	30	Anelamento dos <i>primers</i>
	72	30	Extensão dos <i>primers</i>
2	94	20	Desnaturação
	59	30	Anelamento dos <i>primers</i>
	72	30	Extensão dos <i>primers</i>
40	94	20	Desnaturação
	57	30	Anelamento dos <i>primers</i>
	72	30	Extensão dos <i>primers</i>



#### 4.3.6 Reverse Line Blotting (RLB)

O RLB foi realizado de acordo com o protocolo descrito no *kit* TBD-RLB da *Isogen Lifescience* descrito por Tauofik *et al.* (s.d.) (ver anexo 2).

### 5 Resultados

A espectrofotometria permitiu a confirmação da presença do ADN (tabelas 1, 2 e 3 do anexo 4).

Tanto para as larvas como para as ninfas e adultos, a película não evidenciou nenhum caso de hibridização senão para os controles, o que significa que nenhuma das amostras usadas na experiência detectou a presença do ADN de *E. ruminantium*, isto é, os resultados foram negativos (figura 1; figuras 14 e 15 do anexo 3).

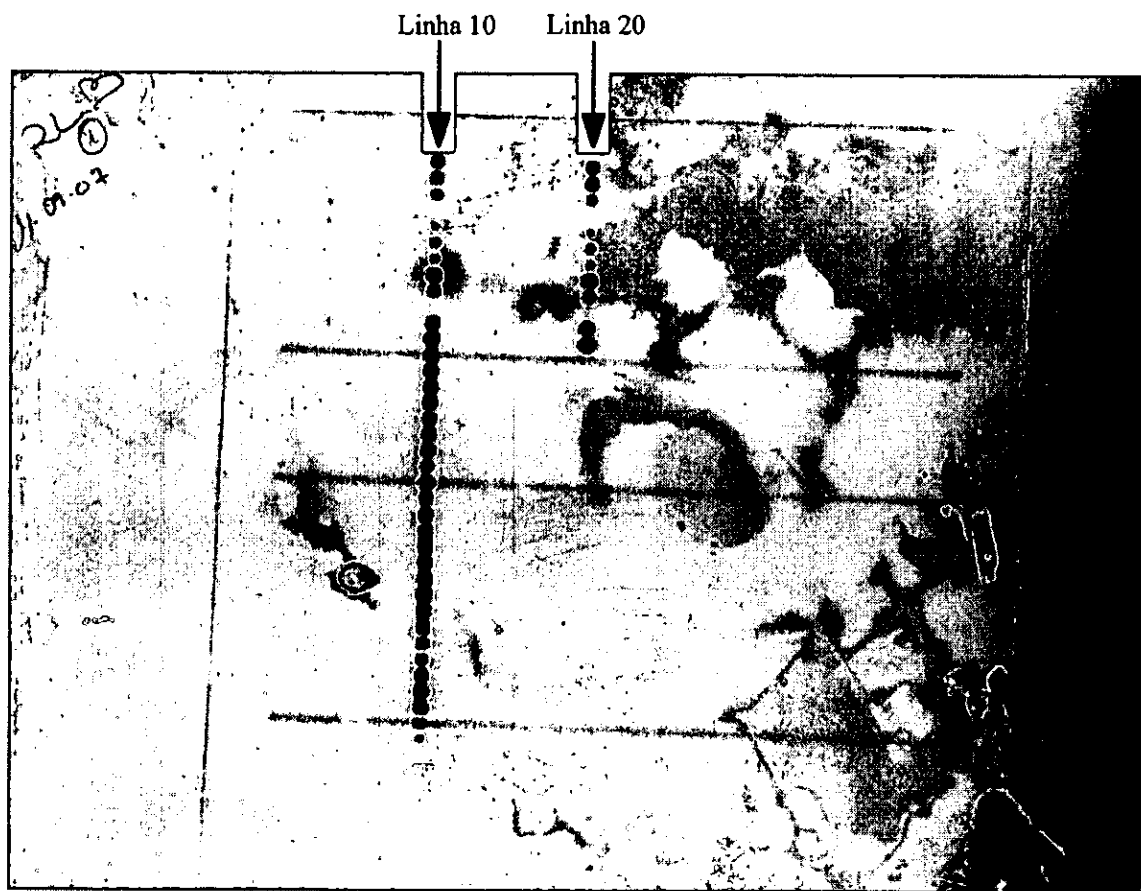


Figura 1. Resultado do RLB das primeiras 40 amostras. A linha 10 tem uma mistura de controlos *Ehrlichia/Anaplasma*, *Babesia* e *Theileria* e a linha 20 tem o controlo *Ehrlichia/Anaplasma*. Observe-se que os resultados foram negativos para todas as amostras.

## 6 Discussão

Uma vez que a experiência foi realizada de acordo com metodologias previamente usadas com sucesso, nomeadamente o método de amostragem de Guerra *et al.* (2002), extracção de acordo com o protocolo de d'Oliveira *et al.* (1997) e o RLB (incluindo a PCR), efectuado como foi descrito por Taoufik *et al.* (s.d.). O resultado do RLB sugere primariamente que nenhuma das amostras testadas encontrava-se parasitada pelo microrganismo causador da ehrliquiose. Os resultados da espectrofotometria mostram que a extração foi efectuada com sucesso, pois o ADN extraído possui uma concentração que permite a sua aplicação em métodos comuns de Biologia Molecular, apesar de ter havido um ligeiro índice de contaminação, pois há valores da razão  $A_{260}/A_{280}$  abaixo de 1,7 e acima de 2 (segundo o manual de instruções do espectrofotómetro), descartando deste modo a possibilidade de inibição da amplificação do ADN. Entretanto, estes resultados são diferentes dos obtidos por Asselbergs *et al.* (1993) num estudo feito usando o método de imunofluorescência, e Bekker *et al.*, que usaram RLB para detectar *E. ruminantium* em amostras de sangue e carraças, pois estes autores constataram a existência da riquetsia na área de estudo. Schouls *et al.* (1999) também detectaram espécies de *Ehrlichia* em 45% de 121 amostras de carraças usando o RLB. Outros autores que detectaram *E. ruminantium* usando o RLB foram Faburay *et al.* (2005) num estudo de prevalência da ehrliquiose em pequenos ruminantes na Gâmbia.

Segundo Bezuienhout *et al.* (1994), a chuva normalmente causa um aumento na prevalência da doença, apesar de a ocorrência da ehrliquiose não ser estritamente sazonal. O facto de muitas amostras terem sido colhidas num período seco pode também ter influenciado nos resultados negativos obtidos, uma vez que neste período a quantidade de ehrliquias por carraça poderia estar abaixo dos limites de detecção do método de diagnóstico utilizado.

É também importante ressaltar que o resultado não permitiu uma comparação conclusiva entre as diferentes frequências de infecção tendo em conta os estágios de crescimento. Segundo Norval *et al.* (1990), há uma diferença entre as taxas de infecção entre diferentes estágios de crescimento, tendo os adultos uma taxa superior à das ninfas. Contudo, é importante ressaltar que estes autores compararam apenas ninfas e adultos, para além de o estudo ter sido realizado no Zimbábwe, pois Bezuienhout *et al.* (1994) afirmam que as taxas de infecção variam de região para região, o que significa que as taxa de infecção no nosso país podem ser diferentes. Um resultado semelhante

(maior frequência de infecção de adultos) foi encontrado por Schouls *et al.* (1999) usando RLB. Porém, estes autores, para além de terem realizado a experiência com base em espécies de carraças colhidas na Alemanha, não fazem a distinção de todas as espécies de *Ehrlichia* detectadas. Os estudos acima mencionados provam que de um modo geral podem haver diferenças significativas nas frequências de infecção entre os diferentes estágios de crescimento das carraças e que o RLB pode ser usado para se obter informações necessárias para efectuar tal comparação.

O RLB foi efectuado com sucesso, uma vez que os controlos positivos deste método foram observados após a revelação no filme de raios X, indicando a hibridação destes na membrana com as respectivas sondas. A falta de um controle positivo de extracção, isto é, uma amostra conhecida positiva à ehrliquiose dificultou a optimização da técnica.

## 7 Conclusão

Na presente experiência, o RLB mostrou-se como sendo um potencial candidato a método de diagnóstico da *E. ruminantium*, uma vez que este foi efectuado com sucesso. Entretanto, em nenhuma das amostras foi detectada a riquetsia, o que sugere uma baixa taxa ou inexistência de infecção das carraças na área de estudo. Deste modo, não foi possível comparar as frequências de infecção entre as *A. hebraeum* em diferentes estágios de crescimento (larvas, ninfas e adultas).

## 8 Recomendações

Recomenda-se a inclusão de outras regiões com prevalência da ehrliquiose e colheita de amostras em diferentes épocas do ano. É também recomendável o uso de controlos positivos e negativos em todos os métodos envolvidos (extracção, PCR e RLB), pois estes podem dar mais consistência ao estudo.

Um estudo experimental controlado em que se infectem animais com sangue de animais positivos é recomendável, pois permite melhor acompanhamento de todo o desenvolvimento dos principais factores relacionados com a patologia.

Métodos alternativos como a PCR usando-se *primers* específicos e métodos serológicos permitiriam uma constatação mais aprimorada do problema em estudo, pois alguns procedimentos envolvidos na presente metodologia são muito delicados e susceptíveis a influência de factores diversos.

## 9 Bibliografia

Agterveld e Zwart (2004). Manual reverse line blotting hibridization. Netherland Institute of Ecology.

Anónimo (2005). Heartwater. 3 pp. Iowa State University.

Anónimo (2007). Faculdade de Veterinária: Missão. Maputo. UEM. Disponível no site <http://www.veterinaria.uem.mz/vet/missao.htm> pesquisado em 13 de Junho de 2007.

Asselbergs, M., F. Jongejan, A. Langa, L. Neves, and S. Afonso (1993). Antibodies to *Cowdria ruminantium* in Mozambican goats and cattle detected by immunofluorescence using endothelial cell culture antigen. In: Tropical Animal Health Production, 25, pp. 144 – 150.

Bekker, C. P. J. , D. Vink, C. M. L. Pereira, W. Wapenaar, A. Langa e F. Jongejan (2001). Heartwater (*Cowdria ruminantium* infection) as a cause of postrestocking mortality of goats in Mozambique. In: Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, vol 8, no. 4, pp. 843 – 846.

Bekker, C. P. J. , S. Vos, A. Taoufik, O. A. E. Sparagano e F. Jongejan (2002). Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hibridization. In: Veterinary Microbiology 89, pp. 223 – 238.

Bezuidenhout, J. D., L. Prozesky, J. L. du Plessis e S. R. van Amstel (1994). Heartwater. In: Coetzer, J. A. W., G. R. Thomson e R. C. Tustin (1994). In: Infectious Diseases of Livestock, volume 1, pp. 351 – 370.

Bryson, N. R., I. G. Horak, E. H. Venter e C. E. Yunker. Collection of free-living nymphs and adults of *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae) with pheromone/carbon dioxide traps at 5 diferente ecological sites in heartwater endemic regions of South Africa. In: Experimental and Applied Acarology, volume 24, number 12, pp. 971 – 982.

CB-UEM (s. d.). PCR, pp. 2 – 4. Maputo. UEM.

CB-UEM (2005). Normas, pp. 3-4. Maputo. UEM.

Collins, N. E., J. Liebenberg, E. P. De Villiers, K. A. Brayton, E. Louw, A. Pretorius, F. E. Faber, H. van Heerde, A. Josemans, M. van Kleef, H. C. Steyn, M. Fransie van Strijp, E. Zweygarth, F. Jongejan, J. C. Maillard, D. Berthier, M. Botha, F. Joubert, C. H. Corton, N. R. Thomson, M. T. Allsopp e B. A. Alsopp (2005). The genome of the heartwater agent *Ehrlichia ruminantium* contains multiple tandem repeats of actively variable copy number. In: PNAS, vol. 103, no. 3, pp. 838 – 843.

d'Oliveira, C., M. van der Weide, P. Jacquet e F. Jongejan (1997). Detection of *Theileria annulata* by the PCR in ticks (Acari: Ixodidae) collected from cattle in Mauritania. In: Experimental & Applied Acarology, 21, pp. 287 - 291

dos Anjos, F. (em preparação). Mapa da Área de Pasto da Faculdade de Veterinária.

Faburay, B., S. Munstermann, D. Geysen, L. Bell-Sakyi, A. Ceesay, C. Bodaan F. e Jongejan (2005). Point seroprevalence survey of *Ehrlichia ruminantium* infection in small ruminants in the Gambia. In: Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, vol. 12, no. 4, pp. 508 – 512.

Faburay, B., D. Geysen, S. Munstermann, L. Bell-Sakyi e F. Jongejan (2007). Longitudinal monitoring of *Ehrlichia ruminantium* infection in Gambian lambs and kids by pCS20 PCR and MAP I-B ELISA. In: BMC Infectious Diseases. 11 pp.

Góes-Neto, A., C. Loguercio-Leite e R. T. Guerrero (2005). DNA extraction from frozen field-collected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods. In: Biotemas, vol. 18 (2), pp. 19 – 32.

Guerra, M., E Walker, C. Jones, S. Paskewitz, M. R. Cortinas, A. Stancil, L. Beck, M. Bobo e U. Kitron (2002). Predicting the risk of Lyme disease: habitat suitability for *Ixodes Scapularis* in the north central United States. In Emerging Infectious Diseases, vol 8 (3), pp. 289 – 97.

Guinda, E. F. X. (2004). Estabelecimento da Técnica “Reverse Line Blotting” para Detecção de Hemoparasitas Bovinos Transmitidos por Carrças numa Exploração Pecuária de Umbeluzi. Tese de Licenciatura. pp. 20 – 46. Maputo. UEM.

Grubbels, J. M., A. P. de Vos, M. W. Weide, J. V. Visceras, L. M. Schouls, E. Vrie e F. Jongejan (1999). Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting hybridization. Journal of Clinical Microbiology, 37, pp. 1782 – 1789.

Harrison, T. R. (2002). Manual de Medicina. 15ª edição, pp. 489. Rio de Janeiro. McGraw-Hill.

Jongejan, F. e G. Uilenberg (2004). The global importance of ticks. In: Parasitology, 129, 12 pp. UK Cambridge University Press.

Kaufhold, A., A. Pidibieldski, A. Baumgarten, M. Blokpoel, J. Top e L. Schouls (1994). Rapid typing of a group A streptococci by the use of DNA amplification and non-radioactive allele-specific oligonucleotide probes. In: FEMS Microbiology Letters, 119, pp. 19 – 29.

Kleef, M. V., H. Macmillan, N. J. Gunter, E. Zweygarth, B. A. Allsopp, V. Shkap, D. H. du Plessis, W. C. Brown (2002). Low molecular weight proteins of *Cowdria ruminantium* (Welgevonden isolate) induce bovine CD4<sup>+</sup>-enriched T-cells to proliferate and produce interferon- $\gamma$ . In: Veterinary Microbiology 85, pp. 259 – 273.

Lima, N. e M. Mota (2003). Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações, pp. 143 – 146. Lisboa. Lidel – edições técnicas, lda.

Losos, G. J. (1986). Infectious Tropical Diseases of Domestic Animals, pp. 817 – 831. Canada. Longman Scientific Technical.

MAE (ed.) (2005). Perfil do Distrito de Matituíne, pp. 2 – 3. Ministério da Administração Estatal. Maputo.

Mahan, S.M., B. Allsopp, K.M. Kocan, G.H. Palmer and F. Jongejan (1999). Vaccine strategies for *Cowdria ruminantium* infections and their application to

- other ehrlichial infections. In: Parasitology Today, vol 15, no. 7, pp. 290 – 294. Elsevier Science.
- Martinez, D., J. C. Maillard, S. Coisne, C. Sheikboudou e A Bensaid (1994). Protection of goats against heartwater acquired by immunisation with inactivated elementary bodies of *Cowdria ruminantium*. In: Veterinary Immunology and Immunopathology, 41, pp. 153 – 163. Elsevier Science B. V..
- Minjauw, B., D. Elsworth, C. Wells, S. Mwaura, R. Kruska, T. Robinson e R. Nijbroek (2006). Potential distribution of *Ehrlichia ruminantium*. Scotland. University of Edinburgh. Disponível no site [http://www.bi.up.ac.za/Ehrlichia\\_ruminantium/Heartwater/Erums\\_distribution.html](http://www.bi.up.ac.za/Ehrlichia_ruminantium/Heartwater/Erums_distribution.html) pesquisado em 1 de Novembro de 2007.
- Moreira, D. (1998). Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. In: Nucleic Acids Research, vol. 26, No. 13, pp. 3309 – 3310. UK. Oxford University Press.
- Muramatsu, Y., S. Ukegawa, A. Rahim, E. Hussein, M. B. A. Rahman, K. M. A. A. Gabbar, A. M. Chitambo, M. T. Komiya, E. T. Mwase, C. Morita e Y. Tamura (2005). *Ehrlichia ruminantium*, Sudan. In: Emerging Infectious Diseases, vol 11, No. 11, pp. 1792 – 1793. Disponível no site [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid) pesquisado em 30 de Abril de 2007.
- Occi, J. (2004). Bont tick. USA. University of Georgia. Disponível no site <http://www.forestryimages.org/browse/subthumb.cfm?sub=10615&start=1> pesquisado em 10 de Agosto de 2007.
- Peregrine, A. S. (1994). Chemotherapy and delivery systems: haemoparasites. In: Veterinary Parasitology, 54, pp. 223 -248. Elsevier.
- Powell, R. e F. Gannon (2002). Purification of DNA by phenol extraction and ethanol precipitation. In: Practical Approach Series. UK. Oxford University Series.
- Rey, L. (1992). Bases da Parasitologia Médica. pp. 318. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S.A..

Ruedisueli, F. L. e B. Manship (s.d). Tick identification key. University of Lincoln. Disponível no site <http://webpages.lincoln.ac.uk/fruedisueli/FR%2Dwebpages/parasitology/Ticks/TIK/tick%2Dkey/> pesquisado em 12 de Dezembro de 2007.

Schouls, L. M., I. van de Pol, S. G. Rijpkema, C. S. Schot (1999). Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and *Bartonella* in Dutch Ixodes ricinus ticks. In: Journal of Clinical Microbiology, volume 37 (7), pp. 2215 – 22.

Silva, M., A. S. Santos, P. Formosinho e F. Bacellar (2006). Carraças associadas a patologias infecciosas em Portugal. In: Acta Médica Portuguesa, 19, pp. 39 – 48.

Sorden, S. (2007). Image database: heartwater. Iowa State University. Disponível no site <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/ImageDB/imagesHW.htm> pesquisado em 30 de Novembro de 2007.

Taoufik, A., M. Sonneveld, A. Nijhof, R. Hamidjaja, V. Pillay, M. Oosthuizen, M. de Boer e F. Jongejan (s. d.). Reverse line blot hybridization kit for simultaneous detection of *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Babesia* and *Theileria* species. In: TBD-RLB Kit. Isogen Life Science, 27 pp.

Tutt, C. L. C. (2002). The clinical effects of dimethyl sulfoxide in sheep suffering from experimentally induced heartwater. University of Pretoria.

Uilenberg, G. (1995). International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. In: Veterinary Parasitology 57, pp. 19 – 41.

van Heerden, H., N. E. Collins, K. A. Brayton, C. Rademeyer, B. A. Allsopp (2004). Characterization of a major outer membrane protein multigene family in *Ehrlichia ruminantium*. Gene, 330, pp. 159 – 168.

Williams, S. (2003). Heartwater. In: Persistence of Disease Agents in Carcasses and Animal Products. pp. 120. Animal Health of Australia.



## Anexo 1. RLB (Reverse Line Blot)

O RLB, onde amostras múltiplas podem ser analisadas contra múltiplas sondas, permitindo a detecção simultânea de diversos parasitas, foi originalmente desenvolvido originalmente para serótipos *Streptococci*. Actualmente, existe o *kit* que permite a detecção de *Ehrlichia/Anaplasma* e *Theileria/Babesia*.

Os oligonucleotídeos são deduzidos na região hipervariável que é amplificada no primeiro passo da PCR. Os oligonucleotídeos específicos para a espécie são aplicados em linha usando um *miniblotter* e se encontram ligados covalentemente à membrana pela terminal *aminolinker* 5' (figura 1). Os produtos PCR são aplicados à membrana, usando o *miniblotter* (figura 2), de modo que a direcção dos produtos da PCR seja perpendicular à dos oligonucleotídeos (figura 3).

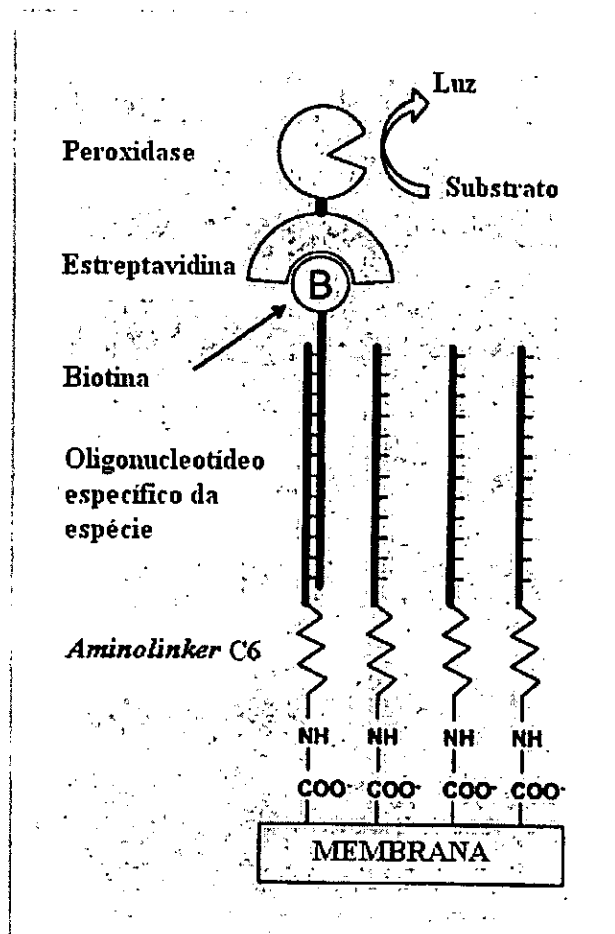


Figura 1. Representação esquemática do princípio de hibridização (Tauofik, s.d.).

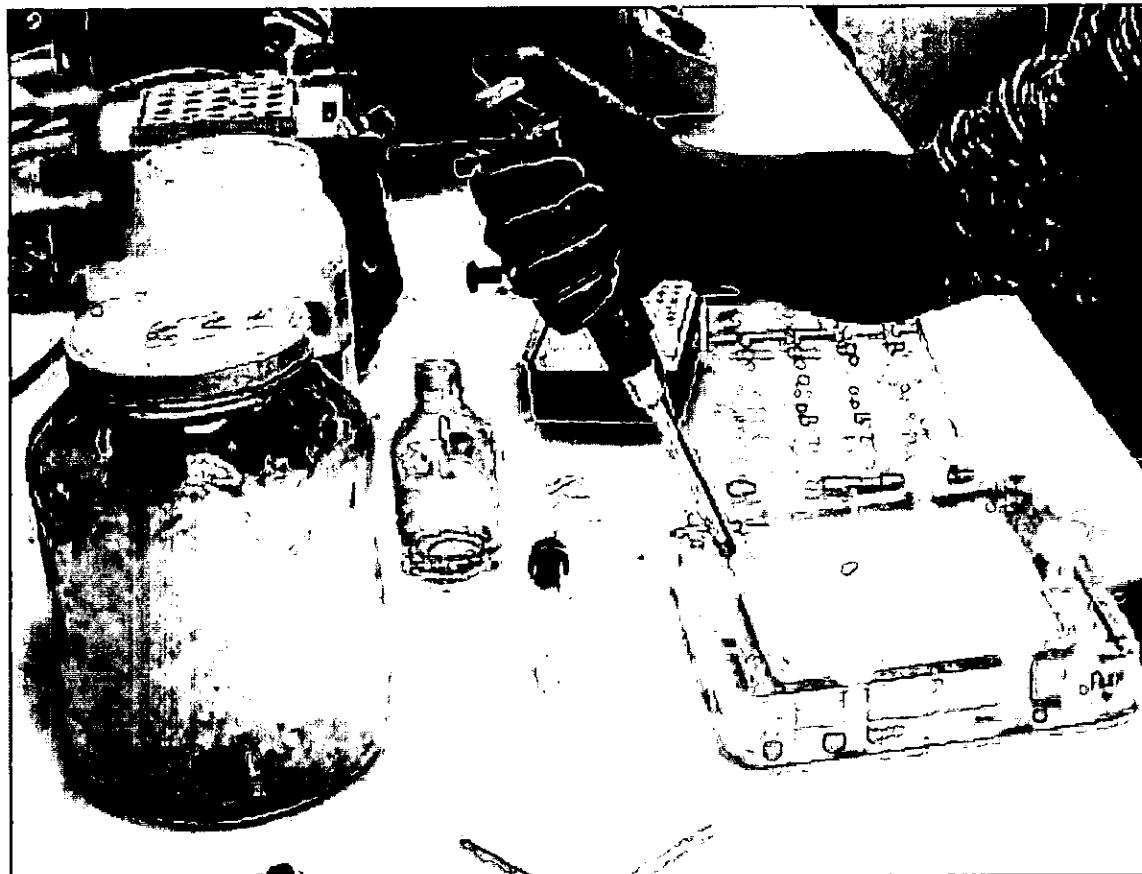


Figura 2. Introdução das amostras em um *miniblotter* (Agterveld e Zwart, 2004).

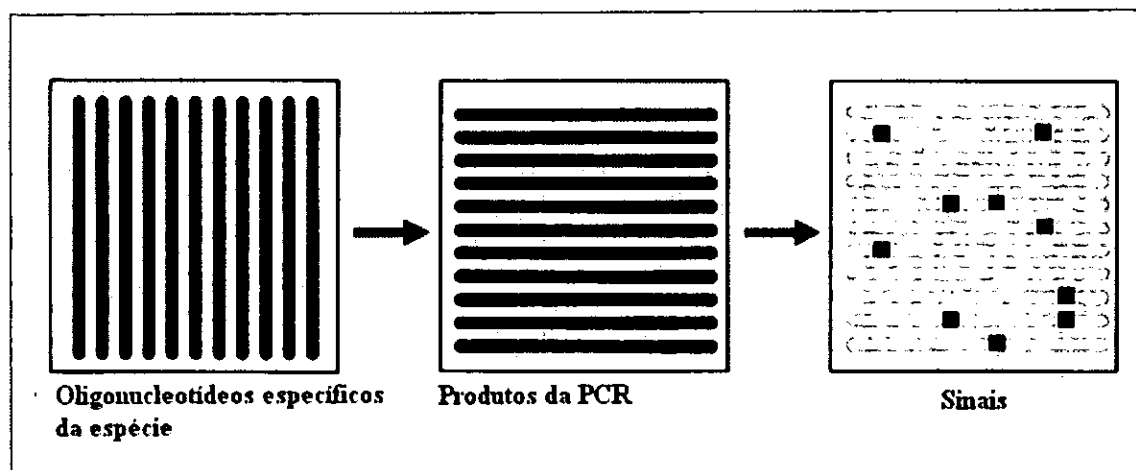


Figura 3. Representação esquemática do ensaio RLB (Tauofik, s.d.).

## Anexo 2. Protocolos

### Extracção de ADN a partir das Carraças

Lavou-se cada carraça duas vezes em etanol a 70%, agitando-se num tubo *Falcon* de 50 ml. Em seguida, lavou-se duas vezes em água destilada, agitando-se num tubo *Falcon* de 50 ml. Depois de se absorver a humidade dos artrópodes, estes foram postos

em papel *Whatmann* e cortados ao longo do comprimento do corpo com a ajuda de uma lâmina. Depois disso, foram colocados no interior do tubo *ependorf* de 1,5 ml.

Adicionou-se 200 µl de PBS-0 em cada tubo e pôs-se a ferver durante 10 minutos. Em seguida, deixou-se arrefecer à temperatura ambiente durante 5 minutos. Centrifugou-se durante 30 segundos para a eliminação das gotas de água da tampa.

Depois da centrifugação, adicionou-se 20 µl de SDS a 10%. Centrifugou-se novamente durante 5 minutos à velocidade máxima. Retirou-se o sobrenadante e transferiu-se para um *ependorf* limpo.

Fez-se a extracção do ADN em 2x fenol/clorofórmio/álcool isolamílico (25:24:1) a pH 7,8 do seguinte modo:

1. Juntou-se 200 µl de P/C/AI, misturou-se durante 10 segundos no vórtex e centrifugou-se durante 5 minutos;
2. Transferiu-se a fase aquosa (fase superior) para um tubo limpo, com 200 µl de P/C/AI, misturou-se num vórtex e centrifugou-se novamente durante 5 minutos;
3. Transferiu-se cuidadosamente a fase aquosa para um tubo limpo sem que se perturbasse a interfase.

Depois, fez a precipitação em etanol de acordo com os três passos seguintes:

1. Estimou-se o volume da fase aquosa com a ajuda de uma pipeta (~ 175 µl);
2. Adicionou-se CH<sub>3</sub>COONa a 3M, pH 5,3 de modo a acrescentar-se 1/10 do volume;
3. Acrescentou-se 2,5 volumes de etanol a 100%.

Uma vez feita a precipitação, misturou-se e incubou-se durante 30 minutos a -80 °C, ou deixou-se *overnight* a -20 °C. Centrifugou-se durante 15 minutos à velocidade máxima numa centrífuga pré-arrefecida a 4 °C.

Retirou-se o sobrenadante, lavou-se o *pellet* com 500 µl de etanol a 70% conservado a gelo -20 °C. Depois, centrifugou-se durante 5 minutos à velocidade máxima a 4 °C.

Descartou-se o sobrenadante e fazer uma centrifugação rápida. Retirou-se, na medida do possível, novamente sem que se destruísse o *pellet*. Por fim, ressuspendeu-se o *pellet* em 50 µl de água MilliQ e armazenou-se a -20 °C.

## Extracção de ADN a partir das Carraças

### Etapa Preliminar

Solubilizou-se cada controle positivo liofilizado (*Anaplasma*, *Babesia* e *Theilleria*) em 75 µl de MilliQ. Depois, prepararam-se alíquotas de 2,5 µl dos controles An, Ba e Th e armazenaram-se a -20 °C.

Em seguida, foram preparadas as seguintes misturas:

- Mistura 1: 2,5 µl An + 2,5 µl Ba + 2,5 µl Th + 150 µl 2 x SSPE/ 0,1% SDS;
- Mistura 2: 2,5µl An + 150 µl 2 x SSPE/ 0,1% SDS.

### Hibridização

Diluíram-se os produtos da PCR: 10 µl do produto de PCR em 150 µl de 2 x SSPE/ 0,1% SDS em tubos de 500 ml. Em seguida, estes foram desnaturados, por 10 minutos a 100 °C, num termociclador e arrefecidos em gelo imediatamente. Logo a seguir ao arrefecimento, centrifugou-se rapidamente.

Incubou-se a membrana, durante 5 minutos à temperatura ambiente, em aproximadamente 10 ml de 2 x SSPE/ 0,1% SDS. Pôs-se a membrana no *miniblotter* sobre a almofada, com poços perpendiculares ao padrão de linhas das sondas aplicadas. Removeu-se o excesso de líquido por aspiração.

Os poços foram enchidos com o produto da PCR diluído e desnaturado sem que se formassem bolhas de ar. Nos poços laterais, pôs-se 2 x SSPE/ 0,1% SDS, para se evitar que houvesse cruzamento entre amostras. Incubou-se a 42 °C por 60 minutos num forno de hibridização.

Extraiu-se o excesso de amostras por aspiração e retirou-se a membrana do *miniblotter*. Lavou-se a membrana duas vezes em 2 x SSPE/ 0,5% SDS pré-aquecido, a 50 °C em banho-maria por 10 minutos, com agitação moderada. Adicionou-se à membrana 10 ml de 2 x SSPE/ 0,5% SDS e 2,5 µl de estreptavidina-POD (marcada com peroxidase) e incubou-se durante 30 minutos a 42 °C.

Lavou-se a membrana duas vezes com 2 x SSPE/ 0,5% SDS pré-aquecido, durante 10 minutos a 42 °C em banho-maria sob agitação moderada. Lavou-se novamente a membrana duas vezes com 2 x SSPE durante 5 minutos à temperatura ambiente sob agitação moderada. Em seguida, colocou-se a membrana entre folhas transparentes. Foram espalhados 10 ml de solução de ECL pré-misturada (5 ml ECL1 e 5 ml de ECL2). Depois, cobriu-se a membrana com folhas transparentes e retiraram-se as bolhas de água-fazendo rolar um tubo sobre as folhas.

As bolhas de ar foram retiradas fazendo-se rolar um tubo sobre as folhas transparentes. Incubou-se a membrana durante 1 minuto à temperatura ambiente. Depois colocou-se a membrana entre duas folhas transparentes limpas e, por sua vez, foi tudo colocado na cassete de exposição.

### **Revelação**

Expôs-se o filme a raios X durante 5 a 20 minutos. Em seguida, revelou-se a película de raios X do seguinte modo:

1. Meteu-se o filme no revelador e agitou-se;
2. Meteu-se no fixador e agitou-se;
3. Lavou-se com água corrente:

### **Lavagem do *Miniblottér* e da Membrana do RLB para Reutilização**

Lavou-se a membrana duas vezes com cerca de 100 ml de 1% SDS a 80 °C durante 30 minutos sob agitação moderada e, em seguida, uma vez com cerca de 100 ml de EDTA (20 mM à temperatura ambiente) durante 15 minutos sob agitação moderada. Depois, selou-se a membrana num saco plástico e guardou-se a 4 °C adicionando-se ~2 ml de EDTA (20 mM), pH 8.

### Anexo 3. Figuras

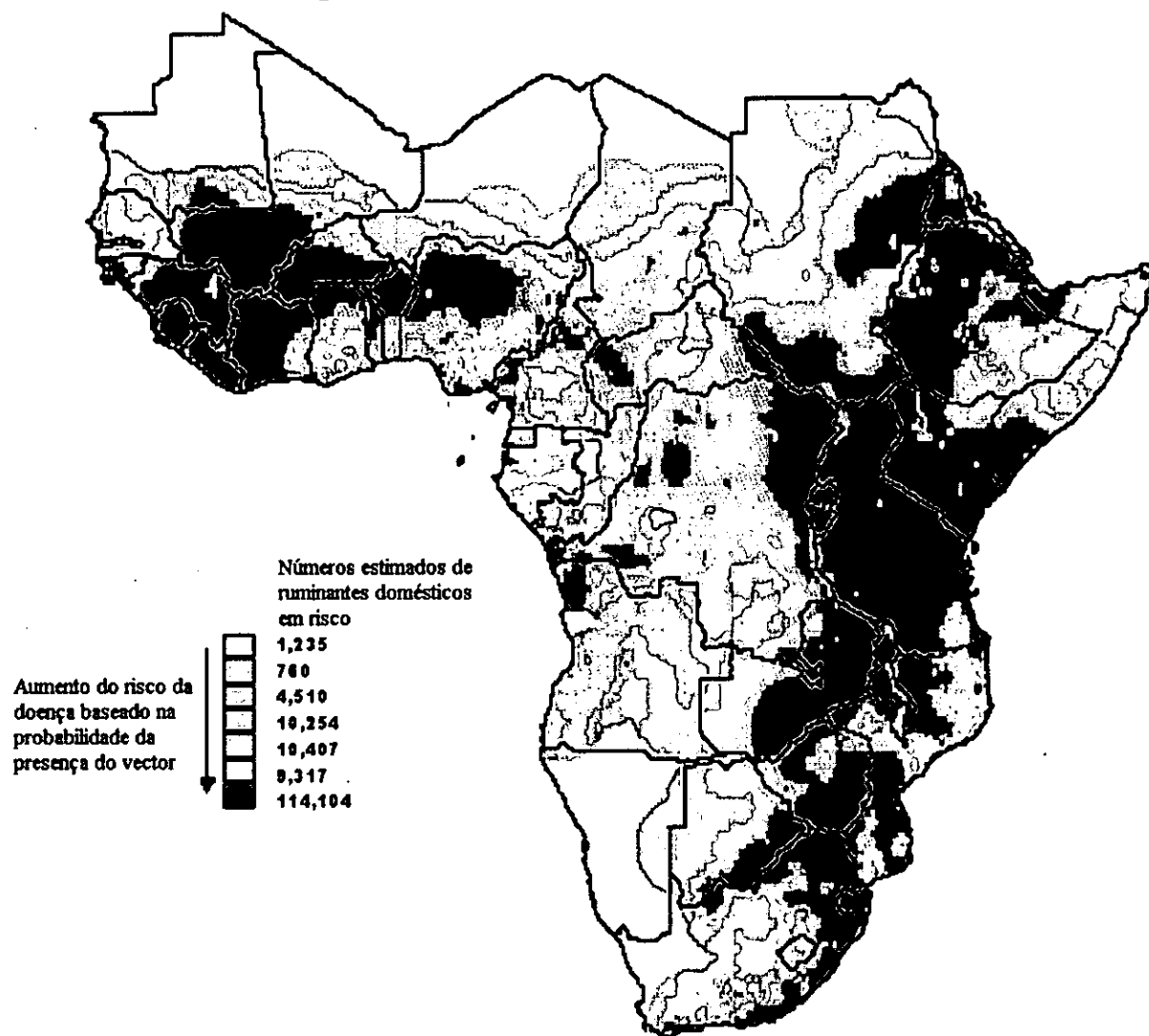


Figura 4. Distribuição potencial de *E. ruminantium* na África continental (Minjauw *et al.*, 2006).

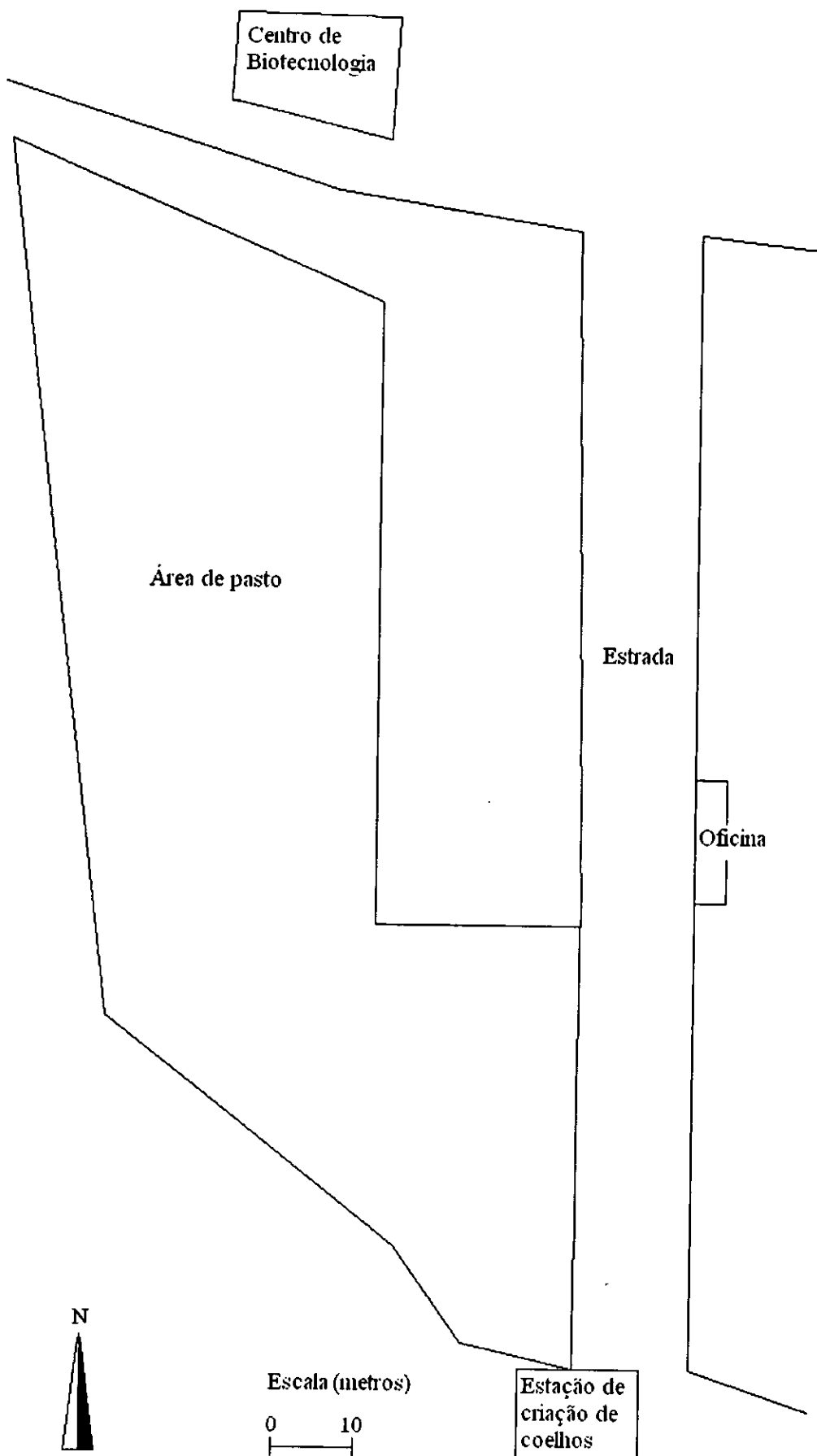


Figura 5. Mapa da área de pasto da Faculdade de Veterinária (dos Anjos, em preparação).



Figura 6. Parte da área de pasto da faculdade de veterinária. O *dragging* foi realizado neste campo.

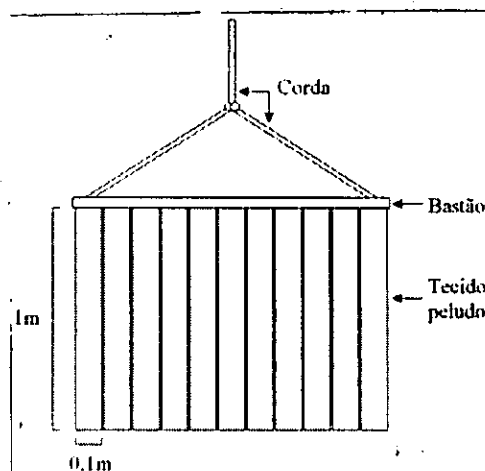


Figura 7. Instrumento usado para o *dragging*. Foto (à esquerda) e desenho com indicação das partes constituintes (à esquerda).



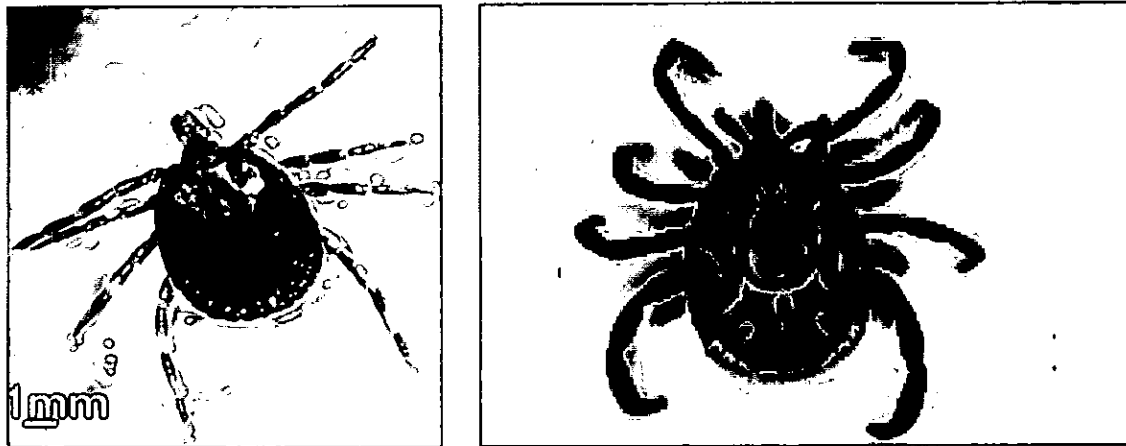


Figura 8. Vista dorsal de *Amblyomma hebraeum* fêmea (à esquerda) (Ruedisueli e Manship, s.d.) e macho (à direita). Com base na descrição feita por Ruedisueli e Manship (s.d), este artrópode possui algumas características particulares evidentes, nomeadamente um palpo longo, olhos presentes e festões bem desenvolvidos, escudo convexo (Occi, 2004).



Figura 9. Preparação de tecido do cérebro de um caprino. Uma célula endotelial contém uma mórula de *E. ruminantium* (Sorden, 2007).



Figura 10. Pulmão de um ovino. Observa-se um edema interlobular severo (Sorden, 2007).



Figura 11. Coração de um caprino. Observa-se muitas pequenas hemorragias na superfície endocardial (Sorden, 2007).



Figura 12. Abomasso de um pequeno ruminante. A mucosa contém petéquias disseminadas e hemorragias equimóticas coalescentes (Sorden, 2007).

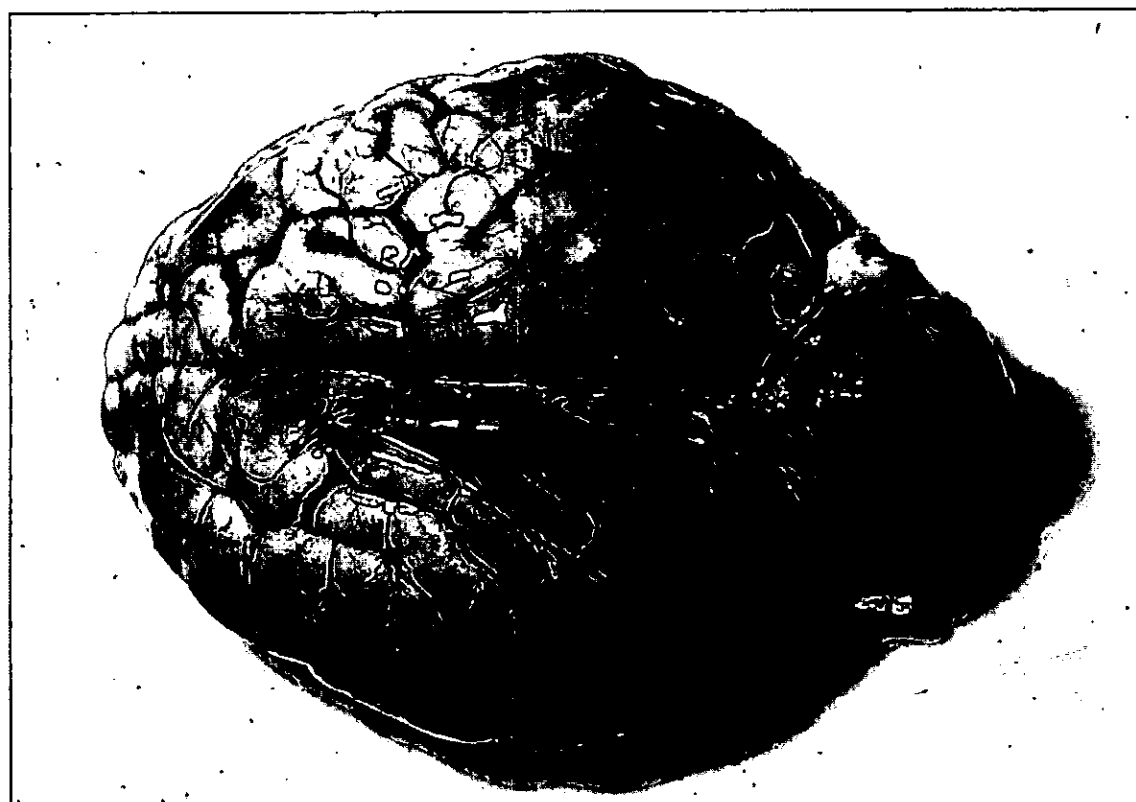


Figura 13. Cérebro de um ovino. As leptomeninges estão congestionadas e contêm pequenas hemorragias. Observa-se um edema cerebral (Sorden, 2007).

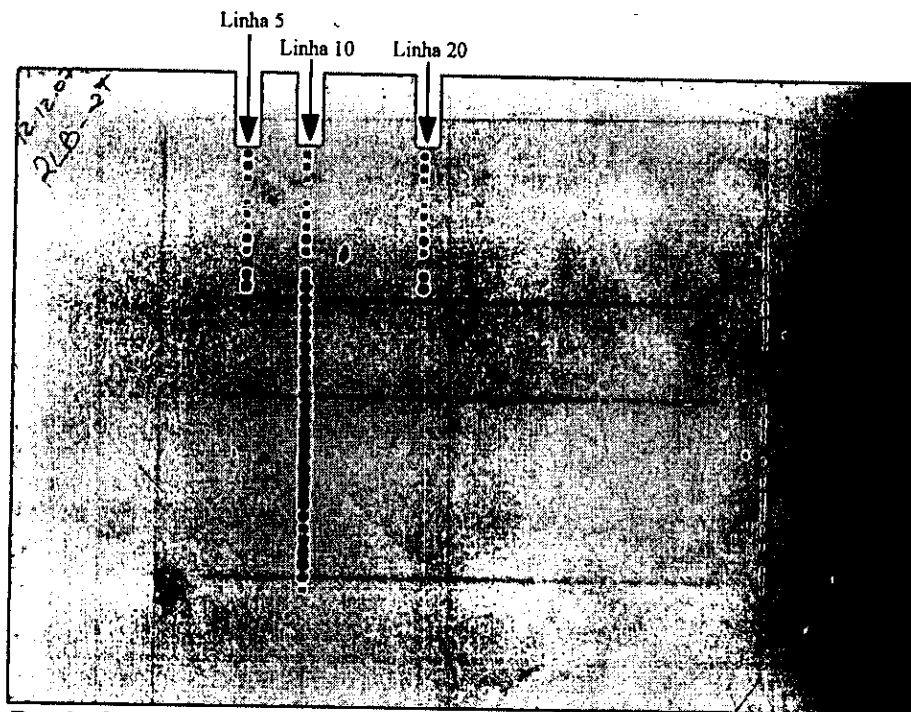


Figura 14. Resultado do RLB do segundo grupo de 20 amostras. A linha 10 tem uma mistura de controles *Ehrlichia/Anaplasma*, *Babesia* e *Theileria* e a linha 20 tem o controle *Ehrlichia/Anaplasma*. Observe-se que os resultados foram negativos para todas as amostras. Observe-se também a linha 5, que tem o controle *Ehrlichia/Anaplasma*. Este controle foi introduzido acidentalmente no poço 5.

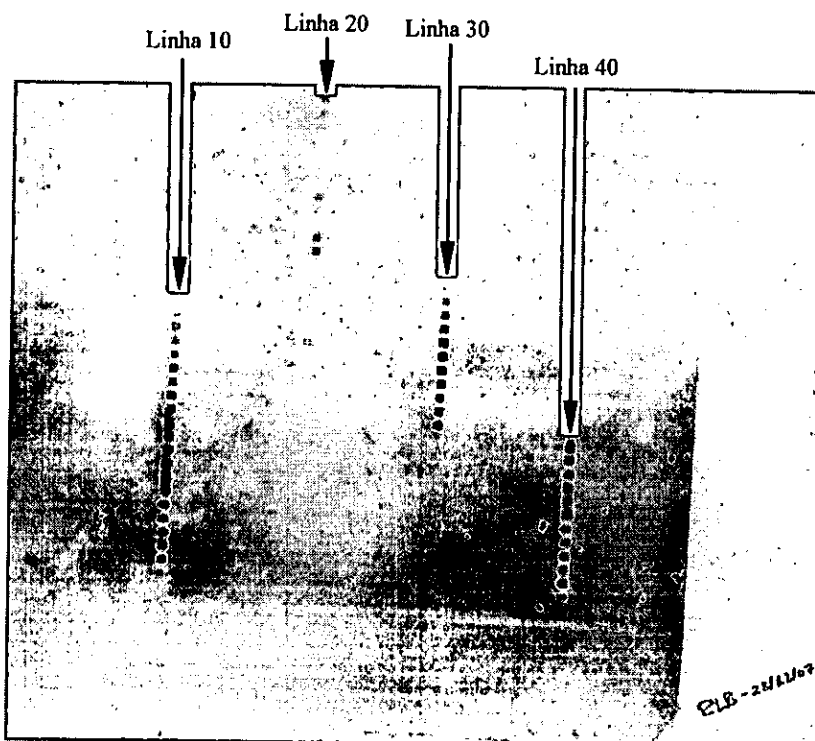


Figura 15. Resultado do RLB das primeiras 40 amostras. A linha 10 tem uma mistura de controles *Ehrlichia/Anaplasma*, *Babesia* e *Theileria*, a linha 20 tem o controle *Ehrlichia/Anaplasma*, a linha 30 tem o controle *Babesia* e a linha 40 *Theileria*. Observe-se que os resultados foram negativos para todas as amostras. Note-se que para o presente estudo apenas é importante o controle *Ehrlichia/Anaplasma*. Os restantes foram usados para outros estudos.

## Anexo 4. Tabelas de Resultados da Espectrofotometria

Tabela 1. Resultados da espectrofotometria do ADN extraído das amostras de larvas. Foram escolhidas vinte amostras aleatoriamente.

Amostras	A260	A280	A320	A260/A280	Concentração
1	0,117	0,074	0,010	1,5811	116,6129
2	0,140	0,037	0,001	3,7838	140,4679
3	2,792	1,434	0,686	1,9470	2792,3918
4	0,140	0,700	0,022	0,2000	140,1448
5	0,033	0,015	0,230	2,2000	32,7239
6	0,622	0,492	0,488	1,2642	622,1299
7	0,098	0,041	0,006	2,3902	97,7869
8	0,132	0,076	0,060	1,7368	132,4759
9	0,105	0,041	-0,007	2,5610	105,1600
10	0,691	0,495	0,243	1,3960	690,8738
11	0,259	0,152	0,540	1,7039	259,2130
12	0,107	0,073	0,022	1,4658	107,2469
13	0,083	0,036	0,018	2,3056	83,1218
14	0,140	0,059	0,038	2,3729	140,1448
15	0,175	0,068	0,012	2,5735	175,0419
16	0,066	0,037	0,007	1,7838	66,2079
17	0,052	0,090	0,005	0,5778	51,7659
18	0,044	0,028	0,018	1,5714	49,9448
19	0,076	0,041	0,002	1,8537	75,8319
20	0,076	0,040	0,012	1,9000	76,3879

**Tabela 2. Resultados da espectrofotometria do ADN extraído das amostras de ninfas. Foram escolhidas vinte amostras aleatoriamente.**

Amostras	A260	A280	A320	A260/A280	Concentração
1	0,395	0,215	0,075	1,8372	395,4999
2	0,207	0,135	0,015	1,5333	207,4111
3	0,055	0,033	0,006	1,6667	55,2390
4	0,650	0,027	-0,003	24,0741	65,3589
5	0,357	0,302	0,026	1,1821	357,1029
6	0,136	0,097	0,163	1,4021	136,2579
7	0,027	0,014	-0,002	1,9286	26,7420
8	0,028	-0,040	-0,018	-0,7000	18,2381
9	0,082	0,006	-0,070	13,6667	31,7140
10	0,040	0,035	0,001	1,1429	48,0740
11	0,381	0,187	0,065	2,0374	280,7150
12	0,005	0,018	0,010	0,2778	5,4159
13	0,054	0,053	0,012	1,0189	53,5750
14	0,024	0,034	0,020	0,7059	23,6299
15	0,248	0,136	0,025	1,8235	247,8969
16	0,278	0,145	0,020	1,9172	277,9219
17	0,312	0,190	0,004	1,6421	312,1819
18	0,276	0,144	0,005	1,9167	276,0699
19	0,258	0,175	0,007	1,4743	257,9720
20	0,236	0,136	0,028	1,7353	236,3610

Tabela 3. Resultados da espectrofotometria do ADN extraído das amostras de *A. hebraeum* adultas. Foram escolhidas vinte amostras aleatoriamente.

Amostras	A260	A280	A320	A260/A280	Concentração
1	0,072	0,038	0,005	1,8947	72,0539
2	0,018	-0,050	-0,030	-0,3600	18,2250
3	0,405	0,262	0,101	1,5458	404,5339
4	0,292	0,190	0,127	1,5368	291,8470
5	0,216	0,137	0,122	1,5766	215,9400
6	0,185	0,097	0,036	1,9072	185,3509
7	0,210	0,085	0,037	2,4706	209,7249
8	1,347	0,576	0,058	2,3385	1347,4490
9	0,406	0,214	0,081	1,8972	405,7488
10	0,581	0,317	0,034	1,8328	580,9269
11	0,527	0,242	0,018	2,1777	527,2639
12	1,589	0,797	0,045	1,9937	1589,1648
13	2,006	1,078	0,048	1,8609	2005,9900
14	0,369	0,216	0,023	1,7083	368,6118
15	0,368	0,158	0,008	2,3291	368,0000
16	0,610	0,334	0,029	1,8263	609,9849
17	0,304	0,182	0,045	1,6703	303,6559
18	1,201	0,831	0,499	1,4452	1200,5648
19	0,158	0,083	0,070	1,9036	157,8009
20	0,482	0,243	0,080	1,9835	481,6668

