

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CLONAGEM DO GENE *p28* E ANÁLISE DA EXPRESSÃO  
DA PROTEÍNA RECOMBINANTE A PARTIR DA AMOSTRA  
JABOTICABAL DE *Ehrlichia canis* E SUA APLICAÇÃO NO  
DIAGNÓSTICO DA ERLIQUIOSE CANINA**

**Andréa Cristina Higa Nakaghi**

Médica Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Março - 2008

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CLONAGEM DO GENE *p28* E ANÁLISE DA EXPRESSÃO  
DA PROTEÍNA RECOMBINANTE A PARTIR DA AMOSTRA  
JABOTICABAL DE *Ehrlichia canis* E SUA APLICAÇÃO NO  
DIAGNÓSTICO DA ERLIQUIOSE CANINA**

**Andréa Cristina Higa Nakaghi**

**Orientadora: Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Março – 2008

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**ANDRÉA CRISTINA HIGA NAKAGHI** – casada, nascida na cidade de São Paulo, em 02 de dezembro de 1973. É Médica Veterinária formada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal, da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, em 1999. Durante a graduação desenvolveu, na condição de bolsista de Iniciação Científica da FAPESP, pesquisa em Imunoparasitologia Veterinária, bem como, desenvolveu atividades de monitoria em Parasitologia Veterinária. Participou do Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária, na área de Clínica Veterinária de Pequenos Animais, no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - UNESP/ Jaboticabal, nos anos de 2000 e 2001. Ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Clínica Médica Veterinária (nível de mestrado) em março de 2002 sob a orientação da Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado, com dissertação intitulada: "Estudo comparativo entre métodos de diagnóstico direto e indireto de *Ehrlichia canis* em cães com suspeita clínica de erliquiose". Em março de 2004, ingressou Programa de Pós-graduação, em nível de doutorado, na mesma instituição e área de concentração.

*“ Fale, e eu esquecerei  
Ensine-me e eu poderei lembrar  
Envolva-me e eu aprenderei.”  
(Benjamin Franklin)*

*À minha filha Amanda e ao meu marido Massami.  
Minha família, o motivo de meus esforços, minha força e  
meu porto seguro.*

*Aos meus pais Akie e Yussei, pela dedicação incansável.  
Obrigada por serem como estrelas trazendo luz,  
e como heróis me dando exemplos de dignidade e de vida*

*À Vanessa, minha irmã e ao Juarez meu cunhado pela amizade incondicional.*

*DEDICO*

*À Profa. Rosângela Zacarias Machado, meu eterno agradecimento por todos esses anos de convivência, de amizade e de muito aprendizado. Obrigada pelas orientações e palavras de incentivo, pela confiança e pelas oportunidades oferecidas.*

***AGRADECIMENTO ESPECIAL***

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado e auxílio à pesquisa, fundamentais para a realização deste experimento.

Aos professores Adjair Antônio do Nascimento, Aramis Augusto Pinto, Mirela Tinucci Costa e Fernando Luiz de Lucca pelas correções e valiosas sugestões a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro, professor admirável com toda sua competência, paciência e dedicação. Obrigada pela fundamental colaboração, me entusiasmando cada vez mais com seus ensinamentos.

À Profa. Maria Inês Tiraboshi Ferro, que juntamente com o Prof. Jesus, permitiu que fosse executada parte desse experimento em seu laboratório.

À Daniele Jovino, Maria Luiza R. Carrera e Vanessa Morgan pelo auxílio junto ao Laboratório de Biologia Molecular.

À Profa. Maria Célia Bertolini que nos auxiliou disponibilizando seu laboratório e conhecimento para a realização de parte das etapas de Biologia Molecular.

Ao Dr. Eduardo Hilário, que dedicou seu tempo a me ajudar, executando técnicas e compartilhando seus conhecimentos.

Aos professores do Depto. de Patologia Veterinária por contribuírem com minha formação profissional.

Aos funcionários do Depto. de Patologia Veterinária por todos os auxílios prestados.

Aos amigos do Laboratório de Imunoparasitologia: Carina Pereira, Ana Beatriz Sacchi, Marcos R. André, Adriano Carrasco, Meire Seki, Gisele Maria Andrade, Márcia M. G. Jusi, Tamires C. Tejerini e Arvelino Jacinto pela contribuição a este trabalho e pelos bons momentos compartilhados durante a pós-graduação.

Às amigas Patrícia I. Furuta e Trícia M. F. S. Oliveira, pelos bons momentos de descontração, pelas boas risadas e pela troca de conhecimentos durante todos esses anos de ótima convivência.

Aos doutores Tiago W. P. Mineo e Cristiane D. Baldani, que conquistaram a minha admiração pela sua dedicação e competência. Obrigada pela amizade e pelas palavras de incentivo e orientação.

Aos meus sogros Emico e Roberto e aos cunhados Missao, Gisele, Marcelo e Cristiane, por estarem presentes e dispostos a ajudar. É muito bom poder contar com vocês.

À Luzia A. Inácio por cuidar de mim e de minha família, permitindo que me dedicasse ao curso de doutorado.

Às minhas amigas irmãs Elaine Francisco e Luciene Vicentim pela amizade verdadeira, que se fortalece a cada dia.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, juntamente com as funcionárias desta seção pelos auxílios prestados.

## SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xii
RESUMO.....	xviii
SUMMARY.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. OBJETIVOS.....	11
3.1 Objetivo geral .....	11
3.2 Objetivos específicos.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1 Colheita e processamento das amostras.....	12
4.2 Dot-ELISA frente ao antígeno bruto de <i>Ehrlichia canis</i> .....	12
4.3 Reação de Imunofluorescência Indireta com antígeno bruto de <i>Ehrlichia</i> . <i>canis</i> .....	13
4.4 Amplificação do gene 16S rRNA de <i>E. canis</i> pela nested PCR (nPCR-16S rRNA).....	14
4.4.1 Extração de DNA genômico .....	14
4.4.2 Reação de amplificação .....	14
4.4.3 Eletroforese de DNA em gel de agarose .....	15
4.5 Amplificação do gene <i>p28</i> de <i>Ehrlichia. canis</i> pela PCR (PCR- <i>p28</i> ) .....	15
4.5.1 Extração de DNA genômico.....	15
4.5.2 Reação de amplificação.....	16
4.5.3 Eletroforese de DNA em gel de agarose .....	16
4.5.4 Análise da sensibilidade da PCR- <i>p28</i> .....	16
4.6 Clonagem do gene <i>p28</i> de <i>Ehrlichia canis</i> no vetor pGEM-T Easy.....	17
4.6.1 Amplificação do gene <i>p28</i> da <i>E. canis</i> pela PCR .....	19

4.6.2	Reação de ligação.....	19
4.6.3	Transformação das células competentes de <i>Escherichia coli</i> DH10B .....	20
4.6.4	Minipreparação de DNA Plasmidial (Método da lise alcalina) .....	21
4.7	Análise dos clones recombinantes .....	22
4.7.1	Seqüenciamento do gene <i>p28</i> da <i>E. canis</i> .....	22
4.7.2	Análise das seqüências .....	23
4.8	Subclonagem no vetor de expressão pET-28a .....	24
4.8.1	Vetor de expressão pET-28a .....	24
4.8.2	Digestão e purificação do fragmento de DNA e do vetor de expressão.....	27
4.8.3	Reação de ligação do gene <i>p28</i> com vetor pET-28a, transformação e extração plasmidial.....	27
4.9	Expressão da proteína P28 de <i>Ehrlichia canis</i> no vetor pET-28a.....	28
4.9.1	Seleção das estirpes de <i>Escherichia coli</i> .....	28
4.9.2	Transformação na <i>E. coli</i> e indução da expressão da proteína P28.....	29
4.9.3	Indução da expressão da proteína P28 em <i>E. coli</i> em larga escala.....	30
4.10	Purificação por cromatografia de afinidade .....	31
4.11	Análise do produto da expressão do gene <i>p28</i> no vetor pET-28a.....	32
4.11.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	32
4.11.2	Western-blotting .....	33
4.12	Clonagem do gene <i>p28</i> no vetor pET-SUMO.....	34
4.12.1	Amplificação do gene <i>p28</i> da <i>Ehrlichia canis</i> pela PCR.....	36
4.12.2	Reação de ligação .....	36
4.12.3	Transformação das células competentes de <i>Escherichia coli</i> em DH10B.	36
4.13	Análise dos clones recombinantes.....	37
4.13.1	Seqüenciamento .....	37
4.13.2	Análise das seqüências.....	37
4.14	Expressão da proteína P28 de <i>Ehrlichia canis</i> no vetor pET SUMO.....	38
4.14.1	Transformação na <i>E. coli</i> e indução da expressão da proteína SUMO_P28.....	38
4.15	Análise do produto da expressão do gene <i>p28</i> no vetor pET SUMO.....	38

4.15.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	38
4.15.2 Western-blotting.....	39
4.16 Análise estatística.....	39
5. RESULTADOS .....	40
5.1 Resposta Imune Humoral .....	40
5.2 Amplificação dos genes 16S rRNA e <i>p28</i> de <i>E. canis</i> .....	41
5.2.1 Amplificação do gene 16S rRNA pela nested PCR .....	41
5.2.2 Amplificação do gene <i>p28</i> de <i>E. canis</i> pela PCR .....	42
5.2.3 Análise comparativa entre a nPCR-16S rRNA e a PCR- <i>p28</i> .....	45
5.3 Clonagem e seqüenciamento do gene <i>p28</i> da amostra Jaboticabal de <i>E. canis</i> . .....	45
5.3.1 Amplificação do gene <i>p28</i> da <i>E. canis</i> .....	41
5.4 Seqüenciamento de DNA e análise das seqüências.....	47
5.5 Subclonagem no vetor de expressão pET-28a .....	54
5.6 Análise da expressão da proteína His6_P28 em <i>E. coli</i> .....	56
5.7 Análise da expressão da proteína SUMO_P28 em <i>E. coli</i> .....	61
6. DISCUSSÃO .....	63
7. CONCLUSÕES .....	70
8. REFERÊNCIAS .....	71
9. APÊNDICE.....	82

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Resultados obtidos na detecção de anticorpos anti- <i>E. canis</i> pela RIFI e pelo Dot-ELISA em 80 soros de cães atendidos no Hospital Veterinário da UNESP/ Jaboticabal-SP, no período compreendido entre 2004 e 2005.....	40
Tabela 2. Comparação entre os resultados obtidos na nPCR baseada no gene 16S rRNA e na PCR para amplificação do gene <i>p28</i> em 80 amostras sanguíneas de cães atendidos no Hospital Veterinário da UNESP/ Jaboticabal – SP....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega).....	18
Figura 2.	Mapa do vetor de expressão pET-28a (Novagen).....	26
Figura 3.	Mapa do vetor de clonagem e expressão pET SUMO (Invitrogen).....	35
Figura 4.	Detecção de DNA de <i>E. canis</i> pelo nested PCR em amostras sangüíneas colhidas de cães naturalmente infectados. Linha 1. marcador de peso molecular (100pb); linha 2 - água; linha 3. controle positivo; linhas 4 a 19. produto amplificado da amostra sangüínea de 16 cães. A seta indica a banda de 843pb, correspondente ao produto de amplificação do gene 16S rRNA de <i>E. canis</i> .....	41
Figura 5.	Avaliação da sensibilidade da PCR para a detecção do gene <i>p28</i> de <i>E. canis</i> em células DH82 100% parasitadas em diluições seriadas de $10^{-1}$ a $10^{-10}$ . Linha 1, marcador de peso molecular (100pb); linha 2, controle negativo; linha 3, controle positivo; linha 4 a 13, diluições de $10^{-1}$ a $10^{-10}$ . A seta indica a banda de 843pb, correspondente ao produto de amplificação do gene <i>p28</i> de <i>E. canis</i> .....	43
Figura 6.	Detecção de DNA do gene <i>p28</i> de <i>Ehrlichia canis</i> pela PCR em amostras sangüíneas de cães naturalmente infectados, atendidos no Hospital Veterinário - UNESP/Jaboticabal Linha 1, marcador de peso molecular 100pb (New England, BioLabs); linha 2, controle positivo; linha 3, controle negativo; linha 4 a 20, 17 amostras sangüíneas de cães. A seta indica a banda de 843pb, correspondente ao produto de amplificação do gene <i>p28</i> de <i>E. canis</i> .....	43

- Figura 7. Análise do fragmento que caracteriza o gene *p28* amplificado pela PCR, adicionado de bases correspondentes aos sítios de restrição para as endonucleases *NdeI* e *XhoI*. Linha 1, marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen); linha 2, controle negativo; linhas 3 e 4, DNA amplificado do gene *p28* da amostra Jaboticabal *E. canis*. A seta vermelha mostra a banda de 856 pb, correspondente à amplificação do gene *p28* de *E. canis* acrescido de sítios de restrição para *NdeI* e *XhoI*..... 46
- Figura 8. Alinhamento das seqüências nucleotídicas de diferentes amostras de *Ehrlichia canis*. As seqüências foram extraídas do GenBank e alinhadas pelo programa computacional MAFFT. Correspondem aos genes: 1. *p28* Jaboticabal (EF014897); 2. *p28* São Paulo (DQ460713); 3. *p28* Jake (AF082744), 4. *p28* Oklahoma (AF082746.1); 5. *p28* Florida (AF082750.1); 6. *p28* Fuzzi (AF082749.1); 7. *p28* DJ (AF082748.1); 8. *p28* Demon (AF082747.1); 9. *p28* Luisiana (AF082745.1); 10. *p30* Oklahoma (AF082746.1). As bases nucleotídicas discordantes estão anotadas em negrito..... 49
- Figura 9. Alinhamento das seqüências de aminoácidos de diferentes amostras de *Ehrlichia canis*. As seqüências foram extraídas do GenBank e alinhadas pelo programa computacional MAFFT. Correspondem, respectivamente, às proteínas: 1. P28 Jaboticabal (ABL74273.1), 2. P28 São Paulo (ABE98654.1); 3. P28 Jake (AAG14361.1); 4. P28 Oklahoma (AAC64552.1); 5. P28 Florida (AAC64556.1); 6. P28 Fuzzi (AAC64555.1); 7. P28 DJ (AAC64554.1); 8. P28 Demon (AAC64553.1); 9. P28 Louisiana (AAC64551.1); 10. P30 Oklahoma (AAK28699.1). Os aminoácidos discordantes estão anotados em negrito..... 52
- Figura 10. Alinhamento das seqüências de aminoácidos da amostra Jaboticabal de *Ehrlichia canis* e da amostra V4 de *E. chaffeensis*. A seqüência de *E.*

*chaffeensis* foi extraída do GenBank e o alinhamento foi feito pelo programa computacional MAFFT. Correspondem, respectivamente, às proteínas: 1. P28 da amostra Jaboticabal de *E. canis* (ABL74273.1); 2. P28 da amostra V4 de *E. chaffeensis* (AAL12920.1). Os aminoácidos discordantes estão anotados em negrito..... 53

- Figura 11. Amostras de DNA plasmidial da construção vetor pGEM\_p28 íntegras e digeridas com as endonucleases *NdeI* e *XhoI*. Linha 1, marcador de peso molecular 1kb (New England, BioLabs); linha 2, clone 1; linha 3, digestão do clone 1; linha 4, clone 2; linha 5, digestão do clone 2; linha 6, clone 3; linha 7, digestão do clone 3; linha 8, clone 4; linha 9, digestão do clone 4. As setas indicam os tamanhos dos fragmentos (3015 e 856 pb) obtidos após digestão enzimática.....55
- Figura 12. Quantificação da amostra de DNA do gene *p28* de *Ehrlichia canis* após digestão com as endonucleases *NdeI* e *XhoI* e purificação do gel de agarose com Kit GenClean II (QBiogene) Linha 1, Marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen); linha 2, gene *p28* da *Ehrlichia canis*; linha 3, Low Mass DNA Ladder (Invitrogen). A quantificação se dá pela comparação da intensidade da banda da amostra com a intensidade do padrão..... 51
- Figura 13. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) de amostras protéicas de culturas de *E. coli* BL21(DE3), transformadas com a construção plasmidial pET28a\_p28, induzidas com 0,8 mM de IPTG a 37°C. As amostras correspondem a: linha 1, marcador de peso molecular de proteínas Low Range (Bio-Rad); linhas 2, 5 e 8, amostras obtidas antes da indução; linhas 3, 6 e 9, amostras obtidas após 4 horas de indução protéica e linhas 4, 7 e 10, controle positivo da indução, aplicado no volume de 5, 10 e 15 µl/canaleta, respectivamente .....57
- Figura 14. Visualização das bandas protéicas na membrana de nitrocelulose pelo

Western-blotting de culturas de *E. coli* BL21(DE3), transformadas com a construção plasmidial pET28a\_p28, induzidas com 0,8mM de IPTG a 37°C. A membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo monoclonal anti-His. As amostras correspondem a: linha 1, marcador de peso molecular de proteínas Low Range (Bio-Rad); linhas 2, 5 e 8, amostras His6\_P28 obtidas antes da indução; linhas 3, 6 e 9, amostras His6\_P28 obtidas após 4 horas de indução protéica e linhas 4, 7 e 10, controle positivo de indução, aplicado no volume de 5, 10 e 15 µl/canaleta, respectivamente .....57

Figura 15. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) de amostras protéicas de culturas de *E. coli* BL21(DE3) pLYS, BL21 Star(DE3)pLysS e BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, transformadas com a construção plasmidial pET28a\_p28, induzidas com 0,8mM de IPTG a 30°C. As amostras correspondem a: linha 1, marcador de peso molecular de proteínas “Low Range” (Bio-Rad); linhas 2 e 3, BL21(DE3) pLYS obtida antes e após 4 horas de indução protéica; linhas 4 e 5, BL21 Star(DE3)pLysS obtida antes e após 4 horas de indução; e linhas 6 e 7, BL21-CodonPlus(DE3)-RIL obtida antes e após 4 horas de indução, respectivamente.....58

Figura 16. Visualização das bandas protéicas na membrana de nitrocelulose pelo Western-blotting de amostras de cultura de BL21 Star(DE3) pLysS transformada com a construção pET28a\_p28, após incubação da membrana de nitrocelulose com soro policlonal de cão positivo para *E. canis*. As amostras correspondem a: linha 1, marcador de peso molecular de proteínas Multimark Multi-Colored Standard (Invitrogen); linha 2, amostra obtida do controle positivo 3607 antes da indução; linha 3, amostra obtida do controle positivo 3607 após 4 horas de indução; linha 4, amostra da BL21 Star(DE3)pLysS contendo o plasmídeo pET28a\_p28 antes da indução; linha 5, amostra de BL21 Star(DE3)pLysS, contendo o plasmídeo pET28a\_p28, obtida após 4 horas de indução; linha 6, sobrenadante após purificação por cromatografia de afinidade.....60

- Figura 17. Visualização das bandas protéicas na membrana de nitrocelulose pelo Western-blotting de amostras da cultura de BL21 (DE3) Star transformada com a construção pET28a\_p28, após incubação da membrana de nitrocelulose, com anticorpo monoclonal Anti-His. As amostras correspondem a: linha 1, marcador de peso molecular de proteínas Multimark Multi-Colored Standard (Invitrogen); linha 2, amostra obtida do controle positivo 3607 antes da indução; linha 3, amostra obtida do controle positivo 3607 após 4 horas de indução; linha 4, amostra de BL21 Star(DE3)pLysS contendo o plasmídeo pET28a\_p28 antes da indução; linha 5, amostra de BL21 Star(DE3)pLysS contendo o plasmídeo pET28a\_p28 obtida após 4 horas de indução; linha 6, sobrenadante após purificação por cromatografia de afinidade.....60
- Figura 18. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) de amostras protéicas de culturas de *E. coli* BL21(DE3) pLYS, transformadas com a construção plasmidial pET SUMO\_p28 e controles positivos, antes e após indução com 0,8mM de IPTG a 37°C. As amostras correspondem a: linha 1, marcador de peso molecular de proteínas Low Range (Bio-Rad); linhas 2 e 3, amostras do controle positivo do vetor; linhas 4 e 5, amostras do controle positivo de indução, e linhas 6 e 7 amostra protéica da bactéria transformada com plasmídeo pET SUMO\_p28.....62
- Figura 19. Visualização das bandas protéicas na membrana de nitrocelulose pelo Western-blotting de amostras da cultura de *E. coli* BL21(DE3) pLYS, transformadas com a construção plasmidial pET SUMO\_p28 e controles positivos, antes e após indução com 0,8mM de IPTG a 37°C. A membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo monoclonal anti-His. As amostras correspondem a: linha 1, marcador de peso molecular de proteínas Low Range (Bio-Rad); linhas 2 e 3, amostras do controle positivo do vetor; linhas 4 e 5, amostras do controle positivo de indução, e linhas 6 e 7 amostra

protéica da bactéria transformada com plasmídeo pET SUMO\_p28.....62

**CLONAGEM DO GENE *p28* E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE A PARTIR DA AMOSTRA JABOTICABAL DE *Ehrlichia canis* E SUA APLICAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DA ERLIQUIOSE CANINA**

**RESUMO** - O presente estudo objetivou clonar e analisar a expressão do gene *p28* da amostra Jaboticabal de *Ehrlichia canis* e avaliar sua utilização no diagnóstico molecular e sorológico da erliquiose canina. A PCR, baseada no gene *p28* de *E. canis*, foi capaz de detectar o DNA de um único parasita entre um bilhão de células. Amostras sanguíneas de cães com suspeita clínica de erliquiose foram testadas pela PCR, baseada no gene *p28* e pela nested PCR para detecção do gene 16S rRNA. O fragmento amplificado do gene *p28* foi observado em 51,25% (n=41) das 80 amostras examinadas, e todas elas foram positivas para o gene 16S rRNA de *E. canis*, entretanto, em outros 21,25% (n=17) das amostras apenas o gene 16S rRNA foi detectado. A caracterização molecular do gene *p28* mostrou similaridade com outras amostras de *E. canis*. Para a expressão da proteína recombinante P28, foram testados dois sistemas diferentes com linhagens de *Escherichia coli* BL21(DE3), BL21 Star(DE3)pLysS, BL21(DE3) pLysS e BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. A análise pelo Western-blotting revelou reatividade de várias frações protéicas com anticorpo policlonal anti-*E. canis*. Porém, quando a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal para detecção de moléculas de histidina, não houve reatividade, mostrando a ausência de expressão da proteína P28.

**Palavras-chave:** *Ehrlichia canis*, erliquiose canina, cão, *p28*, PCR, clonagem, expressão de proteínas, sorologia.

**CLONING OF *p28* GENE AND PROTEIN EXPRESSION ANALYSIS FROM OF  
*Ehrlichia canis* JABOTICABAL STRAIN AND ITS APPLICATION IN MOLECULAR  
AND SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF CANINE EHRLICHIOSIS**

**SUMMARY** – The aim of this study was to clone and express the *p28* gene of *Ehrlichia canis* Jaboticabal strain and evaluate its application in molecular and serological diagnosis of canine ehrlichiosis. The *p28*-based PCR was able to detect *E. canis* DNA of one parasite among one billion cells. Blood samples from dogs for which a diagnosis of canine ehrlichiosis was suspected were tested by *p28*-based PCR and by 16S rRNA-based nested PCR. Amplified fragment from *p28* gene were observed in 51.25% (n=41) among 80 assayed samples and all of this positive samples were also positives for 16S rRNA gene of *E. canis*, however in 21.25% (n=17) only 16S rRNA gene was detected. The molecular characterization of *p28* gene showed similarity with others strains of *E. canis*. Expression of P28 recombinant protein was tested with two different systems and in *Escherichia coli* BL21(DE3), BL21 Star(DE3)pLysS, BL21(DE3) pLysS and BL21-CodonPlus(DE3)-RIL strains. After expression induction, Western-blotting showed reactivity of some protein fractions against anti-*E. canis* antibodies. However, when samples were incubated with anti-histidine monoclonal antibodies, they did not react, demonstrating non-expression of P28 protein.

**Key words:** *Ehrlichia canis*, canine ehrlichiosis, dog, *p28*, PCR, cloning, protein expression, serology.

## 1. INTRODUÇÃO

A erliquiose canina, causada pela bactéria intracelular *Ehrlichia canis*, é uma doença infectocontagiosa de distribuição global, de alta prevalência principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, a erliquiose canina foi diagnosticada pela primeira vez em Belo Horizonte (MG) no ano de 1973 (COSTA et al. 1973) e, desde então, tem sido foco de pesquisas em quase todo o país (OLIVEIRA et al., 2000; CASTRO et al., 2004; BULLA et al., 2004; DAGNONE et al., 2003; MACHADO, 2004; ALVES et al., 2005; MACIEIRA et al. 2005; SANTOS et al., 2008 e NAKAGHI et al., 2008).

O estudo da *Ehrlichia canis*, no Laboratório de Imunoparasitologia da UNESP – Jaboticabal, vem sendo realizado desde 1994, quando a cepa de *E. canis* foi isolada de um cão fêmea, da raça Weimaraner, em fase aguda da doença, por MACHADO, em 1993 (AGUIAR et al., 2007). Esse isolamento deu início a pesquisas em animais infectados experimentalmente com *E. canis*, analisando as alterações clínicas, imunológicas, hematológicas e anatomopatológicas durante a fase aguda da erliquiose canina (CASTRO et al. 2004). OLIVEIRA et al. (2000) detectaram, pelo Dot-ELISA, uma prevalência de 92,31% de erliquiose em cães atendidos no Hospital Veterinário – UNESP -Jaboticabal. SILVA (2001) observou alterações mielodisplásicas em exames histopatológicos realizados com cães Pastores Alemães infectados experimentalmente. NAKAGHI et al. (2008), realizando estudo comparativo entre métodos de diagnóstico direto e indireto de *E. canis* em cães com suspeita clínica de erliquiose, mostraram que a associação de técnicas sorológicas e moleculares é o meio mais adequado para a confirmação do diagnóstico da erliquiose canina, fornecendo informações complementares à avaliação clínica e hematológica. DAGNONE (2006) realizou estudo de identificação pelo seqüenciamento de DNA de agentes da família Anaplasmataceae em cães, cujos leucócitos estavam infectados com mórulas, confirmando a presença de *E. canis* e *Anaplasma platys* na região de Jaboticabal-SP e de Campo Grande-MS.

Inúmeros são os estudos relacionados ao diagnóstico sorológico da erliquiose e, ainda assim, dificuldades são encontradas, principalmente relacionadas à reatividade cruzada. A resposta imune humoral tem sido estudada principalmente pela caracterização de polipeptídeos das várias espécies do gênero *Ehrlichia*, melhorando, dessa forma, a especificidade das técnicas sorológicas, e conseqüentemente, reduzindo a ocorrência de reações cruzadas. A proteína recombinante P28 tem se mostrado eficaz no diagnóstico sorológico de *E. canis*. Além disso, estudos também têm demonstrado que o gene *p28* apresenta-se conservado em todos os isolados de *E. canis* da América do Norte, permitindo o desenvolvimento de vacinas e de antígenos (McBRIDE et al., 2000a).

Diante do exposto, o presente estudo foi realizado com o objetivo de clonar e expressar a proteína recombinante P28, a partir da caracterização molecular do gene *p28* da *E. canis* da amostra de Jaboticabal (MACHADO, 1993), e avaliar a sua utilização no diagnóstico da erliquiose canina.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

*Ehrlichia canis*, principal agente da erliquiose monocítica canina, é uma bactéria estritamente intracelular, que reside e se multiplica em monócitos e macrófagos, formando inclusões citoplasmáticas, chamadas mórulas. Excepcionalmente, podem parasitar plaquetas e neutrófilos. Recentemente, espécies da Ordem Rickettsiales foram reclassificadas com base na homologia entre as seqüências do gene 16S rRNA, o que resultou no agrupamento da *E. canis* com espécies geneticamente similares, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium*, todas dentro da família Anaplasmataceae (DUMLER et al., 2001).

A erliquiose canina tem sido objetivo de muitos estudos em todo o Brasil, visto que é endêmica em várias regiões. O diagnóstico sorológico e molecular da erliquiose canina já foi relatado em estudos realizados no Estado de São Paulo (OLIVEIRA et al., 2000; CASTRO et al., 2004; BULLA et al., 2004; DAGNONE et al., 2006; SANTOS et al., 2008 e NAKAGHI et al., 2008), Goiás (ALVES et al., 2005), Rio de Janeiro (MACIEIRA et al. 2005), Paraná (DAGNONE et al., 2003) e Mato Grosso do Sul (DAGNONE et al., 2006).

O ciclo de vida da *E. canis* inicia-se quando essa bactéria é inoculada no hospedeiro pela picada do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. Em estudo do ciclo de vida da *Ehrlichia chaffeensis*, a microscopia eletrônica mostrou que as *Ehrlichias* possuem duas formas: células densamente coradas (DC – “dense-cored”) e as células reticuladas (RC – “reticulate cells”) que residem dentro das mórulas nas células dos hospedeiros mamíferos. Durante o período de incubação do parasita, que pode durar de 8 a 20 dias, a bactéria se adere à parede e é fagocitada pelas células do hospedeiro, sob a forma de células densamente coradas. Rapidamente, essas DC transformam-se em células reticuladas, que se multiplicam por fissão binária, durante aproximadamente 48 horas. Novamente tornam-se células densamente coradas em 72 horas após infecção para serem liberadas e, então, fagocitadas por outras células (ZHANG et al., 2006).

A fase aguda pode durar de 2 a 4 semanas. Durante esse período, podem ser observados, nos animais naturalmente e experimentalmente infectados, sinais e sintomas clínicos, como palidez de mucosas, linfadenopatia, esplenomegalia, hipertermia, emaciação, além de outros sinais inespecíficos (CASTRO et al., 2004; NAKAGHI et al., 2008). Os animais tratados na fase aguda da doença respondem bem ao tratamento, porém a eliminação da *E. canis* pode ser difícil, e os cães tornam-se cronicamente infectados, servindo de reservatórios. Acredita-se que o seqüestro de *E. canis* nos tecidos, após melhora clínica do animal pode resultar em recidiva da doença (IQBAL & RIKIHISA, 1994), e que o baço é o órgão de escolha para abrigar a *E. canis* durante a fase subclínica e de portador, e o último órgão a acomodar o parasita antes de sua eliminação (HARRUS et al., 1998; FARIA, 2006).

A hiperglobulinemia por aumento de gamaglobulinas é uma anormalidade bioquímica comumente observada em todas as fases da erliquiose canina. A hipergamaglobulinemia que ocorre nos animais doentes é geralmente policlonal e não está associada aos títulos de anticorpos contra *E. canis*. Esses fatores mostram que a produção de anticorpos induzida é inespecífica e que os anticorpos anti-*E. canis* não são os principais tipos de globulinas que contribuem para a hipergamaglobulinemia. Isso ocorre em outras patologias em que há estímulo antigênico prolongado e sugere uma resposta imune exagerada, porém pouco eficiente, contra *E. canis* (HARRUS et al., 1999). Entretanto, em estudos experimentais conduzidos com a amostra Jaboticabal, a imunistoquímica de órgãos linfóides revelou aumento do número de células imunomarcadas expressando IgM e IgG. Esses resultados, associados ao aumento dos títulos de anticorpos anti-*E. canis* no decorrer da infecção, sugerem que a resposta imune humoral apresenta importante papel na erliquiose canina (CASTRO et al., 2004). Além disso, estudos mostraram que o tratamento prévio contra a *E. canis* com soro imune ou com anticorpos monoclonais preveniram infecção ou reduziram infectividade, provavelmente ligando-se a ela e prevenindo sua adesão e penetração na célula do hospedeiro (WINSLOW et al., 2000; WANER et al., 2001).

O diagnóstico da erliquiose monocítica canina pode ser alcançado pela associação dos sinais clínicos e hematológicos com testes sorológicos e moleculares (NAKAGHI et al., 2008). A identificação direta de mórulas de *E. canis*, em amostras de

sangue periférico, confirma o diagnóstico da erliquiose (NYINDO et al., 1971). Entretanto, em animais naturalmente infectados, a detecção de mórulas é mais eficaz em aspirados de baço em relação à pesquisa da papa leucocitária oriunda do sangue periférico (FARIA, 2006). A presença de mórulas no citoplasma de células mononucleares foi detectada por CASTRO et al. (2004) em cães infectados experimentalmente, em períodos de pico febril. NAKAGHI et al. (2008) encontraram mórulas em apenas um dos 28 cães naturalmente infectados, que apresentou positividade à sorologia. Esse percentual de detecção também foi observado por OLIVEIRA et al. (2000), na mesma região do país. A proporção de células infectadas em um animal com erliquiose é menor que 1% (COWELL et al., 1988) e a ausência do parasita no esfregaço não exclui o diagnóstico positivo (EWING, 1969). Além disso, morfologia, coloração, tamanho e localização dessas mórulas podem ser confundidas devido à similaridade que apresentam com inclusões decorrentes de infecções bacterianas severas (corpúsculo de Döhle), infecções virais (cinomose), inflamações, doenças auto-imunes, além da cromatina sexual presente no citoplasma dos leucócitos (corpúsculo de Barr) das cadelas (JAIN, 1993). Por isso, a identificação citológica desse agente deve ser realizada por pessoal treinado e deve estar associada a outros testes, sorológicos e moleculares, para a confirmação diagnóstica (DAGNONE, 2006).

A contagem de plaquetas também é um bom método de diagnóstico presuntivo em casos crônicos sintomáticos e assintomáticos (DAVOUST et al., 1991). MYLONAKIS et al. (2003), estudando a sensibilidade diagnóstica com base na detecção de mórulas, compararam a citologia da papa leucocitária, sangue periférico total, linfonodos, medula óssea e cultivo celular com curto período de incubação e observaram uma alta sensibilidade na citologia da papa leucocitária e do linfonodo, além de detectarem maior número de mórulas de *E. canis* em linfócitos do que em monócitos.

O cultivo de células da linhagem macrófaga canina DH82 e o Western-blotting são métodos sensíveis para o diagnóstico da erliquiose, contudo são técnicas caras, demoradas e que necessitam de maior tecnologia (IQBAL et al., 1994).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) demonstrou ser um teste sensível e específico (IQBAL & RIKIHISA, 1994; NAKAGHI et al., 2008) capaz de determinar se

um cão soropositivo é portador ou não da *E. canis*, visto que a soropositividade pode manter-se mesmo em animais livres do parasita (IQBAL & RIKIHISA, 1994; HARRUS et al., 1998; BREITSCHWERDT et al., 1998; KORDICK et al., 1999). Tecidos como baço, fígado, rins, mesentério e linfonodos poplíteos (IQBAL & RIKIHISA, 1994), sangue e material de medula óssea de cães infectados já foram utilizados para a extração de DNA do parasita, porém o DNA extraído de aspirados de baço tem sido apontado como sendo o melhor tipo de amostra da PCR para o diagnóstico do animal portador de *E. canis* durante a fase subclínica (HARRUS et al., 1998). Entretanto, FARIA (2006), comparando os resultados da nested PCR (nPCR) para detecção do gene 16S rRNA no baço e no sangue de animais naturalmente infectados, mostrou não haver diferença na sensibilidade de detecção de DNA nas diferentes amostras.

Vários são os estudos relacionados a PCR para o diagnóstico da erliquiose canina, já que a nPCR baseada no gene 16S rRNA, a técnica mais utilizada, tem a desvantagem de resultar em amplificações inespecíficas em virtude do gene 16S rRNA ser muito semelhante aos encontrados entre espécies de bactérias (LOCKHART et al., 1997), além do alto risco de contaminações, inerente a esses protocolos (KWOK & HIGUCHI, 1989). A nPCR amplifica o DNA de *E. canis* antes que a sorologia seja capaz de detectar anticorpos anti-*E. canis*, o que mostra sua superioridade no diagnóstico da erliquiose na fase aguda. Entretanto, um número considerável de animais naturalmente infectados, positivos na sorologia e negativos na nPCR, mostraram que a sorologia deve ser a técnica de escolha principalmente nos casos subclínicos ou crônicos (NAKAGHI et al., 2008). Muitas variações na PCR foram descritas na tentativa de melhorar a sensibilidade e a especificidade da técnica na detecção de espécies de *Ehrlichia* (CHANG & PAN, 1996; ENGVALL et al., 1996; STICH et al., 2002; DUMLER, 2003). Recentemente, LABRUNA et al. (2007) demonstraram que a PCR em tempo real, que amplifica o gene *dsb*, é altamente sensível na detecção do gênero *Ehrlichia*. A comparação entre a nested PCR, baseada no gene 16S rRNA e a PCR para detecção do gene *dsb* em amostras de cão naturalmente infectados, mostrou que, apesar da PCR-*dsb* não diferenciar as espécies de *Ehrlichia* sem o sequenciamento do DNA, os resultados obtidos pelos dois métodos foram semelhantes (NAKAGHI et al., 2004).

O diagnóstico sorológico evidencia animais infectados, porém não determina o período em que ocorreu a exposição (IQBAL et al., 1994). Reações cruzadas podem ocorrer entre *E. canis*, *E. chaffensis*, *E. ewingii*, *C. ruminantium* e membros do genogrupo *E. phagocytophila*, e os resultados podem ser subjetivos, dependendo da interpretação do leitor. Contudo, a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) ainda é o método mais utilizado e considerado o método de escolha para a detecção e titulação de anticorpos anti-*E. canis* (WANER et al., 2001).

Vários outros testes sorológicos comerciais utilizados na detecção de anticorpos IgG anti-*E. canis* têm sido testados, entre os quais o "Dot-ELISA" Immunocomb<sup>®</sup> (Biogal, Israel), que utiliza amostra de *E. canis* cultivada em células de camundongos J774.A1, e o Snap<sup>®</sup> 3Dx assay (IDEXX Laboratories Inc., USA), que utiliza duas proteínas recombinantes de *E. canis* p30 e p30-1 como antígenos (HARRUS et al., 2002). Em estudo comparativo entre testes sorológicos, HARRUS et al. (2002) demonstraram que o Dot-ELISA é o teste mais sensível, e o Snap<sup>®</sup> o mais específico, quando comparados à RIFI. NAKAGHI et al. (2008), comparando a RIFI e o Dot-ELISA, não observaram diferença significativa e concluíram que ambos os métodos são qualitativamente eficientes no diagnóstico da erliquiose canina.

Estudos da resposta imune humoral, realizados por meio do teste de Western-blotting, caracterizaram polipeptídeos antigênicos de superfície da *E. canis* que variam de 21 a 160 kDa (McBRIDE et al., 2000a; YU et al., 2000; ALLEMAN et al., 2001; STICH et al., 2002, KNOWLES et al., 2003) e algumas glicoproteínas como gp120, gp200 e gp36 (CHEN et al., 1997; McBRIDE et al., 2000b, MAVROMATIS et al., 2006). A *E. canis* é uma bactéria deficiente em alguns componentes estruturais, incluindo peptidoglicanas e lipopolissacarídeos. Essa deficiência resultou no desenvolvimento de estruturas protéicas complexas de membrana, que têm importante papel na evasão do sistema imune e na interação da *E. canis* com as células do hospedeiro (MAVROMATIS et al., 2006). A regulação da antigenicidade dessas proteínas de superfície está relacionada à persistência da infecção no hospedeiro.

Os estudos das proteínas antigênicas de superfície da *E. canis* têm permitido o avanço da utilização de proteínas recombinantes com o intuito de melhorar a especificidade das técnicas sorológicas. HARRUS et al. (2002) acreditam que o uso de

proteínas recombinantes, comparado ao uso de antígenos do parasita cultivado, pode causar diferenças na reatividade, podendo alterar a sensibilidade e especificidade dos diferentes testes. Entretanto UNVER et al. (1999) detectaram aproximadamente 100% de concordância na intensidade das reações entre antígenos nativos e recombinantes. Além dessas vantagens, as técnicas de clonagem evitam as dificuldades observadas no cultivo de *E. canis* e ainda fornece grandes quantidades de proteínas puras para testes sorológicos (YU et al., 2000). Além disso, a intensidade das reações obtidas com o antígeno bruto e o recombinante é muito semelhante, propiciando um diagnóstico confiável. O sistema mais utilizado na produção de proteínas recombinantes é o de bactérias, em especial *Escherichia coli*, comumente usadas na produção de diversas proteínas de interesse terapêutico, como a insulina. A expressão na *E. coli* tem a vantagem de exigir meios de cultura e manipulação simples e ter crescimento rápido. Ademais, seu código genético é bem caracterizado (WALSH et al., 1998), bem como há várias cepas mutantes que podem ser utilizadas de acordo com a necessidade (BANEYX, 1999).

Estudos moleculares recentes identificaram grupos de proteínas imunorreagentes que incluem glicoproteínas, proteínas do sistema secretório do tipo IV (Vir) e a família de proteínas dominantes de superfície de membrana, contendo 25 genes parálogos que podem ser expressos de formas diferentes nos hospedeiros, e que contribuem para as infecções persistentes. A comparação entre as erliquias mostra que a *E. canis* compartilha de 834 proteínas (88% de seu proteoma) das amostras de *E. ruminantium*, e 32 proteínas (3,1% do proteoma) são comuns a outras espécies de *Ehrlichia* (MAVROMATIS et al., 2006).

A proteína antigênica de superfície 2 (MAP2) da *E. canis*, apesar de sua função ainda desconhecida, foi clonada e expressada a partir do seu gene e o seu recombinante (rMAP2) foi caracterizado e testado pelo ELISA-Teste, sendo detectada 97,2% de concordância entre o ELISA-Teste e a RIFI com antígeno total do parasita. Este resultado sugere que a rMAP2 de *E. canis* pode ser utilizada no diagnóstico sorológico da erliquiose canina (ALLEMAN et al., 2001). Contudo, KNOWLES et al. (2003) afirmam que há uma alta porcentagem de similaridade (79%) entre as seqüências de aminoácidos das MAP2s da *E. canis* e da *E. chaffeensis*, que impedem a

diferenciação sorológica entre as duas espécies. A análise pelo Western-blotting mostrou que o soro positivo para *E. canis* reagiu fortemente com antígenos MAP2 de *E. canis* e de *E. chaffeensis*. O gene *mmpA* foi identificado e utilizado para expressão da proteína encontrada na membrana da mórula (MmpA) de *E. canis*. Essa proteína foi encontrada apenas na mórula de *E. canis* e não na de *E. chaffeensis* e, portanto, seu uso foi indicado na produção de antígeno recombinante para vacina e diagnóstico sorológico (TENG et al., 2003).

Estudos das características antigênicas da *E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. ruminantium* revelaram a presença de antígenos imunodominantes de tamanhos similares que compartilham epítomos. Um grupo de antígenos, variando de tamanhos de 27 a 32 kDa, é predominante nesses e em outros membros do Gênero *Ehrlichia* (REDDY et al., 1998), sendo que variações antigênicas dessas proteínas de superfície de membrana parecem estar relacionadas à capacidade dessas bactérias evadirem do sistema imune (McBRIDE et al., 2000a). A reatividade de soros de cães com erliquiose contra a proteína de superfície sintetizada, a partir do gene *p28* da *E. canis* mostrou que essa proteína recombinante pode ser utilizada como antígeno no sorodiagnóstico (McBRIDE et al., 1999).

A proteína P28 é codificada pelo locus multigênico, que tem, pelo menos, 22 alelos do gene *p28* (*p28-1* a *p28-22*) no cromossomo da *E. canis* e da *E. chaffeensis* (LONG et al., 2002). ZHANG et al. (2004) mostraram a detecção de anticorpos contra todas as proteínas P28 em cães infectados com *E. chaffeensis*. Entretanto, LONG et al. (2002) acreditam que todos os genes *p28* podem ser transcritos, mas não necessariamente expressos. É possível que alterações pós-transcricionais estejam relacionadas no processo de expressão desses genes. A ocorrência de genes múltiplos contendo regiões conservadas e variadas nas *Ehrlichias*, pode resultar em recombinações genéticas levando a variações nos epítomos de superfície (REDDY et al., 1998).

Sabe-se que as proteínas de peso molecular de 28 kDa a 30 kDa são codificadas por famílias multigênicas homólogas, que foram identificadas e seqüenciadas na *E. canis* e na *E. chaffeensis*, o que pode explicar a reatividade cruzada entre as duas espécies (McBRIDE et al., 2000a). O gene *p28*, identificado na *E. canis*, apresenta-se

conservado entre amostras distribuídas nas várias regiões dos Estados Unidos (McBRIDE et al., 2000a).

A proteína recombinante P28 da *E. chaffeensis* parece promover proteção contra a infecção homóloga em camundongos, e o anti-soro produzido contra esse antígeno recombinante reagiu de forma cruzada com a proteína de 30 kDa da *E. canis* (OHASHI et al., 1998). Comparando a utilização da *E. chaffeensis* e a proteína recombinante rP30 nos testes sorológicos, observou-se que a rP30 promoveu resultados tão sensíveis quanto a utilização de antígeno bruto (UNVER et al., 1999).

Muitos são os estudos visando melhorar a sensibilidade e especificidade dos testes de diagnóstico da erliquiose canina. As técnicas de clonagem e expressão de proteínas recombinantes permitem caracterizar e produzir antígenos em larga escala, buscando o desenvolvimento de testes de diagnóstico específicos e ainda possibilitando a produção de vacinas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar a utilização do antígeno recombinante P28 de *Ehrlichia canis* em testes sorológicos e moleculares no diagnóstico da erliquiose em cães naturalmente infectados.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Clonar o gene *p28* da cepa Jaboticabal de *E. canis*, seqüenciar e analisar sua identidade com outras amostras.
- Otimizar a PCR para detecção do gene *p28* de *E. canis* e compará-la com a nested PCR, baseada no gene 16S rRNA no diagnóstico molecular da erliquiose.
- Analisar a expressão da proteína P28 de *E. canis* em *Escherichia coli*, a fim de avaliar a sua utilização no diagnóstico da erliquiose canina pelo método de Dot-ELISA e comparar os resultados com aqueles obtidos na sorologia com antígeno bruto, além de determinar a sua antigenicidade e imunogenicidade.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Colheita e processamento das amostras

Foram colhidas 80 (oitenta) amostras sangüíneas de cães com suspeita clínica de erliquiose monocítica no período compreendido entre os anos 2004 e 2005. Inicialmente, foram avaliados no Hospital Veterinário – UNESP/ Jaboticabal, cães que apresentaram apatia, hipo a anorexia, hipertermia, diáteses hemorrágicas, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, palidez de mucosas e/ou uveíte. Desses animais, foram selecionados aqueles que associados às características clínicas requeridas tivessem também anemia, leucopenia e/ou trombocitopenia. De cada um dos cães avaliados foram colhidos 10 mL de sangue total, parte do qual foi acrescida de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para hemograma completo e PCR, e parte foi dessorada para a detecção de anticorpos anti-*E. canis*. As amostras séricas foram utilizadas para a sorologia com antígeno total (Dot-ELISA e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)). De cada amostra de sangue total foi extraído o DNA genômico utilizado na PCR para amplificação do gene *p28* e na nPCR baseada no gene 16S rRNA.

O controle positivo foi colhido de um animal infectado com a amostra Jaboticabal de *E. canis*, no oitavo dia pós-infecção, após o aparecimento dos sintomas compatíveis com erliquiose, a qual foi confirmada pela detecção de mórulas no esfregaço sangüíneo. A amostra utilizada como controle negativo foi colhida do mesmo animal antes da infecção experimental.

A clonagem do gene *p28* foi iniciada a partir da amostra Jaboticabal de *E. canis* criopreservada em 10% de DMSO (dimetil sulfóxido).

### 4.2. Dot-ELISA frente ao antígeno bruto de *Ehrlichia canis*

O kit (Immunocomb<sup>®</sup> - Biogal, Israel) para a detecção de anticorpos da classe IgG consiste de uma estrutura em forma de pente sensibilizada com antígenos de *E.*

*canis* e de uma placa contendo os reagentes necessários para o desenvolvimento da técnica.

Conforme a orientação do fabricante, 5µl de cada soro a ser testado foram adicionados ao primeiro compartimento da placa com o tampão de diluição. A seguir, o pente contendo os antígenos de *E. canis* foi submerso neste compartimento durante 5 minutos. Na seqüência, o pente foi lavado para remoção dos anticorpos não ligados e imediatamente colocado no compartimento que continha o conjugado (IgG de cabra anti-IgG de cão ligada à fosfatase alcalina) por mais 5 minutos. Novamente lavado, os anticorpos ligados reagiram com o cromógeno BCIP-NBT. A titulação de anticorpos anti-*E. canis* para cada amostra foi analisada por meio de uma escala para a leitura da intensidade de coloração das marcações produzidas pelas reações no pente (CombScale).

#### **4.3. Reação de Imunofluorescência Indireta com antígeno bruto de *Ehrlichia canis***

As amostras séricas foram testadas em lâminas preparadas com células DH82 parasitadas com *E. canis*, parte delas oriundas da VMRD, Inc. e outra parte preparada no Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária, UNESP, Jaboticabal. As amostras de soros foram diluídas a 1:20 em solução salina tamponada com fosfato (PBS), em pH 7,2. Foram depositados 10µl de cada soro diluído nas áreas demarcadas da lâmina, reservando-se dois poços para a adição das amostras de soros controle positivo e negativo. O procedimento foi o mesmo para cada lâmina testada. A lâmina foi incubada a 37°C, por 30 minutos, em câmara úmida. Posteriormente, foi seca e a cada área demarcada foram adicionados 10µl de conjugado (IgG de coelho anti-IgG de cão, marcado pelo isotiocianato de fluoresceína – Sigma catalog nº F7884), diluído conforme orientação do fabricante. O material foi incubado por mais 30 minutos, a 37°C, em câmara úmida. Após nova lavagem, a lâmina foi seca e montada com lamínula, utilizando-se glicerina tamponada a uma relação de 9:1 de glicerina/tampão carbonato-bicarbonato 0,5M pH 9,6. A leitura da lâmina foi realizada em um microscópio equipado

com luz fluorescente (Olympus BX60). Foram considerados positivos aqueles soros que reagiram em diluições maiores ou iguais a 1:20. A positividade da reação implicou na observação de fluorescência nas mórulas, em comparação com a amostra controle positivo e ausência de fluorescência no controle negativo (NAKAGHI et al., 2008).

#### **4.4. Amplificação do gene 16S rRNA de *Ehrlichia canis* pela nested PCR (nPCR-16S rRNA)**

##### **4.4.1. Extração de DNA genômico**

A extração do DNA de *E. canis* foi realizada a partir de 200µl de sangue total acrescido do anticoagulante EDTA, com o kit para extração de DNA QIAamp DNA Blood (cat. nº 51104, Qiagen®) conforme as indicações do fabricante.

##### **4.4.2. Reação de amplificação**

Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação foram aqueles baseados na seqüência do gene 16S rRNA ECC e ECB, que amplifica todo o gênero *Ehrlichia*. Na segunda reação da PCR para amplificação do DNA da espécie *Ehrlichia canis*, foram utilizados os oligonucleotídeos ECAN5 e HE3 (WEN et al., 1997 e MURPHY et al., 1998 e HARRUS et al., 1998).

ECC: (5'– GAACGAACGCTGGCGGCAAGC –3')

ECB: (5'- CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA –3')

ECAN: (5'- CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA –3')

HE3: (5'- TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT –3').

As reações foram compostas por 100ng do DNA da amostra em 5,0µl de tampão da PCR (PCR buffer 10X – 100mM Tris-HCl, pH 9,0, 500mM KCl), 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (dTTP, dATP, dGTP, dCTP, Eppendorf®), 2,5 mM de Cloreto de

Magnésio, 1pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (MWG<sup>®</sup>), 1,25U de Taq DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen<sup>®</sup>) e água q.s.p. 50µl.

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador (MJ Research - PTC 200). A amplificação com os oligonucleotídeos iniciadores ECC e ECB consistiu-se em um ciclo inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 65°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Para a segunda reação foram utilizadas as mesmas soluções, além de 1,0µl da amostra de DNA amplificado e os oligos espécie-específicos ECAN5 e HE3. A reação consistiu-se em 3 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1,5 minuto e 37 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1,5 minuto (MURPHY et al., 1998).

#### **4.4.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose**

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose (Invitrogen<sup>®</sup>) a 1,5%, corado com brometo de etídio (0,5µl/mL) em tampão de corrida TAE (40mM Tris-acetato, 2 mM EDTA pH 8,0). A eletroforese foi realizada a 90V/ 50mA durante 90 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (100bp ladder, Invitrogen<sup>®</sup>). Os resultados foram visualizados e analisados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta (2020E), acoplado a um programa computacional analisador de imagens (Eagle Eye II - Stratagene<sup>®</sup>).

### **4.5. Amplificação do gene *p28* de *Ehrlichia canis* pela PCR (PCR-*p28*)**

#### **4.5.1. Extração de DNA genômico**

A extração do DNA de *E. canis* foi realizada conforme descrito no item 4.4.1.

#### 4.5.2. Reação de amplificação

O desenho dos oligonucleotídeos iniciadores foi baseado na seqüência do gene *p28-7* de *E. canis* (McBRIDE et al., 1999; número de acesso no GenBank AF082744):

P28-7F (5'- ATG AAT TGC AAA AAA ATT CTT ATA -3')

P28-7R (5'- TTA GAA GTT AAA TCT TCC TCC -3')

A reação de amplificação foi realizada em volume total de 50µl: aproximadamente 100 ng da amostra de DNA, 5 µl de tampão da PCR (PCR buffer 10X – 200mM Tris-HCl, pH 8,4, 500mM KCl), 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (dTTP, dATP, dGTP, dCTP, Eppendorf®), 1,5mM de Cloreto de Magnésio, 0,5µM de cada oligonucleotídeo (Invitrogen®), 1,25U de Taq DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen®) e água q.s.p. A reação foi conduzida em termociclador (MJ Research - PTC 200) e consistiu em um ciclo de 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação de 95°C por 30 segundos, temperatura de anelamento variando de 38°C a 61°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos

#### 4.5.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose

A análise dos produtos amplificados foi realizada conforme descrito no item 4.4.3.

#### 4.5.4. Análise da sensibilidade da PCR-*p28*

A sensibilidade da PCR para detecção do gene *p28* foi avaliada utilizando-se células DH82 infectadas com *E. canis*, quando a parasitemia aproximava-se de 100%. O DNA da amostra de células infectadas foi extraído pelo kit para extração de DNA QIAamp DNA Blood (cat. n° 51104, Qiagen®), conforme as indicações do fabricante.

O DNA foi diluído (diluições seriadas na base 10: 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-10</sup>) em água destilada, e as amostras concentradas e diluídas foram processadas pela reação de

amplificação, conforme descrito anteriormente, exceto para a temperatura de anelamento, ou seja, de 52 °C, na qual ocorreu melhor amplificação do DNA.

#### **4.6. Clonagem do gene *p28* de *Ehrlichia canis* no vetor pGEM-T Easy**

A clonagem gênica foi iniciada a partir da amostra Jaboticabal de *E. canis* criopreservada em 10% de DMSO (dimetil sulfóxido). A extração do DNA dessa amostra foi realizada com QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®), conforme indicações do fabricante. A clonagem do gene *p28* foi realizada, inicialmente, com o vetor pGEM-T Easy (PROMEGA) (Fig. 1).

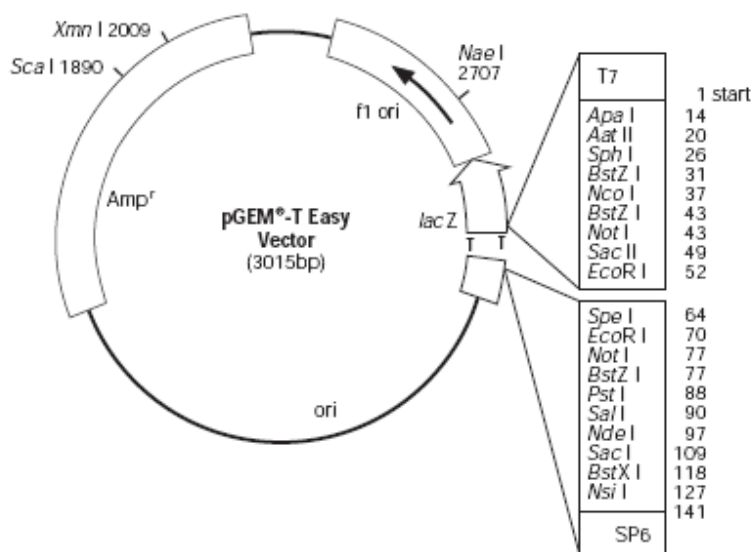


Figura 1. Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega)

Características do vetor de clonagem pGEM-T Easy:

3015 pares de bases

Sítio de iniciação da transcrição T7 RNA polimerase: base 1

Região múltipla de clonagem: bases 10-128

Promotor SP6 RNA polimerase (-17 a +3): bases 139-158

Sítio de iniciação da transcrição SP6 RNA polimerase: base 141

Sítio de ligação do oligo pUC/M13 Reverse: bases 176-197

Códon iniciador *lacZ*: base 180

Operador *lac*: bases 200-216

Região codificadora  $\beta$ -lactamase (resistência à ampicilina): bases 1331-2197

Região fago f1: 2380-2835

Seqüências do *lac operon*: bases 2836-2996, 166-395

Sítio de ligação do oligo pUC/M13 foward: bases 2949-2972

Promotor T7 RNA polimerase (-17 a +3): 2999-3

#### 4.6.1. Amplificação do gene p28 da *Ehrlichia canis* pela PCR

O gene *p28-7* de *E. canis* foi amplificado pela PCR com oligonucleotídeos diferentes, dependendo do vetor a ser utilizado. A escolha do gene *p28-7* foi baseada em descrição da expressão da proteína P28-7 que, por ser antigênica e imunogênica, parece ser importante ferramenta para o diagnóstico sorológico (McBRIDE et al., 1999). O desenho dos oligonucleotídeos iniciadores foi baseado na seqüência do gene depositada no banco de dados GenBank sob o número de acesso AF082744.

Os oligos ECAN28-F e ECAN28-R foram desenhados com o intuito de amplificar um fragmento para a clonagem no vetor pGEM-T Easy (PROMEGA®) e, posteriormente, subclonagem no vetor de expressão pET-28a, em fase de leitura correta. Para tanto, foram adicionados aos oligonucleotídeos iniciadores, sítios de restrição para as endonucleases *NdeI* e *XhoI* (bases sublinhadas), os quais estão presentes no vetor pET-28a:

ECAN28-F (5'- TTGCATATGAATTGCAAAAAAAAA -3')

ECAN28-R (5'- ACTCGAGTTAGAAAGTTAAATC -3')

A reação de amplificação foi semelhante àquela citada no item 4.5.2, mas com modificações na temperatura de anelamento, que variou entre 33°C e 39°C, no primeiro ciclo, e entre 50°C a 65°C a partir do segundo ciclo.

A extração do DNA amplificado do gel de agarose foi realizada com o GENE CLEAN® II Kit (Q-BioGene), conforme protocolo fornecido pelo fabricante.

#### 4.6.2. Reação de ligação

O vetor pGEM-T Easy provém de um sistema de clonagem de produtos da PCR, que é preparado pela clivagem com a enzima de restrição *EcoV* e adicionado de timidina nas extremidades 3'. Essas timidinas localizadas na posição 3' do sítio de clonagem aumentam a eficiência da ligação do produto da PCR no plasmídeo, prevenindo a recircularização do vetor e oferecendo uma base compatível para os produtos da PCR amplificados por algumas polimerases termoestáveis (MEZEI &

STORTS, 1994) que, freqüentemente, adicionam uma deoxiadenosina na extremidade 3' do fragmento amplificado (CLARK, 1988). Para a seleção dos clones positivos, o vetor possui um gene de resistência à ampicilina e promotores para RNA polymerase T7 e SP6, seguido do sítio múltiplo de clonagem, dentro da região codificadora  $\alpha$ -peptídeo da enzima  $\beta$ -galactosidase. A inativação do  $\alpha$ -peptídeo pela inserção do fragmento de DNA no sítio de clonagem permite a detecção dos clones positivos pela ausência de cor, sendo que os clones negativos apresentam-se azulados.

A clonagem do gene *p28* no vetor pGEM-T Easy (PROMEGA) (Fig. 1) e as reações foram executadas conforme indicações do kit.

A quantificação da amostra de DNA extraída do gel de agarose com o Kit GENE CLEAN II foi realizada no Biofotômetro (Bio-Rad). A concentração de DNA na amostra foi de 160  $\mu\text{g/mL}$  utilizando-se a absorbância a 260nm. As concentrações de DNA e vetor a serem utilizados na reação de ligação foram determinadas com o objetivo de se obter, ao final, uma relação inserto:vetor de 3:1 com base na fórmula descrita abaixo:

$$\frac{\text{ng do vetor} \times \text{kb do inserto}}{\text{kb do vetor}} \times \text{Relação inserto : vetor} = \text{ng do inserto}$$

A reação de ligação do DNA de interesse com o vetor, de volume final 10 $\mu\text{l}$  consistiu em 40ng de inserto (DNA amostra), 5 $\mu\text{l}$  de tampão da enzima, 50ng do vetor pGEM-T Easy, 1 $\mu\text{l}$  da enzima T4 Ligase e água deionizada q.s.p. As soluções foram misturadas e incubadas por 12 horas a 4°C, para obtenção do número máximo de transformantes. A Figura 1 mostra o desenho do vetor pGEM-T Easy.

#### 4.6.3. Transformação das células competentes de *Escherichia coli* DH10B

Os produtos das ligações descritas anteriormente foram utilizados para transformar células competentes *E. coli* DH10B ( $10^9 - 10^{10}$  cfu/ng de DNA).

Foram adicionados 4 $\mu\text{l}$  do produto da ligação a 50 $\mu\text{l}$  de células competentes, e a mistura foi mantida por 20 minutos em gelo. O choque térmico das células foi realizado

colocando-se os microtubos num banho de água a 42°C por 2 minutos. Foram adicionados 950µL de meio líquido 2xTY (16g de Triptona; 10g de Extrato de Levedura; 5,0g de NaCl e água destilada q.s.p. 1.000mL), e as células foram incubadas a 37°C durante 60 minutos em agitação. Às placas, contendo meio sólido 2xTY (16g de Triptona; 10g de Extrato de Levedura; 5,0g de NaCl; 12g de Agar; água destilada q.s.p. 1.000mL) e 100µg/mL de ampicilina e preparadas com 40µl de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) (0,026%) e IPTG (isopropylthio-β-galactoside) (0,82mM), foram adicionados 100µl de células transformadas com o plasmídeo pGEM-T\_p28. Após incubação a 37°C por 12 a 14 horas, as colônias de bactérias contendo os clones positivos (colônias brancas) foram transferidas para tubos cônicos de 15mL, contendo 3mL de meio líquido 2xTY e 100µg/mL de ampicilina. Após incubação a 37°C por até 12 horas, as amostras foram submetidas à minipreparação para posterior análise dos clones transformantes.

#### **4.6.4. Minipreparação de DNA Plasmidial (Método da lise alcalina)**

Para a extração do DNA plasmidial foi utilizado o Método da Lise Alcalina (SAMBROOK et al., 2001). Os tubos, contendo meio 2xTY acrescido de antibiótico e inoculado com as colônias de bactérias foram incubados a 37°C por aproximadamente 12 horas sob agitação de 250 rpm. Posteriormente, foram centrifugados e aos sedimentos foram adicionados 100µl de solução Glicose-EDTA-Tris HCL (23mL de glicose 20%; 10mL de EDTA 0,5M pH 8,0; 13mL de Tris-HCL 1M pH 7,4 e água destilada q.s.p. 500mL). Após homogeneização, o material foi transferido para microtubos de 1,5mL e foram adicionados 200µl da solução de lise (1mL de NaOH, 500µl de SDS 10%, água destilada q.s.p. 5mL). A mistura foi realizada por inversão e as amostras foram deixadas sob refrigeração (em gelo) por 5 minutos. A cada amostra adicionou-se 150µl de acetato de potássio a 3M. As amostras foram misturadas, deixadas no gelo novamente por 5 minutos e centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C em microcentrífuga (Eppendorf 5415R). O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e 1 mL de etanol absoluto foi adicionado, misturado e colocado no congelador a -80°C por 15 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas e o

sobrenadante obtido desprezado. Foi adicionado 1 mL de etanol 70% e as amostras foram submetidas à agitação até o descolamento do sedimento. Foi feita centrifugação por 5 minutos em temperatura ambiente, desprezou-se o sobrenadante e os tubos foram secos a vácuo por 5 minutos. Foi adicionado 100µl de RNase (200 µg/mL) e as amostras foram deixadas em banho-maria a 37°C por no máximo 2 horas. Após o banho, foram adicionados 50µl de fenol equilibrado em Tampão TE e a mistura foi homogeneizada em agitador por 1 minuto e centrifugada conforme descrito anteriormente. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo contendo 10µl de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 200µl de etanol absoluto. Após 15 minutos à temperatura de -80°C, a mistura foi novamente centrifugada e, desta vez, o sobrenadante foi desprezado. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70%, seco a vácuo por 5 minutos e diluído em água ultrapura.

#### **4.7. Análise dos clones recombinantes**

##### **4.7.1. Seqüenciamento do gene *p28* da *E. canis***

O seqüenciamento do gene *p28* clonado no vetor pGEM-T Easy foi realizado pelo método da terminação da cadeia por dideoxynucleotídeo (SANGER et al., 1977), utilizando-se seqüenciador automático. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o seqüenciamento do plasmídeo pGEM-T\_*p28* foram o “M13 forward” (5'-GTA AAA CGA CGC CGC CCA-3') e “M13 reverse” (5'-AAC AGC TAT GAC CAT G-3'), conforme preconiza o kit do vetor de clonagem. O protocolo da reação de seqüenciamento foi realizado com algumas modificações a partir daquele descrito pelo fabricante do Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Utilizou-se 3,5µl do Tampão 2,5x (200 mM Tris-HCl pH 9,0; 5 mM MgCl<sub>2</sub>); 0,5µl de Big Dye e 5pmoles de cada oligonucleotídeo M13, 2,5µl de água ultra pura e 1,5µl de DNA, sendo esta quantidade estimada pela verificação de intensidade das bandas em gel de agarose 0,8%. As amplificações foram, inicialmente, no termociclador (MJ Research-Inc) a 96°C por 2 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 45 segundos,

anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos e mantida a 4°C por tempo indeterminado.

O processo de lavagem das amostras foi feito adicionando-se 80µl de Isopropanol 75% em cada amostra. A placa foi selada com alumínio e, após incubação por 15 minutos em local escuro à temperatura ambiente, foi centrifugada a 4.000g por 30 minutos a 20°C. O sobrenadante foi descartado e 200µl de Etanol 70% foi adicionado, e a placa foi novamente centrifugada, agora por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e a mesma quantidade de Etanol 70% foi acrescida, repetindo-se o passo anterior. A placa foi centrifugada invertida (aceleração e desaceleração 1) e, em seguida, colocada na bomba de vácuo por 5 minutos para completa secagem das amostras. Após dissolução das amostras em formamida, o seqüenciamento foi conduzido no seqüenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

#### 4.7.2. Análise das Seqüências

As seqüências de nucleotídeos, obtidas no seqüenciamento, foram submetidas à alinhamento e análise no Laboratório de Bioinformática do Laboratório de Biologia Molecular (FCAV- UNESP). A “trimagem” foi feita pelo programa Phred (EWING et al., 1998), que avalia os eletroferogramas gerados nos seqüenciamentos dos clones, observando-se a qualidade dos picos correspondentes a cada base seqüenciada e conferindo um valor de probabilidade de erro a cada uma das amostras. Foram consideradas as bases com qualidade acima de 20. O programa Cross-match (<http://www.phrap.org>, EWING et al., 1998) foi utilizado para identificar seqüências do vetor e realizar o alinhamento da seqüência consenso. O programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, ALTSCHUL et al., 1990) foi utilizado para analisar as seqüências de nucleotídeos (BLASTN) e de aminoácidos (BLASTX), com a finalidade de procurar e comparar genes similares em banco de dados internacionais (GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com a seqüência aqui obtida.

Com o intuito de analisar o gene *p28* com relação à presença de códons raros, utilizou-se o programa computacional Graphical Códon Usage Analyser 2.0

(<http://gcua.schoedl.de>), que permite analisar códons de uma seqüência nucleotídica e comparar a freqüência destes códons com seqüências contidas em um banco de dados. Dessa forma, foi possível comparar a freqüência de códons da seqüência do gene *p28* com os códons da *E. coli* e detectar, assim, a presença de códons raros.

## 4.8. Subclonagem no vetor de expressão pET-28a

### 4.8.1. Vetor de expressão pET-28a

O vetor de expressão pET-28a foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Maria Célia Bertolini, do Laboratório de Bioquímica e Genética de Microorganismos, Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química da UNESP, Araraquara. Esse vetor foi utilizado para a expressão da proteína P28, após a clonagem do gene *p28* no vetor pGEM-T Easy. Algumas características importantes motivaram a escolha desse sistema de expressão. O sistema pET é o mais utilizado atualmente para expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*. O vetor pET-28a permite a expressão da proteína recombinante fusionada à 6 resíduos de histidina na extremidade amino (N-terminal) ou carboxi-terminal (C-terminal), o que facilita a purificação por técnicas de cromatografia de afinidade, com resinas de sefarose combinadas com o níquel. Além disso, a expressão do gene está sob o controle do promotor do fago T7, que promove a expressão gênica pela indução com IPTG em algumas linhagens de *E. coli*. Os vetores do sistema de plasmídeos para Expressão com T7 RNA polimerase (pET) utilizam um promotor do fago T7 que é reconhecido pela RNA polimerase do fago (T7 RNA polimerase), mas não pela RNA polimerase da *E. coli*. Assim, a transcrição do DNA clonado, necessária para a síntese da proteína, só ocorre após a expressão da T7 RNA polimerase na bactéria hospedeira. Além disso, a velocidade de transcrição da T7 RNA polimerase é cinco vezes maior do que a da RNA polimerase de *E. coli*, conferindo, ao sistema pET altos níveis de transcrição do DNA clonado. Os vetores pET são derivados do plasmídeo pBR322, em cujo sítio único de *BamH I* foi clonado o fragmento -23 a +96 do mRNA do gene 10 do fago T7. Essa seqüência de nucleotídeos

contém o forte promotor do gene 10 ( $\Phi 10$ ), o sítio de ligação do ribossomo ou seqüência de Shine-Delgarno (SD) do gene 10, os 11 primeiros aminoácidos (S10) da proteína codificada pelo gene 10 (seqüência líder) e sítios de clonagem (*NdeI*, *NheI* e *BamHI*). Este vetor de expressão contém todos os elementos necessários para a transcrição e tradução eficiente dos DNAs clonados (STUDIER et al., 1990). A Figura 2 mostra o mapa do vetor pET-28a.

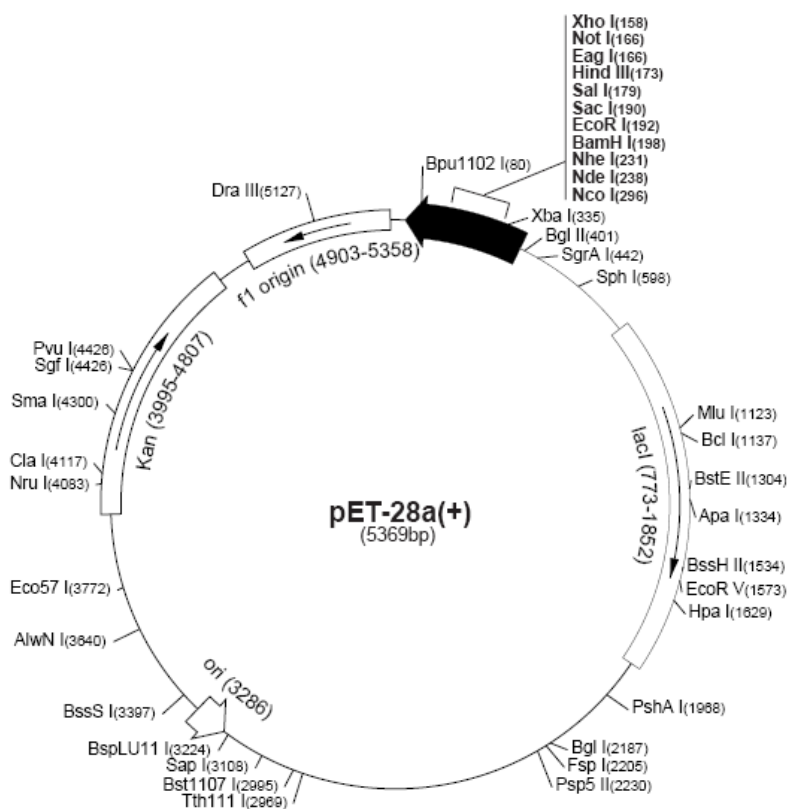


Figura 2. Mapa do vetor de expressão pET-28a (Novagen).

Características do vetor de expressão pET-28a:

5369 nucleotídeos

Promotor T7: bases 370-386

Ínicio da transcrição T7: base 369

Seqüência codificadora da His-tag: bases 270-287

Seqüência codificadora da T7-tag: bases 207-239

Região múltipla de clonagem (*Bam*HI – *Xho*I): bases 158-203

Seqüência codificadora da His-tag: bases 140-157

Terminador T7: bases 26-72

Seqüência codificadora *lacI*: bases 773-1852

Origem pBR322: base 3286

Gene de resistência a kanamicina: bases 3995-4807

Origem f1: bases 4903-5358

#### **4.8.2. Digestão e purificação do fragmento de DNA e do vetor de expressão**

O plasmídeo pGEM-T\_*p28* foi extraído pela minipreparação descrita no item 4.6.4. e submetido à digestão com as endonucleases *NdeI* e *XhoI* (New England BioLabs), com o objetivo de se realizar uma subclonagem unidirecional, mantendo-se a fase de leitura do gene *p28* para correta expressão com o vetor pET-28a.

Aproximadamente, 5µg da construção pGEM-T\_*p28* foram digeridas com 20U das enzimas *NdeI* e *XhoI*, numa reação de 20µl contendo 0,5µl de BSA. A reação foi incubada a 37°C por aproximadamente 12 horas. Da mesma forma, o vetor pET-28a foi digerido com as endonucleases *NdeI* e *XhoI* para, posteriormente, ser ligado ao fragmento *p28*. As bandas referentes aos fragmentos *p28* e vetor pET-28a, resultantes das reações de digestão, foram visualizadas em gel de agarose 0,8% e, então, purificadas com o kit GENE CLEAN II (QbioGene), conforme instruções do fabricante. A quantificação do DNA resultante da purificação foi feita por comparação com o auxílio do Padrão de Baixa Massa Molecular (“Low Mass Ladder” - Invitrogen)

#### **4.8.3. Reação de ligação do gene *p28* com vetor pET-28a, transformação e extração plasmidial**

Foram realizados diferentes protocolos para reação de ligação, alterando-se as proporções vetor:fragmento (1:1; 1:2 ou 1:3), com a finalidade de maximizar a eficiência da subclonagem. Na reação de ligação, além do vetor e do fragmento, foram incubados 10 U da enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs) e 1µl do tampão 10X, em volume final de 10µl, por 12 horas, a 16°C. Os produtos resultantes da ligação foram transformados em células competentes de *E. coli* DH10B, conforme descrito no item 4.6.3. O DNA plasmidial foi extraído pela minipreparação, de acordo com o item 4.6.4; e os clones foram analisados conforme o item 4.7. O seqüenciamento permitiu a seleção dos clones que continham o plasmídeo em fase de leitura correta.

## 4.9. Expressão da proteína P28 de *Ehrlichia canis* no vetor pET-28a

### 4.9.1. Seleção das estirpes de *Escherichia coli*

O plasmídeo pET28a\_p28, apresentando fase de leitura correta, foi selecionado para transformar células de *E. coli* competentes das linhagens BL21 (DE3). *E. coli* BL21 é a bactéria mais utilizada para expressão de proteínas heterólogas, pois é deficiente nas proteases *lon* e *ompT*, evitando, assim, a degradação proteolítica da proteína recombinante por essas proteases da *E. coli*. A bactéria BL21(DE3) é uma linhagem lisogênica muito utilizada no sistema pET de expressão. Ela é obtida pela infecção da *E. coli* BL21 pelo fago DE3, um derivado do fago  $\lambda$ , que contém clonado o gene da T7 RNA polimerase sob controle do promotor LacUV5. É capaz de produzir T7 RNA polimerase, quando o promotor lacUV5 for induzido com isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) adicionado ao meio de cultura. A T7 RNA polimerase produzida transcreve o DNA clonado no vetor pET, produzindo grandes quantidades de mRNA que é então utilizado pela bactéria para produzir grandes quantidades da proteína recombinante.

Na tentativa de expressar a proteína P28, outras cepas de *E. coli* foram testadas. Linhagens de *E. coli* BL21 Star(DE3)pLysS e de BL21(DE3)pLysS foram transformadas e submetidas à indução da expressão gênica. A *E. coli* BL21(DE3) pLysS carrega o fago DE3 e ainda o plasmídeo pLysS, que produz a T7 lisozima, inibidor natural da T7 RNA polimerase, reduzindo a expressão basal do gene de interesse. É uma bactéria muito utilizada para expressão de genes tóxicos. A cepa BL21 Star(DE3)pLysS sofreu uma mutação na RNase E, reduzindo a degradação protéica e, portanto, aumentando a expressão, além de possuir o plasmídeo pLysS, importante para o controle da expressão. Essa cepa permite a expressão de proteínas solúveis e insolúveis.

Com o intuito de resolver problemas encontrados na expressão, possivelmente causados pela presença de códons raros na seqüência do gene *p28*, a expressão foi testada na *E. coli* competente da linhagem BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Stratagene). A expressão de genes recombinantes heterólogos em *E. coli* é dificultada pela presença de códons utilizados pelo gene recombinante que diferem daqueles usuais da bactéria.

A tentativa de expressão desses genes raramente utilizados pelas bactérias causa uma redução nos “pools” de tRNA. Há um atraso na transcrição do RNA, resultando em degradação da proteína ou substituição de códons que destroem as características funcionais da proteína. Isso, geralmente, ocorre na presença dos códons de arginina (AGA e AGG), porém códons de isoleucina (AUA), leucina (CUA) e prolina (CCC) também são raros para *E. coli*. A linhagem BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Stratagene) carrega cópias extras dos genes tRNA *argU*, *ileY* and *leuW*. Os tRNAs codificados por esses genes reconhecem os códons AGA/AGG, AUA e CUA, considerados raros, corrigindo a transcrição e permitindo, então, a expressão de códons considerados raros.

A adição do antibiótico Cloranfenicol ao meio de cultura se faz necessária às estirpes de *E. coli* competentes aqui utilizadas, com exceção da linhagem BL21(DE3). A função do antibiótico é manter o plasmídeo pLysS, no caso das linhagens BL21(DE3) pLysS e BL21 Star(DE3)pLysS, e o plasmídeo pACYC na linhagem BL21-CodonPlus(DE3)-RIL de *E. coli*.

A linhagem de *E. coli* BL21(DE3) foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Maria Célia Bertolini, do Laboratório de Bioquímica e Genética de Microorganismos, Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, UNESP, Araraquara. As linhagens BL21(DE3) pLysS, BL21 Star(DE3)pLysS e a BL21-CodonPlus(DE3)-RIL foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro, do laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Tecnologia, UNESP, Jaboticabal.

#### **4.9.2. Transformação na *E. coli* e indução da expressão da proteína P28**

Inicialmente, bactérias *E. coli* competentes da linhagem BL21(DE3) foram transformadas com a construção plasmidial pET28a\_p28. Dez microlitros do DNA plasmidial (aproximadamente 500ng) foram adicionados a 80µl de cada cultura de células competentes e a transformação foi realizada por choque térmico. As reações foram incubadas em gelo por 30 minutos e, posteriormente, submetidas a uma temperatura de 42°C por 2 minutos. Foram adicionados 950µl de meio líquido 2xTY e as células foram incubadas a 37°C durante 60 minutos, sob agitação e sem antibiótico. A cultura de células transformadas foi espalhada em meio sólido 2xTY contendo o

antibiótico de seleção do plasmídeo recombinante (50µg/mL de kanamicina) e as placas, incubadas por aproximadamente 12 horas a 37°C. As colônias de *E. coli* BL21(DE3), transformadas com os clones de interesse, foram inoculadas em 10mL de meio 2xTY líquido, com antibiótico, e a cultura foi incubada a 37°C sob agitação até atingir absorbância de 0,6-0,8 a um comprimento de onda de 600nm. Um mililitro da cultura foi colhido como controle da indução (não induzido) e, ao volume restante, foi adicionado IPTG nas concentrações de 0,4, 0,8, 1,0 e 1,6mM. A cultura foi incubada por, aproximadamente, 12 horas a 30°C e a 37°C e, durante esse tempo, amostras foram colhidas após 2, 4, 6 e 12 horas de indução, para serem analisadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

Posteriormente, as linhagens BL21(DE3)pLysS, BL21 Star(DE3)pLysS e BL21-CodonPlus(DE3)-RIL de *E. coli* foram também transformadas por choque térmico, conforme descrito para BL21(DE3), exceto que, para essas linhagens, foi necessária a adição do cloranfenicol (34 µg/mL). As bactérias foram submetidas à indução com IPTG nas concentrações de 0,4 e 0,8 mM. Cada uma das culturas bacterianas foi incubada a 30°C e a 37°C e as amostras colhidas conforme descrito para BL21(DE3).

Como controle positivo da indução, utilizou-se uma amostra de cultura de células de *E. coli* BL21(DE3) transformada com a plasmídeo pET28a\_3607, que é o clone produtor XAC3607, que corresponde ao gene *uptC* de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. A proteína expressa a partir desse clone possui 378 resíduos de aminoácidos e, fusionada à cauda poli-His, tem uma massa molecular de aproximadamente 45 kDa. A expressão dessa proteína (controle positivo) foi induzida em todas as linhagens de bactérias aqui utilizadas (BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21 Star(DE3)pLysS e BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, com IPTG a 0,4 mM e incubação de 30°C e 37°C.

#### **4.9.3. Indução da expressão da proteína P28 em *E. coli* em larga escala**

A indução da expressão da proteína P28, em larga escala, foi realizada com o objetivo de confirmar resultados encontrados após análise da expressão em pequena escala. Após a transformação da construção plasmidial pET28a\_p28 na *E. coli* BL21(DE3)pLysS e plaqueamento em meio 2xTY sólido, colônias foram colhidas e

inoculadas em 50mL de meio de cultura 2xTY líquido contendo kanamicina (50µg/mL) e cloranfenicol (34µg/mL). A cultura foi incubada a 37°C sob agitação de 250 rpm, durante 12 horas. Dez mililitros desse inóculo foram adicionados a 500mL de meio líquido 2xTY, contendo os antibióticos indicados, e novamente incubados nas mesmas condições. No momento em que a densidade óptica atingiu leitura de 0,6-0,8 a um comprimento de onda de 600nm, um mililitro de cada cultura foi colhido como controle da indução e, ao volume restante, foi adicionado IPTG na concentração de 0,8mM. A cultura foi incubada por aproximadamente 4 horas a 37°C. Amostras do extrato bruto de bactérias foram colhidas antes e após indução para, posteriormente, serem analisadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme descrito no item 4.11. O volume restante da cultura foi centrifugado a 5.000 rpm (Sorvall Legend Mach 1.6R), a 4°C durante 10 minutos, e o pellet de células foi ressuspensão em Tampão (20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500mM NaCl, 20mM imidazole, pH 7,4).

A lise celular foi realizada em sonicador de células (Branson Sonifier 250), com potência de 100%, pulso a cada 9 segundos, durante 5 minutos. O lisado celular foi centrifugado a 20.000 rpm (Sorvall Legend Mach 1.6R), durante 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi purificado por cromatografia de afinidade para obtenção da proteína recombinante.

#### **4.10. Purificação por cromatografia de afinidade**

O sobrenadante obtido após lise celular foi aplicado a uma coluna de cromatografia de afinidade, His GraviTrap (GE Healthcare<sup>®</sup>), para purificação da proteína recombinante. A escolha do método de purificação foi baseada na expressão da proteína recombinante fusionada à polihistidina em vetores pET. A estratégia permite uma rápida purificação da proteína de fusão através da cromatografia em coluna de afinidade de metal imobilizado, na qual a seqüência poli-His é quelada e eluída. As proteínas recombinantes fusionadas a poli-His têm uma alta afinidade pelo níquel (Ni<sup>2+</sup>). Conseqüentemente, essa proteína é seletivamente ligada a um meio carregado com íons metal imobilizado, enquanto outras proteínas celulares formam ligações fracas ou

são lavadas com tampões. As seqüências de poli-His são pequenas e, portanto, não alteram as propriedades das proteínas as quais estão ligadas. O kit utilizado é composto por uma coluna que contém um meio de níquel (Ni Sepharose) que permite a purificação de proteínas fusionadas por cromatografia de afinidade ao metal imobilizado, apenas pela ação da gravidade. A purificação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

Após a purificação, o produto da eluição foi analisado em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

#### **4.11. Análise do produto da expressão do gene *p28* no vetor pET-28a**

##### **4.11.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

As amostras da proteína recombinante His6\_P28 foram analisadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes, de acordo com técnica preconizada por LAEMMLI (1970). Foram analisadas amostras obtidas das culturas de *E. coli* BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21 Star(DE3)pLysS e BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, transformadas com o plasmídeo pET28a\_p28 antes e após 2, 4, 6 e 12 horas de indução, além da amostra purificada pela coluna de níquel sepharose.

De acordo com o volume das amostras, foi adicionado tampão da amostra 4x concentrado (250mM Tris-HCl pH 6,8, 40% glicerol, 8% SDS, 20%  $\beta$ -mercaptoetanol e 0,008% de azul de bromofenol). As amostras foram homogeneizadas, incubadas por 5 minutos a 100 °C, e aplicadas no gel.

O gel de separação foi preparado na concentração de 12% de poliacrilamida em tampão (1,875M Tris, pH 8,8 e 1% SDS) e de 5% de poliacrilamida para o gel de empacotamento em tampão (1,875M Tris, pH 6,8 e 0,5% SDS). A eletroforese foi realizada em tampão Tris-Glicina (50mM Tris, pH 8,6, 1,92 M glicina e 1% SDS), a 100V por até 80 minutos em temperatura ambiente, no sistema Mini-Protean II (Bio-Rad).

Após a eletroforese, os géis foram transferidos para uma cuba contendo solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,05% de Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% de

metanol e 10% de ácido acético) e deixados sob baixa agitação por até 20 minutos. A descoloração dos géis foi realizada com solução descolorante (30% de metanol e 7% de ácido acético) sob baixa agitação por até 1 hora. Os géis foram conservados em água destilada.

O peso molecular da proteína His6\_P28 foi estimado com base na seqüência de aminoácidos resultante do seqüenciamento de DNA da amostra Jaboticabal, acrescido do peso molecular dos 6 resíduos de Histidina.

#### **4.11.2. Western-blotting**

Amostras do extrato bruto de bactérias após a indução foram analisadas pelo Western-blotting (TOWBIN et al., 1979). As incubações foram realizadas utilizando anticorpo policlonal anti-*E. canis*, de cão infectado experimentalmente com *E. canis*, e anticorpo monoclonal Anti-His (GE Healthcare).

As proteínas separadas no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), descrito no item 4.11., foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Bio-Rad), previamente incubada em tampão de transferência gelado (0,58% Tris pH 8,3, 20% metanol, 0,037% SDS e 0,29% glicina). Para isso, a membrana foi colocada no sistema de eletrotransferência "Mini Trans-Blot" (Bio-Rad), contendo o mesmo tampão, e a transferência foi realizada a 100V durante 60 minutos. A transferência foi visualizada na membrana de nitrocelulose pela coloração com solução de "Ponceau-S" (0,1% Ponceau-S e 10% ácido acético) por 5 minutos e descorada em água destilada.

A membrana de nitrocelulose foi incubada em TBS-Tween (10mM Tris-HCl pH 7,5; 150mM NaCl, 0,05% Tween-20) acrescido de 5% de leite em pó desnatado, por 12 horas, sob baixa agitação, para saturação de sítios de ligação inespecíficos. A membrana foi então incubada com soro contendo anticorpos anti-*E. canis* diluído 1:100, ou incubada com anticorpo monoclonal anti-His diluído 1:3.000 em TBS-Tween e 5% de leite em pó durante 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação lenta. Em seguida, foi submetida a três lavagens consecutivas de 10 minutos cada com a mesma solução.

Para a detecção do complexo antígeno-anticorpo, a membrana foi incubada em conjugado canino acoplado à fosfatase alcalina (IgG de coelho anti IgG de cão), diluído

1:4.000 em TBS-Tween, ou em conjugado de camundongo acoplado à fosfatase alcalina (IgG de cabra anti-IgG de camundongo) diluído 1:30.000 em TBS-Tween. A membrana foi submetida a 3 lavagens, conforme descrito anteriormente, e a revelação se deu pela adição do substrato da enzima BCIP-NBT, utilizando-se o kit “Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate” (Bio-Rad), de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.12. Clonagem do gene *p28* no vetor pET SUMO**

Com o objetivo de se obter resultados e contornar problemas encontrados na expressão da proteína P28, um diferente sistema de expressão foi utilizado. Para tanto, o gene *p28* foi clonado no vetor pET SUMO (Invitrogen) que permite a clonagem e a expressão de uma proteína de interesse, fusionada à proteína SUMO, que incrementa a expressão da proteína recombinante e aumenta a solubilidade de proteínas parcialmente insolúveis. Além disso, a estrutura terciária da partícula SUMO é reconhecida de forma específica e clivada pela enzima SUMO protease. Quando essa partícula está fusionada ao N-terminal da proteína de interesse, na presença da SUMO protease, ocorre a clivagem dessa partícula, resultando na produção da proteína nativa. A proteína SUMO é originária da *Saccharomyces cerevisiae*, que faz parte da família da proteína “ubiquitina-like” responsável por regular vários processos celulares.

No vetor pET SUMO, a expressão do gene de interesse é controlada por um promotor bacteriófago T7 forte que foi modificado para conter um “*lac operator*”. Para a expressão do gene, é necessário o suprimento com T7 RNA polimerase para as células, que é fornecida pela *E. coli* BL21 (DE3) que, quando em quantidade suficiente, liga-se ao promotor T7 e transcreve o gene de interesse (STUDIER et al., 1990) (Fig.3).



Fig. 3. Mapa do vetor de clonagem e expressão pET SUMO (Invitrogen).

#### Características do vetor pET SUMO

5643 pares de bases

Promotor T7: bases 209-225

*Lac operator (lacO)*: bases 228-252

Sítio de ligação do ribossomo (RBS): bases 282-288

ATG iniciador: bases 297-299

Epítopo HisG: bases 309-329

ORF SUMO: bases 360-653

Sítio para o oligo SUMO forward: bases 549-571

Sítio de clonagem TA: bases 653-654

Sítio para o oligo T7 reverse: bases 783-802 (c)

Terminador T7: bases 744-872

Gene de resistência a kanamicina: bases 1431-2246 (c)

Origem pBR322: bases 2342-3015

ORF *ROP*: bases 3383-3574

ORF *lacI*: bases 4383-5474 (c)

(c) = fita complementar

#### 4.12.1. Amplificação do gene *p28* da *Ehrlichia canis* pela PCR

A clonagem gênica foi iniciada a partir da amostra Jaboticabal de *E. canis* criopreservada em 10% de DMSO (dimetil sulfóxido). A extração do DNA dessa amostra foi realizada com QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®), conforme indicações do fabricante. Para a amplificação de um fragmento a ser clonado no vetor pET SUMO, foram utilizados os oligos P28-7F e P28-7R, e a reação no termociclador foi aquela descrita no item 4.5.2.

#### 4.12.2. Reação de ligação

A concentração da amostra de DNA extraída do gel de agarose com o Kit GENE CLEAN II foi mensurada por comparação com as bandas do Padrão de Baixa Massa Molecular (“Low Mass Ladder” - Invitrogen). A concentração aproximada de DNA na amostra foi 50µg/mL. As concentrações de DNA e vetor a serem utilizados na reação de ligação foram determinadas com o objetivo de se obter, ao final, uma relação inserto:vetor de 3:1.

A reação de ligação entre o DNA do gene *p28* e vetor, de volume final 10 µL, consistiu de 50 ng de inserto (DNA amostra), 1µl de tampão da enzima 10x, 50 ng do vetor pET SUMO, 1µl da enzima T4 Ligase (4,0 Weiss units) e água deionizada q.s.p. As soluções foram misturadas e incubadas por 12 horas, a 15°C, para obtenção do número máximo de transformantes.

#### 4.12.3 Transformação das células competentes de *Escherichia coli* DH10B

Os produtos das ligações descritas anteriormente foram utilizados para transformar células competentes *E. coli* DH10B ( $10^9 - 10^{10}$  cfu/ng de DNA). As reações foram semelhantes àsquelas realizadas para o pGEM-T Easy, conforme descrito no item 4.6.3, com exceção do antibiótico para seleção dos transformantes. Como esse vetor tem gene de resistência a kanamicina, para a seleção das bactérias *E. coli* DH10B,

transformadas com o plasmídeo pET SUMO deve-se adicionar, ao meio de cultura, a kanamicina (50µg/mL).

As colônias de bactérias foram transferidas para tubos cônicos de 15mL contendo 5mL de meio líquido 2xTY e 50µg/mL de kanamicina. Após incubação a 37°C por até 24 horas, as amostras foram submetidas à minipreparação para posterior análise dos clones transformantes. Essa minipreparação foi realizada pelo método da lise alcalina, conforme descrito no item 4.6.4.

### **4.13. Análise dos clones recombinantes**

#### **4.13.1. Seqüenciamento**

O seqüenciamento do plasmídeo pETSUMO\_p28 foi realizado pelo método da terminação da cadeia por dideoxynucleotídeo (SANGER et al., 1977), com seqüenciador automático, para a seleção dos clones positivos, ou seja, aqueles que apresentavam a ligação entre o vetor e o fragmento em fase de leitura correta.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o sequenciamento foram o SUMO “forward” e o T7 “terminator”. O protocolo da reação de seqüenciamento foi aquele descrito no item 4.7.1.

#### **4.13.2. Análise das Seqüências**

As seqüências de nucleotídeos obtidas no seqüenciamento foram submetidas a análise pelo programa computacional CAP3 Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) e pelo programa Six Frames Translation (<http://cgpdb.ucdavis.edu/database/sms/translation.php>), para a seleção do clone, cuja seqüência do plasmídeo traduzia adequadamente a proteína P28.

#### **4.14. Expressão da proteína P28 de *Ehrlichia canis* no vetor pET SUMO**

##### **4.14.1. Transformação na *E. coli* e indução da expressão da proteína SUMO\_P28**

O plasmídeo pETSUMO\_p28 apresentando fase de leitura correta, foi selecionado para transformar células de *E. coli* BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21 Star(DE3)pLysS e BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. A transformação foi realizada conforme descrito no item 4.9.2. As bactérias foram submetidas à indução com IPTG na concentração 0,8 mM. Cada uma das culturas bacterianas foi incubada a 30°C e a 37°C, e as amostras foram colhidas após 2, 4, 6 e 12 horas de indução, para serem analisadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Como controle positivo da indução, utilizou-se o plasmídeo pETSUMO/CAT fornecido pelo kit desse vetor (Invitrogen®). Esse plasmídeo permite a expressão de uma proteína de fusão conhecida como Cloranfenicol Acetil Transferase (CAT), que tem aproximadamente 39 kDa.

#### **4.15. Análise do produto da expressão do gene p28 no vetor pET SUMO**

##### **4.15.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

As amostras foram analisadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes, de acordo com técnica preconizada por LAEMMLI (1970). Foram analisadas amostras obtidas das culturas de *E. coli* BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21 Star(DE3)pLysS e BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, transformadas com o plasmídeo pETSUMO\_p28, antes e após 2, 4, 6 e 12 horas de indução.

A montagem do gel e as condições da eletroforese foram aquelas já descritas no item 4.11.1.

O peso molecular da proteína SUMO\_P28 foi estimado com base na seqüência de aminoácidos resultante do seqüenciamento de DNA da amostra Jaboticabal, acrescido do peso molecular de 6 resíduos de Histidina e da partícula SUMO.

#### **4.15.2. Western-blotting**

Amostras do extrato bruto de bactérias após a indução foram analisadas pelo Western-blotting (TOWBIN et al., 1979) anteriormente descrito (item 4.11.2). A incubação foi realizada utilizando-se anticorpo monoclonal Anti-His (GE Healthcare).

#### **4.16. Análise estatística**

Para comparação entre as técnicas sorológicas realizadas com antígeno bruto (Dot-ELISA e RIFI) de *E. canis*, e entre as técnicas nPCR-16S rRNA e PCR-*p28*, empregou-se o programa computacional Win Episcopy 2.0, desenvolvido para epidemiologia veterinária quantitativa que permite avaliar, simultaneamente, vários testes diagnósticos quanto a sua concordância (THRUSFIELD et al., 2001).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Resposta Imune Humoral

Dos 80 soros testados 68 (85%) foram considerados positivos, com títulos maiores que 1:80 pelo teste Dot-ELISA, enquanto 12 (15%) soros não apresentaram reatividade ao teste. Pela RIFI, com substrato antigênico de *E. canis*, foi possível detectar reatividade com corpúsculos fluorescentes, em 65 (81,25%) amostras, enquanto 15 (18,75%) amostras foram negativas. É importante observar que, dentre as amostras testadas, 61 (76,25%) apresentaram co-positividade e, em contrapartida, 8 (10%) apresentaram-se negativas para ambos os testes (Tab. 1). A concordância entre a RIFI e o Dot-ELISA, pela análise estatística, foi de 86%.

Tabela 1. Resultados obtidos na detecção de anticorpos anti-*E. canis* pela RIFI e pelo Dot-ELISA em 80 soros de cães atendidos no Hospital Veterinário da UNESP/Jaboticabal – SP, no período compreendido entre 2004 e 2005.

RIFI	Dot- ELISA		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	61 (76,25%)	4 (5%)	65 (81,25%)
Negativo	7 (8,75%)	8 (10%)	15 (18,75%)
<b>Total</b>	68 (85%)	12 (15%)	80 (100%)

## 5.2. Amplificação dos genes 16S rRNA e *p28* de *E. canis*

### 5.2.1. Amplificação do gene 16S rRNA pela nested PCR

Foram consideradas positivas aquelas amostras que apresentaram um produto amplificado de 398 pb pela nPCR (Fig. 4). Dentre as 80 amostras avaliadas, em 58 (72,50%) foram detectados os fragmentos de DNA amplificados de *E. canis*, enquanto em 22 (27,50%) amostras não houve amplificação (Tabela 2, pág. 45).

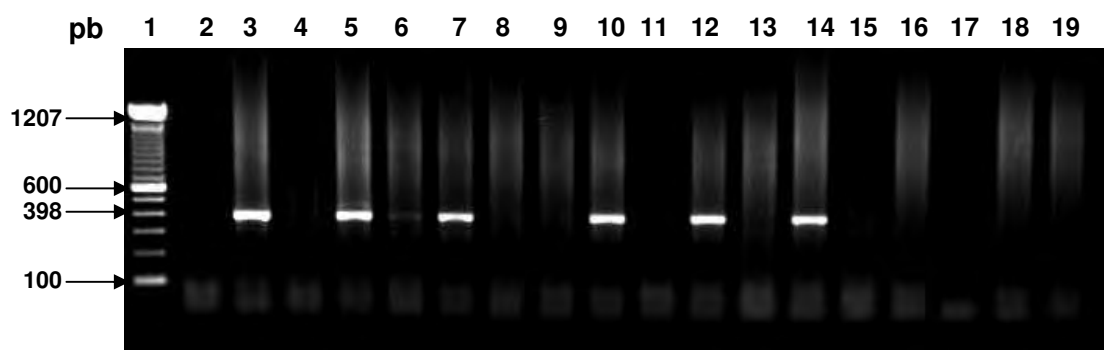


Figura 4. Detecção de DNA de *E. canis* pelo nested PCR em amostras sanguíneas colhidas de cães naturalmente infectados. Linha 1. marcador de peso molecular (100 pb); linha 2 - água; linha 3. controle positivo; linhas 4 a 19. produto amplificado da amostra sanguínea de 16 cães. A banda de 398 pb corresponde ao produto de amplificação do gene 16S rRNA de *E. canis*.

### 5.2.2. Amplificação do gene *p28* de *E. canis* pela PCR

A PCR para detecção do gene *p28* de *E. canis* foi otimizada, e a sensibilidade foi avaliada utilizando-se células DH82 100% parasitadas. Observou-se que essa técnica pode detectar até uma parasitemia de  $10^{-7}\%$ , ou seja, um parasita entre 1.000.000.000 de células (Fig. 5). Das 80 amostras sanguíneas de cães com suspeita clínica de erliquiose, testadas pela PCR para detecção do gene *p28* da *E. canis*, 41 (51,25%) amostras geraram produtos amplificados específicos, e 39 (48,75%) foram negativas para *E. canis* (Tab. 2, pág. 45). A Figura 6 mostra o resultado da PCR para a amplificação do gene *p28* de *E. canis* em 17 amostras, sendo que 10 amostras foram positivas, apresentando o produto amplificado de 843 pares de bases.

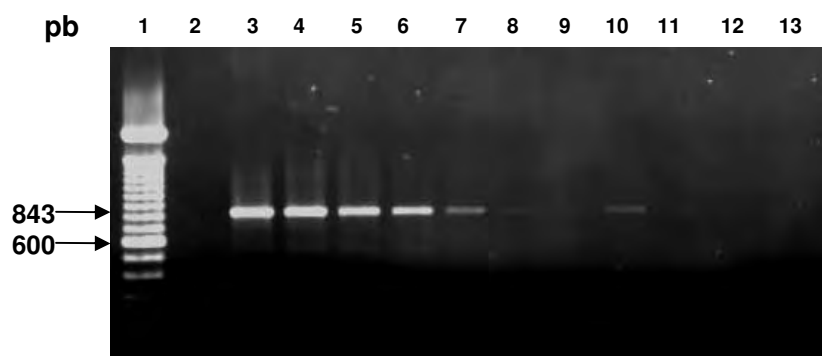


Figura 5. Avaliação da sensibilidade da PCR para a detecção do gene *p28* de *E. canis* em células DH82 100% parasitadas, em diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ . Linha 1, marcador de peso molecular (100 pb); linha 2, controle negativo; linha 3, controle positivo; linhas 4 a 13, diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ . A banda de 843 pb corresponde ao produto da amplificação do gene *p28* de *E. canis*.

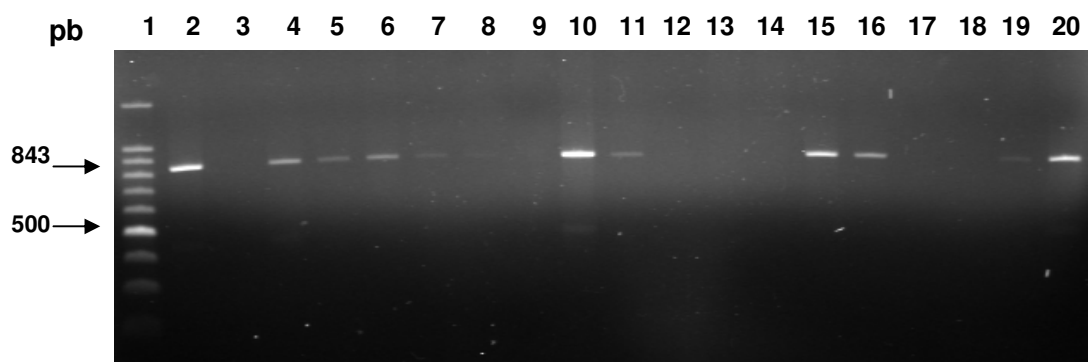


Figura 6. Detecção de DNA do gene *p28* de *Ehrlichia canis* pela PCR em amostras sanguíneas de cães com suspeita clínica de erliquiose. Linha 1, marcador de peso molecular 100pb (New England, BioLabs); linha 2, controle positivo; linha 3, controle negativo; linhas 4 a 20, 17 amostras sanguíneas de cães. A banda de 843 pb corresponde ao produto de amplificação do gene *p28* de *E. canis*.

### 5.2.3. Análise comparativa entre a nPCR-16S rRNA e a PCR-*p28*

A Tabela 2 mostra a análise comparativa entre as reações de PCR para detecção dos genes 16S rRNA e *p28*. Nota-se que 41 (51,25%) das amostras foram co-positivas, enquanto 22 (27,50%) apresentaram-se negativas aos dois testes. É importante ressaltar que todas as amostras positivas à PCR-*p28* foram também positivas à nPCR-16S rRNA (n=41), entretanto 17 (21,25%) amostras positivas à nPCR-16S rRNA não apresentaram produto amplificado frente à PCR-*p28*. A concordância entre a nPCR-16S rRNA e a PCR-*p28*, observada pela análise estatística, foi de 78%.

Tabela 2. Comparação entre os resultados obtidos na nPCR, baseada no gene 16S rRNA e na PCR para amplificação do gene *p28*, em 80 amostras sanguíneas de cães com suspeita clínica de erliquiose.

PCR ( <i>p28</i> )	nPCR (16S rRNA)		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	41 (51,25%)	0	41 (51,25%)
Negativo	17 (21,25%)	22 (27,50%)	39 (48,75%)
<b>Total</b>	58 (72,50%)	22 (27,50%)	80 (100%)

### 5.3. Clonagem e seqüenciamento do gene *p28* da amostra Jaboticabal de *E. canis*

#### 5.3.1. Amplificação do gene *p28* da *E. canis*

A padronização da reação de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores ECAN28-F e ECAN28-R, necessitou de várias mudanças nas concentrações dos reagentes.

A amplificação do DNA do gene *p28*, a partir dos oligonucleotídeos ECAN28-F e ECAN28-R, mostrou que a melhor temperatura de anelamento foi a de 34 °C no primeiro ciclo e 56 °C nos ciclos seguintes. A otimização da reação, utilizando-se a temperatura ideal de anelamento descrita acima e uma concentração dos oligonucleotídeos de 0,5pmol, resultou na amplificação de um único fragmento de 856 pb, visualizado no gel de agarose, que é baseado na seqüência do gene *p28* da amostra Jake de *E. canis* (GenBank, AF082744) e adicionado de bases correspondentes aos sítios de restrição para as endonucleases *NdeI* e *XhoI*. Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Fig. 7).

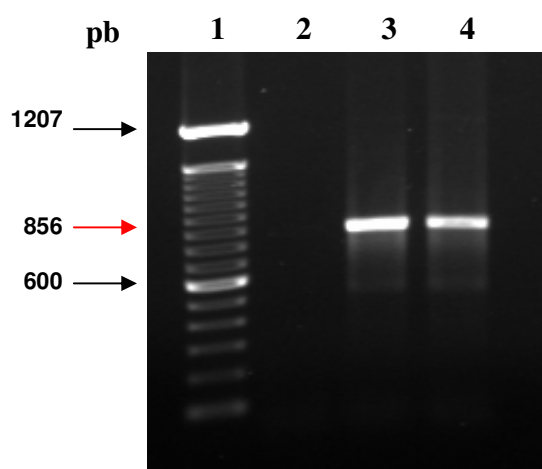


Figura 7. Análise do fragmento que caracteriza o gene *p28* amplificado pela PCR, adicionado de bases correspondentes aos sítios de restrição para as endonucleases *NdeI* e *XhoI*. Linha 1, marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen); linha 2, controle negativo; linhas 3 e 4, DNA amplificado do gene *p28* da amostra Jaboticabal *E. canis*. A seta vermelha mostra a banda de 856 pb, correspondente à amplificação do gene *p28* de *E. canis* acrescido de sítios de restrição para *NdeI* e *XhoI*.

#### 5.4 Seqüenciamento de DNA e análise das seqüências

O seqüenciamento bidirecional de nucleotídeos do DNA plasmidial pET28a\_*p28* resultou em uma seqüência consenso de 843 bases, depositado no GenBank sob o número de acesso EF014897.

A seqüência de nucleotídeos foi analisada pelo programa computacional BLASTN (seqüência de nucleotídeos) e BLASTX (seqüência de aminoácidos), localizando e avaliando seqüências similares em bancos de dados internacionais. A análise das seqüências de nucleotídeos mostrou um alto grau de identidade entre a seqüência *p28*, amostra Jaboticabal de *E. canis*, e as seqüências do gene *p28* das amostras São Paulo (98%) e Jake (98%), e o gene *p30* da amostra Oklahoma de *E. canis* (98%). Comparando as seqüências nucleotídicas da amostra Jaboticabal e da amostra Jake, o gene *p28* difere apenas em 14 bases (Fig. 8). Uma importante identidade (82%) também foi observada com o gene *p28* das amostras Florida, Oklahoma, Luisiana e as amostras oriundas da Carolina do Norte (amostras Fuzzi, DJ e Demon).

A seqüência de 281 aminoácidos mostrou uma identidade acima de 98% com a seqüência de aminoácidos da amostra São Paulo e de 97% com a proteína P28 da amostra Jake de *E. canis*. É importante ressaltar que a identidade entre as seqüências de aminoácidos da proteína P28 da amostra Jaboticabal e a seqüência da proteína P30 de *E. canis* foi de 96%, mostrando a alta similaridade entre essas duas proteínas. A proteína P28 das amostras Oklahoma, Florida, Luisiana e aquelas da Carolina do Norte apresentaram-se divergentes em aproximadamente 22% dos aminoácidos (Fig. 9).

Da mesma forma, foram alinhadas as seqüências de aminoácidos da proteína P28 da amostra Jaboticabal de *E. canis* e de uma amostra de *E. chaffeensis*, considerando-se a similaridade entre as duas espécies. Neste estudo, a identidade encontrada entre as seqüências de aminoácidos das proteínas P28 foi de 78% (Fig. 10).

A análise da frequência de códons do gene *p28* mostrou uma divergência de 34,68% em relação aos códons utilizados pela *E. coli*. Esses códons divergentes não estão dispostos em regiões iniciadoras ou terminadoras do gene.

1  
60

1. Jaboticabal atgaattgcaaaaaaattcttataacaactgcattaatgtcattaatgtactatgctcca  
2. São Paulo -----  
3. Jake atgaattgcaaaaaaattcttataacaactgcattaatgtcattaatgtactatgctcca  
4. Oklahoma p28 atgaattgcaaaaaaattcttataacaactgcattaatgtcattaatgtactatgctcca  
5. Florida atgaattgcaaaaaaattcttataacaactgcattaatgtcattaatgtactatgctcca  
6. Fuzzi atgaattgcaaaaaaattcttataacaactgcattaatgtcattaatgtactatgctcca  
7. DJ atgaattgcaaaaaaattcttataacaactgcattaatgtcattaatgtactatgctcca  
8. Demon atgaattgcaaaaaaattcttataacaactgcattaatgtcattaatgtactatgctcca  
9. Luisiana atgaattgcaaaaaaattcttataacaactgcattaatgtcattaatgtactatgctcca  
10. Oklahoma p30 atgaattgcaaaaaaattcttataacaactgcattaatgtcattaatgtactatgctcca

1. Jaboticabal agcatatcttttctgatactatacaaga**cgataaca**c---tggtagcttctacatcagt  
2. São Paulo -----  
3. Jake agcatatcttttctgatactatacaaga**cgataaca**c---tggtagcttctacatcagt  
4. Oklahoma p28 agcatatcttttctgatactatacaaga**cgataaca**c---tggtagcttctacatcagt  
5. Florida agcatatcttttctgatactatacaaga**tggt**aaca**tg**gggtgga**act**tctat**att**agt  
6. Fuzzi agcatatcttttctgatactatacaaga**tggt**aaca**tg**gggtgga**act**tctat**att**agt  
7. DJ agcatatcttttctgatactatacaaga**tggt**aaca**tg**gggtgga**act**tctat**att**agt  
8. Demon agcatatcttttctgatactatacaaga**tggt**aaca**tg**gggtgga**act**tctat**att**agt  
9. Luisiana agcatatcttttctgatactatacaaga**tggt**aaca**tg**gggtgga**act**tctat**att**agt  
10. Oklahoma p30 agcatatcttttctgatactatacaaga**cgataaca**c---tggtagcttctacatcagt

1. Jaboticabal ggaaaatagtaccaagtgt**tt**cacat**ttt**ggt**gtt**ttctcagctaaagaagaaag**caac**  
2. São Paulo -----  
3. Jake ggaaaatagtaccaagtgt**tt**cacat**ttt**ggt**gtt**ttctcagctaaagaagaaag**aaac**  
4. Oklahoma p28 ggaaaatagtaccaagtgt**tt**cacat**ttt**ggt**gtt**ttctcagctaaagaagaaag**aaac**  
5. Florida ggaaa**g**tatgtaccaagtgt**ct**cacat**ttt**ggt**agct**ttctcagctaaagaagaaag**caaa**  
6. Fuzzi ggaaa**g**tatgtaccaagtgt**ct**cacat**ttt**ggt**agct**ttctcagctaaagaagaaag**caaa**  
7. DJ ggaaa**g**tatgtaccaagtgt**ct**cacat**ttt**ggt**agct**ttctcagctaaagaagaaag**caaa**  
8. Demon ggaaa**g**tatgtaccaagtgt**ct**cacat**ttt**ggt**agct**ttctcagctaaagaagaaag**caaa**  
9. Luisiana ggaaa**g**tatgtaccaagtgt**ct**cacat**ttt**ggt**agct**ttctcagctaaagaagaaag**caaa**  
10. Oklahoma p30 ggaaaatagtaccaagtgt**tt**cacat**ttt**ggt**gtt**ttctcagctaaagaagaaag**aaac**

1. Jaboticabal ccaactggtggagtttttggattaaaacatgattgggatggag**gta**caaat**at**ctaact**ct**  
2. São Paulo -----  
3. Jake tcaactggtggagtttttggattaaaacatgattgggatggag**gta**caaat**at**ctaact**ct**  
4. Oklahoma p28 tcaactggtggagtttttggattaaaacatgattgggatggag**gta**caaat**at**ctaact**ct**  
5. Florida tcaactggtggagtttttggattaaaacatgattgggatggag**gta**caaat**act**taa---**g**  
6. Fuzzi tcaactggtggagtttttggattaaaacatgattgggatggag**gta**caaat**act**taa---**g**  
7. DJ tcaactggtggagtttttggattaaaacatgattgggatggag**gta**caaat**act**taa---**g**  
8. Demon tcaactggtggagtttttggattaaaacatgattgggatggag**gta**caaat**act**taa---**g**  
9. Luisiana tcaactggtggagtttttggattaaaacatgattgggatggag**gta**caaat**act**taa---**g**  
10. Oklahoma p30 tcaactggtggagtttttggattaaaacatgattgggatggag**gta**caaat**at**ctaact**ct**

1. Jaboticabal **actcc**gaaaaatatt**ca**cagtt**ca**aaattattcgtt**ta**aatacgaa**agca**accatt**c**  
2. São Paulo -----  
3. Jake **tctcc**gaaaaatatt**ca**cagtt**ca**aaattattcgtt**ta**aatacgaa**aa**caaccatt**c**  
4. Oklahoma p28 **tctcc**gaaaaatatt**ca**cagtt**ca**aaattattcgtt**ta**aatacgaa**aa**caaccatt**c**  
5. Florida **aa**taaac**acgctgact**tt**act**gtt**cc**aaactattcgtt**ca**gatac**gaga**caaatccatt**t**  
6. Fuzzi **aa**taaac**acgctgact**tt**act**gtt**cc**aaactattcgtt**ca**gatac**gaga**caaatccatt**t**  
7. DJ **aa**taaac**acgctgact**tt**act**gtt**cc**aaactattcgtt**ca**gatac**gaga**caaatccatt**t**  
8. Demon **aa**taaac**acgctgact**tt**act**gtt**cc**aaactattcgtt**ca**gatac**gaga**caaatccatt**t**  
9. Luisiana **aa**taaac**acgctgact**tt**act**gtt**cc**aaactattcgtt**ca**gatac**gaga**caaatccatt**t**  
10. Oklahoma p30 **tctcc**gaaaaatatt**ca**cagtt**ca**aaattattcgtt**ta**aatacgaa**aa**caaccatt**c**

1. Jaboticabal **tt**agggtttgcaggagctatt**tg**gttat**tt**caatgggtggcccaagaataga**actt**gaag**tt**  
2. São Paulo -----aatgggtggcccaagaataga**actt**gaag**tt**

3. Jake ttagggtttgcaggagctattgggttatccaatgggtggcccaagaatagaacttgaagtt  
 4. Oklahoma p28 ttagggtttgcaggagctattgggttatccaatgggtggcccaagaatagaacttgaagtt  
 5. Florida ctagggtttgcaggagctatcgggttactcaatgggtggcccaagaatagaattcgaaata  
 6. Fuzzi ctagggtttgcaggagctatcgggttactcaatgggtggcccaagaatagaattcgaaata  
 7. DJ ctagggtttgcaggagctatcgggttactcaatgggtggcccaagaatagaattcgaaata  
 8. Demon ctagggtttgcaggagctatcgggttactcaatgggtggcccaagaatagaattcgaaata  
 9. Luisiana ctagggtttgcaggagctatcgggttactcaatgggtggcccaagaatagaattcgaaata  
 10. Oklahoma p30 ttagggtttgcaggagctattgggttatccaatgggtggcccaagaatagaacttgaagtt

1. Jaboticabal ctgtacgagacatttcgatgtgaaaaatcagaacaataattataagAACGGCGCACACAGA  
 2. São Paulo ctgtacgagacatttcgatgtgaaaaatcagaacaataattataagAACGGCGCACACAGA  
 3. Jake ctgtacgagacatttcgatgtgaaaaatcagaacaataattataagAACGGCGCACACAGA  
 4. Oklahoma p28 ctgtacgagacatttcgatgtgaaaaatcagaacaataattataagAACGGCGCACACAGA  
 5. Florida tcttatgaagcatttcgacgtaaaaagtccataatcaattatcaaaatgacgCGCACAGG  
 6. Fuzzi tcttatgaagcatttcgacgtaaaaagtccataatcaattatcaaaatgacgCGCACAGG  
 7. DJ tcttatgaagcatttcgacgtaaaaagtccataatcaattatcaaaatgacgCGCACAGG  
 8. Demon tcttatgaagcatttcgacgtaaaaagtccataatcaattatcaaaatgacgCGCACAGG  
 9. Luisiana tcttatgaagcatttcgacgtaaaaagtccataatcaattatcaaaatgacgCGCACAGG  
 10. Oklahoma p30 ctgtacgagacatttcgatgtgaaaaatcagaacaataattataagAACGGCGCACACAGA

1. Jaboticabal tactgtgctttatctcatcatagttcagcaacaagcatgtcaagtgaagtaacaaat  
 2. São Paulo tactgtgctttatctcatcatagttcagcaacaagcatgtcctccgcaagtgaacaaat  
 3. Jake tactgtgctttatctcatcatagttcagcaacaacatgtcctccgcaagtgaacaaat  
 4. Oklahoma p28 tactgtgctttatctcatcatagttcagcaacaacatgtcctccgcaagtgaacaaat  
 5. Florida tactgCGctctatctcatcacacatCGGcag-----ccatggaagctgataaaat  
 6. Fuzzi tactgCGctctatctcatcacacatCGGcag-----ccatggaagctgataaaat  
 7. DJ tactgCGctctatctcatcacacatCGGcag-----ccatggaagctgataaaat  
 8. Demon tactgCGctctatctcatcacacatCGGcag-----ccatggaagctgataaaat  
 9. Luisiana tactgCGctctatctcatcacacatCGGcag-----ccatggaagctgataaaat  
 10. Oklahoma p30 tactgtgctttatctcatcatagttcagcaacaacatgtcctccgcaagtgaacaaat

1. Jaboticabal gttttcttaaaaaatgaagggttaattgacttatcatttatgataaatgcatgctatgac  
 2. São Paulo gttttcttaaaaaatgaagggttaattgacttatcatttatgataaatgcatgctatgac  
 3. Jake gttttcttaaaaaatgaagggttaattgacttatcatttatgataaatgcatgctatgac  
 4. Oklahoma p28 gttttcttaaaaaatgaagggttaattgacttatcatttatgataaatgcatgctatgac  
 5. Florida gtcttcttaaaaaacgaagggttaattgacatatcattgcaataaatgcatgctatgac  
 6. Fuzzi gtcttcttaaaaaacgaagggttaattgacatatcattgcaataaatgcatgctatgac  
 7. DJ gtcttcttaaaaaacgaagggttaattgacatatcattgcaataaatgcatgctatgac  
 8. Demon gtcttcttaaaaaacgaagggttaattgacatatcattgcaataaatgcatgctatgac  
 9. Luisiana gtcttcttaaaaaacgaagggttaattgacatatcattgcaataaatgcatgctatgac  
 10. Oklahoma p30 gttttcttaaaaaatgaagggttaattgacttatcatttatgataaatgcatgctatgac

1. Jaboticabal ataataattgaaggatgcctttttcaccttatatttggcaggtgttggtactgatgtt  
 2. São Paulo ataataattgaaggatgcctttttcaccttatatttggcaggtgttggtactgatgtt  
 3. Jake ataataattgaaggatgcctttttcaccttatatttggcaggtgttggtactgatgtt  
 4. Oklahoma p28 ataataattgaaggatgcctttttcaccttatatttggcaggtgttggtactgatgtt  
 5. Florida ataataatgacaaagtacctgtttctccttatatatgCGcaggtattggtactgattg  
 6. Fuzzi ataataatgacaaagtacctgtttctccttatatatgCGcaggtattggtactgattg  
 7. DJ ataataatgacaaagtacctgtttctccttatatatgCGcaggtattggtactgattg  
 8. Demon ataataatgacaaagtacctgtttctccttatatatgCGcaggtattggtactgattg  
 9. Luisiana ataataatgacaaagtacctgtttctccttatatatgCGcaggtattggtactgattg  
 10. Oklahoma p30 ataataattgaaggatgcctttttcaccttatatttggcaggtgttggtactgatgtt

1. Jaboticabal	<b>g</b> tttccatgtttgaagctataaatcctaaaatttcttaccaggaaaactaggattaggt
2. São Paulo	<b>g</b> tttccatgtttgaagctataaatcctaaaatttcttaccaggaaaactaggattaggt
3. Jake	<b>g</b> tttccatgtttgaagctataaatcctaaaatttcttaccaggaaaactaggattaggt
4. Oklahoma p28	<b>g</b> tttccatgtttgaagctataaatcctaaaatttcttaccaggaaaactaggattaggt
5. Florida	<b>a</b> tttctatgtttgaagctacaagtcctaaaatttcttaccaggaaaactggcattaggt
6. Fuzzi	<b>a</b> tttctatgtttgaagctacaagtcctaaaatttcttaccaggaaaactggcattaggt
7. DJ	<b>a</b> tttctatgtttgaagctacaagtcctaaaatttcttaccaggaaaactggcattaggt
8. Demon	<b>a</b> tttctatgtttgaagctacaagtcctaaaatttcttaccaggaaaactggcattaggt
9. Luisiana	<b>a</b> tttctatgtttgaagctacaagtcctaaaatttcttaccaggaaaactggcattaggt
10. Oklahoma p30	<b>g</b> tttccatgtttgaagctataaatcctaaaatttcttaccaggaaaactaggattaggt
1. Jaboticabal	t <b>a</b> tagtata <b>a</b> g <b>t</b> t <b>c</b> aga <b>a</b> g <b>c</b> ctctg <b>t</b> tt <b>t</b> tatcggt <b>g</b> g <b>a</b> c <b>a</b> ct <b>t</b> t <b>c</b> acag <b>a</b> g <b>t</b> cataggt
2. São Paulo	t <b>a</b> tagtata <b>a</b> g <b>t</b> t <b>c</b> aga <b>a</b> g <b>c</b> ctctg <b>t</b> tt <b>t</b> tatcggt <b>g</b> g <b>a</b> c <b>a</b> ct <b>t</b> t <b>c</b> acag <b>a</b> g <b>t</b> cataggt
3. Jake	t <b>a</b> tagtata <b>a</b> g <b>t</b> t <b>c</b> aga <b>a</b> g <b>c</b> ctctg <b>t</b> tt <b>t</b> tatcggt <b>g</b> g <b>a</b> c <b>a</b> ct <b>t</b> t <b>c</b> acag <b>a</b> g <b>t</b> cataggt
4. Oklahoma p28	t <b>a</b> tagtata <b>a</b> g <b>t</b> t <b>c</b> aga <b>a</b> g <b>c</b> ctctg <b>t</b> tt <b>t</b> tatcggt <b>g</b> g <b>a</b> c <b>a</b> ct <b>t</b> t <b>c</b> acag <b>a</b> g <b>t</b> cataggt
5. Florida	t <b>a</b> ct <b>c</b> tat <b>t</b> a <b>a</b> t <b>c</b> cg <b>g</b> aa <b>a</b> cctctg <b>t</b> tt <b>t</b> catcggt <b>g</b> g <b>g</b> c <b>a</b> tt <b>t</b> c <b>c</b> acag <b>g</b> a <b>t</b> cataggt
6. Fuzzi	t <b>a</b> ct <b>c</b> tat <b>t</b> a <b>a</b> t <b>c</b> cg <b>g</b> aa <b>a</b> cctctg <b>t</b> tt <b>t</b> catcggt <b>g</b> g <b>g</b> c <b>a</b> tt <b>t</b> c <b>c</b> acag <b>g</b> a <b>t</b> cataggt
7. DJ	t <b>a</b> ct <b>c</b> tat <b>t</b> a <b>a</b> t <b>c</b> cg <b>g</b> aa <b>a</b> cctctg <b>t</b> tt <b>t</b> catcggt <b>g</b> g <b>g</b> c <b>a</b> tt <b>t</b> c <b>c</b> acag <b>g</b> a <b>t</b> cataggt
8. Demon	t <b>a</b> ct <b>c</b> tat <b>t</b> a <b>a</b> t <b>c</b> cg <b>g</b> aa <b>a</b> cctctg <b>t</b> tt <b>t</b> catcggt <b>g</b> g <b>g</b> c <b>a</b> tt <b>t</b> c <b>c</b> acag <b>g</b> a <b>t</b> cataggt
9. Luisiana	t <b>a</b> ct <b>c</b> tat <b>t</b> a <b>a</b> t <b>c</b> cg <b>g</b> aa <b>a</b> cctctg <b>t</b> tt <b>t</b> catcggt <b>g</b> g <b>g</b> c <b>a</b> tt <b>t</b> c <b>c</b> acag <b>g</b> a <b>t</b> cataggt
10. Oklahoma p30	t <b>a</b> tagtata <b>a</b> g <b>t</b> t <b>c</b> aga <b>a</b> g <b>c</b> ctctg <b>t</b> tt <b>t</b> tatcggt <b>g</b> g <b>a</b> c <b>a</b> ct <b>t</b> t <b>c</b> acag <b>a</b> g <b>t</b> cataggt
1. Jaboticabal	aatga <b>a</b> tttagagacat <b>c</b> ctg <b>c</b> tat <b>g</b> g <b>t</b> cctag <b>t</b> g <b>a</b> at <b>c</b> aag <b>t</b> c <b>t</b> t <b>c</b> ca <b>---</b> aa <b>aa</b> ac
2. São Paulo	aatga <b>a</b> tttagagacat <b>c</b> ctg <b>c</b> tat <b>g</b> g <b>t</b> cctag <b>t</b> g <b>g</b> at <b>c</b> aa <b>a</b> t <b>c</b> t <b>t</b> ca <b>---</b> g <b>aa</b> ac
3. Jake	aatga <b>a</b> tttagagacat <b>c</b> ctg <b>c</b> tat <b>g</b> g <b>t</b> cctag <b>t</b> g <b>g</b> at <b>c</b> aa <b>a</b> t <b>c</b> t <b>t</b> ca <b>---</b> g <b>aa</b> ac
4. Oklahoma p28	aatga <b>a</b> tttagagacat <b>c</b> ctg <b>c</b> tat <b>g</b> g <b>t</b> cctag <b>t</b> g <b>g</b> at <b>c</b> aa <b>a</b> t <b>c</b> t <b>t</b> ca <b>---</b> g <b>aa</b> ac
5. Florida	aatga <b>g</b> tttagagat <b>a</b> t <b>t</b> cctg <b>c</b> a <b>a</b> t <b>a</b> g <b>t</b> a <b>c</b> c <b>t</b> ag <b>t</b> a <b>a</b> c <b>t</b> ca <b>a</b> c <b>t</b> a <b>c</b> a <b>a</b> t <b>a</b> ag <b>t</b> g <b>g</b> ac <b>ca</b>
6. Fuzzi	aatga <b>g</b> tttagagat <b>a</b> t <b>t</b> cctg <b>c</b> a <b>a</b> t <b>a</b> g <b>t</b> a <b>c</b> c <b>t</b> ag <b>t</b> a <b>a</b> c <b>t</b> ca <b>a</b> c <b>t</b> a <b>c</b> a <b>a</b> t <b>a</b> ag <b>t</b> g <b>g</b> ac <b>ca</b>
7. DJ	aatga <b>g</b> tttagagat <b>a</b> t <b>t</b> cctg <b>c</b> a <b>a</b> t <b>a</b> g <b>t</b> a <b>c</b> c <b>t</b> ag <b>t</b> a <b>a</b> c <b>t</b> ca <b>a</b> c <b>t</b> a <b>c</b> a <b>a</b> t <b>a</b> ag <b>t</b> g <b>g</b> ac <b>ca</b>
8. Demon	aatga <b>g</b> tttagagat <b>a</b> t <b>t</b> cctg <b>c</b> a <b>a</b> t <b>a</b> g <b>t</b> a <b>c</b> c <b>t</b> ag <b>t</b> a <b>a</b> c <b>t</b> ca <b>a</b> c <b>t</b> a <b>c</b> a <b>a</b> t <b>a</b> ag <b>t</b> g <b>g</b> ac <b>ca</b>
9. Luisiana	aatga <b>g</b> tttagagat <b>a</b> t <b>t</b> cctg <b>c</b> a <b>a</b> t <b>a</b> g <b>t</b> a <b>c</b> c <b>t</b> ag <b>t</b> a <b>a</b> c <b>t</b> ca <b>a</b> c <b>t</b> a <b>c</b> a <b>a</b> t <b>a</b> ag <b>t</b> g <b>g</b> ac <b>ca</b>
10. Oklahoma p30	aatga <b>a</b> tttagagacat <b>c</b> ctg <b>c</b> tat <b>g</b> g <b>t</b> cctag <b>t</b> g <b>g</b> at <b>c</b> aa <b>a</b> t <b>c</b> t <b>t</b> ca <b>---</b> g <b>aa</b> ac
1. Jaboticabal	caatttg <b>ca</b> a <b>t</b> ag <b>t</b> aac <b>a</b> ctaa <b>a</b> t <b>g</b> t <b>g</b> t <b>c</b> act <b>t</b> g <b>g</b> tt <b>t</b> ag <b>a</b> act <b>g</b> g <b>g</b> ag <b>a</b> g <b>a</b> tt <b>t</b>
2. São Paulo	caatttg <b>ca</b> a <b>t</b> ag <b>t</b> aac <b>a</b> ctaa <b>a</b> t <b>g</b> t <b>g</b> t <b>c</b> act <b>t</b> -----
3. Jake	caatttg <b>ca</b> a <b>t</b> ag <b>t</b> aac <b>a</b> ctaa <b>a</b> t <b>g</b> t <b>g</b> t <b>c</b> act <b>t</b> g <b>g</b> tt <b>t</b> ag <b>a</b> act <b>g</b> g <b>g</b> ag <b>a</b> g <b>a</b> tt <b>t</b>
4. Oklahoma p28	caatttg <b>ca</b> a <b>t</b> ag <b>t</b> aac <b>a</b> ctaa <b>a</b> t <b>g</b> t <b>g</b> t <b>c</b> act <b>t</b> g <b>g</b> tt <b>t</b> ag <b>a</b> act <b>g</b> g <b>g</b> ag <b>a</b> g <b>a</b> tt <b>t</b>
5. Florida	caatttg <b>ca</b> a <b>c</b> ag <b>t</b> aac <b>a</b> ctaa <b>a</b> t <b>g</b> t <b>g</b> t <b>c</b> act <b>t</b> g <b>g</b> tt <b>t</b> ag <b>a</b> act <b>g</b> g <b>g</b> ag <b>a</b> g <b>a</b> tt <b>t</b>
6. Fuzzi	caatttg <b>ca</b> a <b>c</b> ag <b>t</b> aac <b>a</b> ctaa <b>a</b> t <b>g</b> t <b>g</b> t <b>c</b> act <b>t</b> g <b>g</b> tt <b>t</b> ag <b>a</b> act <b>g</b> g <b>g</b> ag <b>a</b> g <b>a</b> tt <b>t</b>
7. DJ	caatttg <b>ca</b> a <b>c</b> ag <b>t</b> aac <b>a</b> ctaa <b>a</b> t <b>g</b> t <b>g</b> t <b>c</b> act <b>t</b> g <b>g</b> tt <b>t</b> ag <b>a</b> act <b>g</b> g <b>g</b> ag <b>a</b> g <b>a</b> tt <b>t</b>
8. Demon	caatttg <b>ca</b> a <b>c</b> ag <b>t</b> aac <b>a</b> ctaa <b>a</b> t <b>g</b> t <b>g</b> t <b>c</b> act <b>t</b> g <b>g</b> tt <b>t</b> ag <b>a</b> act <b>g</b> g <b>g</b> ag <b>a</b> g <b>a</b> tt <b>t</b>
9. Luisiana	caatttg <b>ca</b> a <b>c</b> ag <b>t</b> aac <b>a</b> ctaa <b>a</b> t <b>g</b> t <b>g</b> t <b>c</b> act <b>t</b> g <b>g</b> tt <b>t</b> ag <b>a</b> act <b>g</b> g <b>g</b> ag <b>a</b> g <b>a</b> tt <b>t</b>
10. Oklahoma p30	caatttg <b>ca</b> a <b>t</b> ag <b>t</b> aac <b>a</b> ctaa <b>a</b> t <b>g</b> t <b>g</b> t <b>c</b> act <b>t</b> g <b>g</b> tt <b>t</b> ag <b>a</b> act <b>g</b> g <b>g</b> ag <b>a</b> g <b>a</b> tt <b>t</b>

Figura 8. Alinhamento das seqüências nucleotídicas de diferentes amostras de *Ehrlichia canis*. As seqüências foram extraídas do GenBank e alinhadas pelo programa computacional MAFFT. Correspondem aos genes: 1. *p28* Jaboticabal (EF014897); 2. *p28* São Paulo (DQ460713); 3. *p28* Jake (AF082744); 4. *p28* Oklahoma (AF082746.1); 5. *p28* Florida (AF082750.1); 6. *p28* Fuzzi (AF082749.1); 7. *p28* DJ (AF082748.1); 8. *p28* Demon (AF082747.1); 9. *p28* Luisiana (AF082745.1); 10. *p30* Oklahoma (AF082746.1). As bases nucleotídicas discordantes estão anotadas em negrito.

	1	60
1. Jaboticabal	MNCKKILITTALMSLMY <b>Y</b> APSI SFSDTIQDDNT-GSFYISGKYVPSVSHFGV <b>F</b> SAKEES <b>N</b>	
2. São Paulo	M-----	
3. Jake	M-CKKILITTALMSLMY <b>Y</b> APSI SFSDTIQDDNT-GSFYISGKYVPSVSHFGV <b>F</b> SAKEE <b>R</b> N	
4. Oklahoma p28	MNCKKILITTALISLMY <b>S</b> IPSI SFSDTIQD <b>G</b> NMGGNFYISGKYVPSVSHFG <b>S</b> FSAKEES <b>K</b>	
5. Florida	MNCKKILITTALISLMY <b>S</b> IPSI SFSDTIQD <b>G</b> NMGGNFYISGKYVPSVSHFG <b>S</b> FSAKEES <b>K</b>	
6. Fuzzi	MNCKKILITTALISLMY <b>S</b> IPSI SFSDTIQD <b>G</b> NMGGNFYISGKYVPSVSHFG <b>S</b> FSAKEES <b>K</b>	
7. DJ	MNCKKILITTALISLMY <b>S</b> IPSI SFSDTIQD <b>G</b> NMGGNFYISGKYVPSVSHFG <b>S</b> FSAKEES <b>K</b>	
8. Demon	MNCKKILITTALISLMY <b>S</b> IPSI SFSDTIQD <b>G</b> NMGGNFYISGKYVPSVSHFG <b>S</b> FSAKEES <b>K</b>	
9. Louisiana	MNCKKILITTALISLMY <b>S</b> IPSI SFSDTIQD <b>G</b> NMGGNFYISGKYVPSVSHFG <b>S</b> FSAKEES <b>K</b>	
10. Oklahoma p30	MNCKKILITTALMSLMY <b>Y</b> APSI SFSDTIQDDNT-GSFYISGKYVPSVSHFGV <b>F</b> SAKEE <b>R</b> N	
1. Jaboticabal	<b>P</b> TVGVFGLKHDW <b>D</b> GGT <b>I</b> SN <b>S</b> TPENIFTVQNY <b>S</b> FK <b>Y</b> ESNPFLGFAGAI <b>G</b> YSMGGP <b>R</b> IE <b>L</b> EV	
2. São Paulo	-----GGP <b>R</b> IE <b>L</b> EV	
3. p28 Jake	<b>S</b> TVGVFGLKHDW <b>N</b> GGT <b>I</b> SN <b>S</b> SPENIFTVQNY <b>S</b> FK <b>Y</b> ENNPFLGFAGAI <b>G</b> YSMGGP <b>R</b> IE <b>L</b> EV	
4. Oklahoma p28	<b>S</b> TVGVFGLKHDW <b>D</b> GG <b>S</b> P <b>I</b> L <b>K</b> N <b>K</b> HAD-FTVPNY <b>S</b> FR <b>Y</b> ENNPFLGFAGAI <b>G</b> YSMGGP <b>R</b> IE <b>F</b> E <b>I</b>	
5. Florida	<b>S</b> TVGVFGLKHDW <b>D</b> GG <b>S</b> P <b>I</b> L <b>K</b> N <b>K</b> HAD-FTVPNY <b>S</b> FR <b>Y</b> ENNPFLGFAGAI <b>G</b> YSMGGP <b>R</b> IE <b>F</b> E <b>I</b>	
6. Fuzzi	<b>S</b> TVGVFGLKHDW <b>D</b> GG <b>S</b> P <b>I</b> L <b>K</b> N <b>K</b> HAD-FTVPNY <b>S</b> FR <b>Y</b> ENNPFLGFAGAI <b>G</b> YSMGGP <b>R</b> IE <b>F</b> E <b>I</b>	
7. DJ	<b>S</b> TVGVFGLKHDW <b>D</b> GG <b>S</b> P <b>I</b> L <b>K</b> N <b>K</b> HAD-FTVPNY <b>S</b> FR <b>Y</b> ENNPFLGFAGAI <b>G</b> YSMGGP <b>R</b> IE <b>F</b> E <b>I</b>	
8. Demon	<b>S</b> TVGVFGLKHDW <b>D</b> GG <b>S</b> P <b>I</b> L <b>K</b> N <b>K</b> HAD-FTVPNY <b>S</b> FR <b>Y</b> ENNPFLGFAGAI <b>G</b> YSMGGP <b>R</b> IE <b>F</b> E <b>I</b>	
9. Louisiana	<b>S</b> TVGVFGLKHDW <b>D</b> GG <b>S</b> P <b>I</b> L <b>K</b> N <b>K</b> HAD-FTVPNY <b>S</b> FR <b>Y</b> ENNPFLGFAGAI <b>G</b> YSMGGP <b>R</b> IE <b>F</b> E <b>I</b>	
10. Oklahoma p30	<b>S</b> TVGVFGLKHDW <b>N</b> GGT <b>I</b> SN <b>S</b> SPENIFTVQNY <b>S</b> FK <b>Y</b> ENNPFLGFAGAI <b>G</b> YSMGGP <b>R</b> IE <b>L</b> EV	
1. Jaboticabal	<b>L</b> Y <b>E</b> TFDVK <b>N</b> Q <b>N</b> NY <b>K</b> NGA <b>H</b> RYCALSHH <b>S</b> SAT <b>S</b> M <b>S</b> SAS <b>N</b> KFVFLKNEGLID <b>L</b> S <b>F</b> M <b>I</b> NAC <b>Y</b> D	
2. São Paulo	<b>L</b> Y <b>E</b> TFDVK <b>N</b> Q <b>N</b> NY <b>K</b> NGA <b>H</b> RYCALSHH <b>S</b> SAT <b>S</b> M <b>S</b> SAS <b>D</b> KFVFLKNEGLID <b>L</b> S <b>F</b> M <b>I</b> NAC <b>Y</b> D	
3. Jake	<b>L</b> Y <b>E</b> TFDVK <b>N</b> Q <b>N</b> NY <b>K</b> NGA <b>H</b> RYCALSHH <b>S</b> SAT <b>S</b> M <b>S</b> SAS <b>N</b> KFVFLKNEGLID <b>L</b> S <b>F</b> M <b>I</b> NAC <b>Y</b> D	
4. Oklahoma p28	<b>S</b> Y <b>E</b> AFDV <b>K</b> SP <b>N</b> IN <b>Y</b> Q <b>N</b> DA <b>H</b> RYCALSHH <b>T</b> SA--- <b>A</b> MEADKFVFLKNEGLID <b>I</b> S <b>L</b> A <b>I</b> NAC <b>Y</b> D	
5. Florida	<b>S</b> Y <b>E</b> AFDV <b>K</b> SP <b>N</b> IN <b>Y</b> Q <b>N</b> DA <b>H</b> RYCALSHH <b>T</b> SA--- <b>A</b> MEADKFVFLKNEGLID <b>I</b> S <b>L</b> A <b>I</b> NAC <b>Y</b> D	
6. Fuzzi	<b>S</b> Y <b>E</b> AFDV <b>K</b> SP <b>N</b> IN <b>Y</b> Q <b>N</b> DA <b>H</b> RYCALSHH <b>T</b> SA--- <b>A</b> MEADKFVFLKNEGLID <b>I</b> S <b>L</b> A <b>I</b> NAC <b>Y</b> D	
7. DJ	<b>S</b> Y <b>E</b> AFDV <b>K</b> SP <b>N</b> IN <b>Y</b> Q <b>N</b> DA <b>H</b> RYCALSHH <b>T</b> SA--- <b>A</b> MEADKFVFLKNEGLID <b>I</b> S <b>L</b> A <b>I</b> NAC <b>Y</b> D	
8. Demon	<b>S</b> Y <b>E</b> AFDV <b>K</b> SP <b>N</b> IN <b>Y</b> Q <b>N</b> DA <b>H</b> RYCALSHH <b>T</b> SA--- <b>A</b> MEADKFVFLKNEGLID <b>I</b> S <b>L</b> A <b>I</b> NAC <b>Y</b> D	
9. Louisiana	<b>S</b> Y <b>E</b> AFDV <b>K</b> SP <b>N</b> IN <b>Y</b> Q <b>N</b> DA <b>H</b> RYCALSHH <b>T</b> SA--- <b>A</b> MEADKFVFLKNEGLID <b>I</b> S <b>L</b> A <b>I</b> NAC <b>Y</b> D	
10. Oklahoma p30	<b>L</b> Y <b>E</b> TFDVK <b>N</b> Q <b>N</b> NY <b>K</b> NGA <b>H</b> RYCALSHH <b>S</b> SAT <b>N</b> M <b>S</b> SAS <b>N</b> KFVFLKNEGLID <b>L</b> S <b>F</b> M <b>I</b> NAC <b>Y</b> D	
1. Jaboticabal	<b>I</b> I <b>I</b> EG <b>M</b> PFSPYICAGVGT <b>D</b> V <b>V</b> SMFEA <b>I</b> NP <b>K</b> ISYQ <b>G</b> KL <b>G</b> LGYS <b>I</b> SS <b>E</b> ASVFIGGHF <b>H</b> R <b>V</b> I <b>G</b>	
2. São Paulo	<b>I</b> I <b>I</b> EG <b>M</b> PFSPYICAGVGT <b>D</b> V <b>V</b> SMFEA <b>I</b> NP <b>K</b> ISYQ <b>G</b> KL <b>G</b> LGYS <b>I</b> SS <b>E</b> ASVFIGGHF <b>H</b> R <b>V</b> I <b>G</b>	
3. Jake	<b>I</b> I <b>I</b> EG <b>M</b> PFSPYICAGVGT <b>D</b> V <b>V</b> SMFEA <b>V</b> NP <b>K</b> ISYQ <b>G</b> KL <b>G</b> LGYS <b>I</b> SS <b>E</b> ASVFIGGHF <b>H</b> R <b>V</b> I <b>G</b>	
4. Oklahoma p28	<b>I</b> I <b>N</b> D <b>K</b> V <b>P</b> VSPYICAGIGT <b>D</b> L <b>I</b> SMFEA <b>T</b> SP <b>K</b> ISYQ <b>G</b> KL <b>G</b> I <b>S</b> YS <b>I</b> NP <b>E</b> TSVFIGGHF <b>H</b> R <b>I</b> I <b>G</b>	
5. Florida	<b>I</b> I <b>N</b> D <b>K</b> V <b>P</b> VSPYICAGIGT <b>D</b> L <b>I</b> SMFEA <b>T</b> SP <b>K</b> ISYQ <b>G</b> KL <b>G</b> I <b>S</b> YS <b>I</b> NP <b>E</b> TSVFIGGHF <b>H</b> R <b>I</b> I <b>G</b>	
6. Fuzzi	<b>I</b> I <b>N</b> D <b>K</b> V <b>P</b> VSPYICAGIGT <b>D</b> L <b>I</b> SMFEA <b>T</b> SP <b>K</b> ISYQ <b>G</b> KL <b>G</b> I <b>S</b> YS <b>I</b> NP <b>E</b> TSVFIGGHF <b>H</b> R <b>I</b> I <b>G</b>	
7. DJ	<b>I</b> I <b>N</b> D <b>K</b> V <b>P</b> VSPYICAGIGT <b>D</b> L <b>I</b> SMFEA <b>T</b> SP <b>K</b> ISYQ <b>G</b> KL <b>G</b> I <b>S</b> YS <b>I</b> NP <b>E</b> TSVFIGGHF <b>H</b> R <b>I</b> I <b>G</b>	
8. Demon	<b>I</b> I <b>N</b> D <b>K</b> V <b>P</b> VSPYICAGIGT <b>D</b> L <b>I</b> SMFEA <b>T</b> SP <b>K</b> ISYQ <b>G</b> KL <b>G</b> I <b>S</b> YS <b>I</b> NP <b>E</b> TSVFIGGHF <b>H</b> R <b>I</b> I <b>G</b>	
9. Louisiana	<b>I</b> I <b>N</b> D <b>K</b> V <b>P</b> VSPYICAGIGT <b>D</b> L <b>I</b> SMFEA <b>T</b> SP <b>K</b> ISYQ <b>G</b> KL <b>G</b> I <b>S</b> YS <b>I</b> NP <b>E</b> TSVFIGGHF <b>H</b> R <b>I</b> I <b>G</b>	
10. Oklahoma p30	<b>I</b> I <b>I</b> EG <b>M</b> PFSPYICAGVGT <b>D</b> V <b>V</b> SMFEA <b>I</b> NP <b>K</b> ISYQ <b>G</b> KL <b>G</b> LGYS <b>I</b> SS <b>E</b> ASVFIGGHF <b>H</b> R <b>V</b> I <b>G</b>	
1. Jaboticabal	NEFRDIPAMV <b>P</b> SE <b>S</b> - <b>S</b> LP <b>K</b> NQFA <b>I</b> VTLNVCHF <b>G</b> LE <b>L</b> GG <b>R</b> FN <b>F</b>	
2. São Paulo	NEFRDIPAMV <b>P</b> SG <b>S</b> - <b>N</b> LP <b>E</b> NQFA <b>I</b> VTLNVCH----- <b>F</b>	
3. p28 Jake	NEFRDIPAMV <b>P</b> SG <b>S</b> - <b>N</b> LP <b>E</b> NQFA <b>I</b> VTLNVCHF <b>G</b> LE <b>L</b> GG <b>R</b> FN <b>F</b>	
4. Oklahoma p28	NEFRDIPAI <b>V</b> PS <b>N</b> ST <b>T</b> IS <b>G</b> PQFA <b>T</b> VTLNVCHF <b>G</b> LE <b>L</b> GG <b>R</b> FN <b>F</b>	
5. Florida	NEFRDIPAI <b>V</b> PS <b>N</b> ST <b>T</b> IS <b>G</b> PQFA <b>T</b> VTLNVCHF <b>G</b> LE <b>L</b> GG <b>R</b> FN <b>F</b>	
6. Fuzzi	NEFRDIPAI <b>V</b> PS <b>N</b> ST <b>T</b> IS <b>G</b> PQFA <b>T</b> VTLNVCHF <b>G</b> LE <b>L</b> GG <b>R</b> FN <b>F</b>	
7. DJ	NEFRDIPAI <b>V</b> PS <b>N</b> ST <b>T</b> IS <b>G</b> PQFA <b>T</b> VTLNVCHF <b>G</b> LE <b>L</b> GG <b>R</b> FN <b>F</b>	
8. Demon	NEFRDIPAI <b>V</b> PS <b>N</b> ST <b>T</b> IS <b>G</b> PQFA <b>T</b> VTLNVCHF <b>G</b> LE <b>L</b> GG <b>R</b> FN <b>F</b>	
9. Louisiana	NEFRDIPAI <b>V</b> PS <b>N</b> ST <b>T</b> IS <b>G</b> PQFA <b>T</b> VTLNVCHF <b>G</b> LE <b>L</b> GG <b>R</b> FN <b>F</b>	
10. Oklahoma p30	NEFRDIPAMV <b>P</b> SG <b>S</b> - <b>N</b> LP <b>E</b> NQFA <b>I</b> VTLNVCHF <b>G</b> LE <b>L</b> GG <b>R</b> FN <b>F</b>	

Figura 9. Alinhamento das seqüências de aminoácidos de diferentes amostras de *Ehrlichia canis*. As seqüências foram extraídas do GenBank e alinhadas pelo programa computacional MAFFT. Correspondem, respectivamente, às proteínas: 1. P28 Jaboticabal (ABL74273.1), 2. P28 São Paulo (ABE98654.1); 3. P28 Jake (AAG14361.1); 4. P28 Oklahoma (AAC64552.1); 5. P28 Florida (AAC64556.1); 6. P28 Fuzzi (AAC64555.1); 7. P28 DJ (AAC64554.1); 8. P28 Demon (AAC64553.1); 9. P28 Louisiana (AAC64551.1); 10. P30 Oklahoma (AAK28699.1). Os aminoácidos discordantes estão anotados em negrito.

1 60

1. *E. canis* Jab MN**C**KK**I**L**I**T**T**A**L**M**S**L**M**Y**Y**A**P**S**I**S**F**S**D****T**I**Q**D**D**N**T**G**S**F**Y**I**S**G**K**Y**V**P**S**V**S**H**F**G**V**F**S**A**K**E**E**S**N**P

2. *E. chaffeens* M**N**Y**K**K**V**E**I**T**S**A**L**I**S**L**I**S**S**L**P**G**V**S**F**S**D****P**T**G**S**G**I**N**G**N**F**Y**I**S**G**K**Y**M**P**S**A**S**H**F**G**V**F**S**A**K**E**E**R**S**T

1. *E. canis* Jab T**V**G**V**F**G**L**K**H**D**W**D**G**G**T**I**S**N**S**T**P**E**N**I**F**T**V**Q**N**Y**S**F**K**Y**E**S**N**P**F**L**G**F**A**G**A**I**G**Y**S**M**G**G**P**R**I**E**L**E**V**L**

2. *E. chaffeens* T**A**G**V**F**G**L**K****Q**D**W**D**G**S**A**I**S**H**T**T**P**E**N**I**F**T**V****S**N**Y**S**F**K**Y**E**N**N**P**F**L**G**F**A**G**A**I**G**Y**S**M**D**G**P**R**I**E**L**E**V**S**

1. *E. canis* Jab Y**E**T**F**D**V**K**N****Q****N**N**Y**K**N**G**A**H**R**Y**C**A**L**S**H**H**S**S**A**T**S**M**S**S**A**S**N**K**F**V**L**K**N**E**G**L**I**D**L**S**F**M**I**N**A**C**Y**D**I**

2. *E. chaffeens* Y**E**T**F**D**V**K**N****Q****G**N**S**Y**K**N**E**A**H**R**Y**C**A**L**S**H**H**S**S****G**T**S**M**S**S**A****G**D**K**F**V**L**K**N**E**G**L**L**D**V**S**F**M**L**N**A**C**Y**D**V

1. *E. canis* Jab I**I**E**G**M**P**F**S**P**Y**I**C**A**G**V**G**T**D**V**V**S**M**F**E**A**I**N**P**K**I**S**Y**Q**G**K**L**G**L**G**Y**S**I**S**E**A**S**V**F**I**G**G**H**F**H**R**V**I**G**N

2. *E. chaffeens* I**S**E**G**I**P**F**S**P**Y**I**C**V**G**I**G**T**D**L**V**S**M**F**E**A**T**N**P**K**I**S**Y**Q**G**K**L**G**L**S**Y**S**I**S**P**E**T**S**V**F**I**G**G**H**F**H**K**V**I**G**N**

1. *E. canis* Jab E**F**R**D**I**P**A**M**V**P**S**E**S**S**L**P**K**N****Q**F**A**I**V**T**L**N**V**C**H**F**G**L**E**L**G**G**R**F**N**F

2. *E. chaffeens* E**F**R**D**I**P**A**V**I**P**S**G**S**S**L**T**G**N**H**P**A**I**V**T**L**D**V**C**H**F**G**I**E**L**G**G**R**F**A**F**

Figura 10. Alinhamento das seqüências de aminoácidos da amostra Jaboticabal de *Ehrlichia canis* e da amostra V4 de *E. chaffeensis*. A seqüência de *E. chaffeensis* foi extraída do GenBank, e o alinhamento foi feito pelo programa computacional MAFFT. Correspondem, respectivamente, às proteínas: 1. P28 da amostra Jaboticabal de *E. canis* (ABL74273.1); 2. P28 da amostra V4 de *E. chaffeensis* (AAL12920.1). Os aminoácidos discordantes estão anotados em negrito.

### 5.5 Subclonagem no vetor de expressão pET-28a

A digestão do vetor pET-28a com as enzimas *NdeI* e *XhoI* resultou na liberação de um pequeno fragmento de 80 pb, não visível no gel de agarose, e outro de, aproximadamente, 5289 pb. A digestão da construção pGEM\_28 resultou na formação de duas bandas, uma de aproximadamente 3015 pb, referente ao vetor, e uma outra banda de 856 pb correspondente ao gene *p28* (Fig. 11). A Figura 12 mostra a quantificação desse fragmento, obtida pela comparação de intensidade de bandas com o Padrão de Baixa Massa Molecular (61Low Mass Ladder -Invitrogen), que foi de, aproximadamente, 20ng/μl.

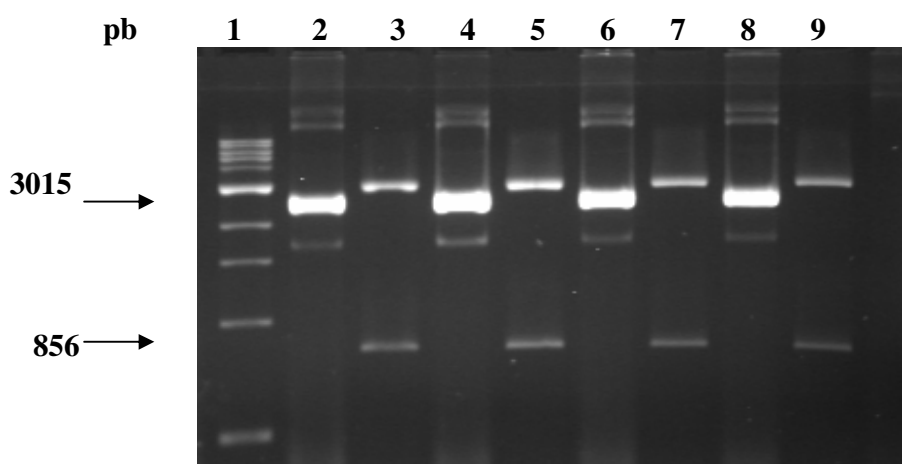


Figura 11. Amostras de DNA plasmidial da construção vetor pGEM\_p28 íntegras e digeridas com as endonucleases *NdeI* e *XhoI*. Linha 1, marcador de peso molecular 1kb (New England, BioLabs); linha 2, clone 1; linha 3, digestão do clone 1; linha 4, clone 2; linha 5, digestão do clone 2; linha 6, clone 3; linha 7, digestão do clone 3; linha 8, clone 4; linha 9, digestão do clone 4. As setas indicam os tamanhos dos fragmentos (3015 e 856 pb) obtidos após digestão enzimática.

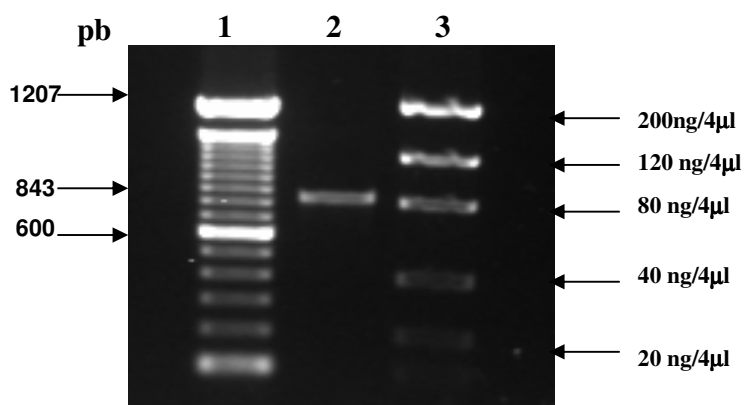


Figura 12. Quantificação da amostra de DNA do gene *p28* de *Ehrlichia canis* após digestão com as endonucleases *NdeI* e *XhoI* e purificação do gel de agarose com Kit GenClean II (QBiogene). Linha 1, marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen); linha 2, gene *p28* da *Ehrlichia canis*; linha 3, Padrão de Baixa Massa Molecular (Invitrogen). A quantificação se dá pela comparação da intensidade da banda da amostra com a intensidade do padrão.

### 5.6. Análise da expressão da proteína His6\_P28 em *E. coli*

Para a produção da proteína recombinante His6\_P28, células BL21(DE3) competentes foram transformadas com o plasmídeo pET28a\_p28 em correta orientação e induzidas com IPTG. A Figura 13 mostra a análise da expressão da proteína recombinante na BL21(DE3) pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS- PAGE). Os resultados revelaram a presença de uma banda polipeptídica diferenciada de, aproximadamente, 25 kDa, apenas nas canaletas 4, 7 e 10, onde ocorreu a resolução das frações protéicas da *E. coli* do controle positivo. O peso molecular estimado para o fragmento polipeptídico P28 é de 31 kDa acrescido do peso molecular das histidinas (4 kDa). A banda de 35 kDa que representa a expressão da proteína e *E. coli*, não foi visualizada.

Para a confirmação da ausência de expressão da proteína P28, as frações protéicas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e o Western Blotting foi realizado na tentativa de detectar a proteína recombinante pela ligação do anticorpo anti-His à cauda de polihistidina da proteína His6\_P28. Na Figura 14, pode-se observar a banda correspondente à reação do anticorpo contra a proteína expressa do controle positivo, bem como a ausência de reatividade às amostras protéicas da *E. coli* transformada com o plasmídeo pET28\_p28. .

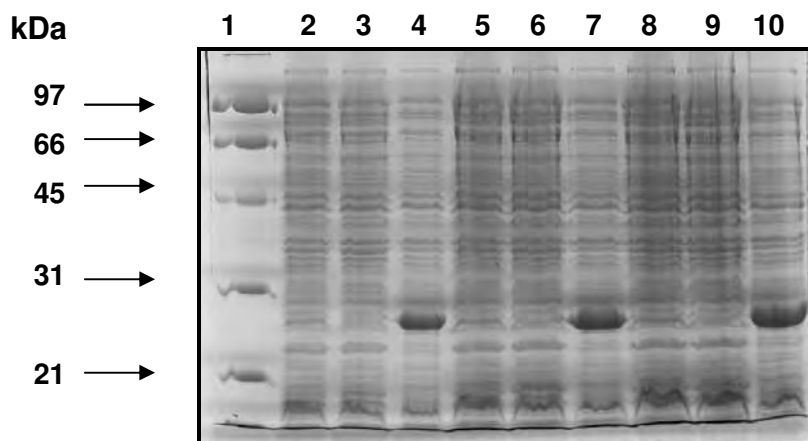


Figura 13. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) de amostras protéicas de culturas de *E. coli* BL21(DE3), transformadas com a construção plasmidial pET28a\_p28, induzidas com 0,8 mM de IPTG a 37°C. As amostras correspondem a: linha 1, marcador de peso molecular de proteínas Low Range (Bio-Rad); linhas 2, 5 e 8, amostras obtidas antes da indução; linhas 3, 6 e 9, amostras obtidas após 4 horas de indução protéica e linhas 4, 7 e 10, controle positivo da indução, aplicado no volume de 5, 10 e 15 µl/canaleta, respectivamente.

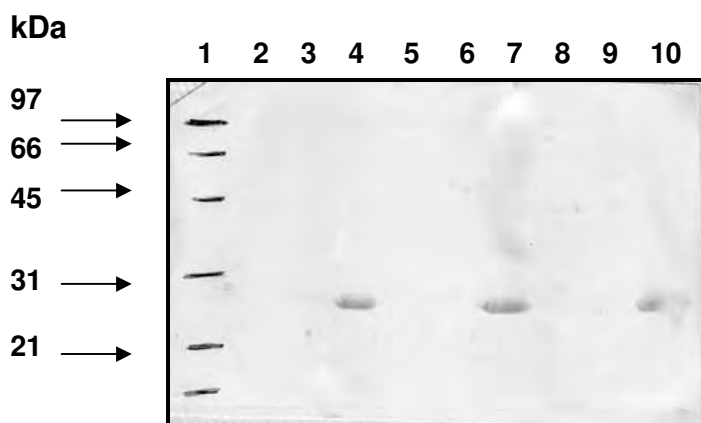


Figura 14. Visualização das bandas protéicas na membrana de nitrocelulose pelo Western-blotting de culturas de *E. coli* BL21(DE3), transformadas com a construção plasmidial pET28a\_p28, induzidas com 0,8mM de IPTG a 37°C. A membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo monoclonal anti-His. As amostras correspondem a: linha 1, marcador de peso molecular de proteínas Low Range (Bio-Rad); linhas 2, 5 e 8, amostras His6\_P28 obtidas antes da indução; linhas 3, 6 e 9, amostras His6\_P28 obtidas após 4 horas de indução protéica e linhas 4, 7 e 10, controle positivo de indução, aplicado no volume de 5, 10 e 15 µl/canaleta, respectivamente.

A ausência da produção da proteína recombinante P28 na *E. coli* BL21(DE3) motivou a indução da expressão gênica em novas estirpes da bactéria. Dessa forma, foram transformadas e induzidas as bactérias BL21(DE3)pLysS, BL21 Star(DE3)pLysS e BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. A análise da expressão protéica pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) está ilustrada na Figura 15. Assim como na análise da expressão pela bactéria BL21(DE3), não foi possível a diferenciação de uma banda de peso molecular aproximado ao da proteína P28, dentre as demais frações protéicas de *E. coli*, o que mostrou a ausência da expressão da proteína recombinante P28 de *E. canis*.

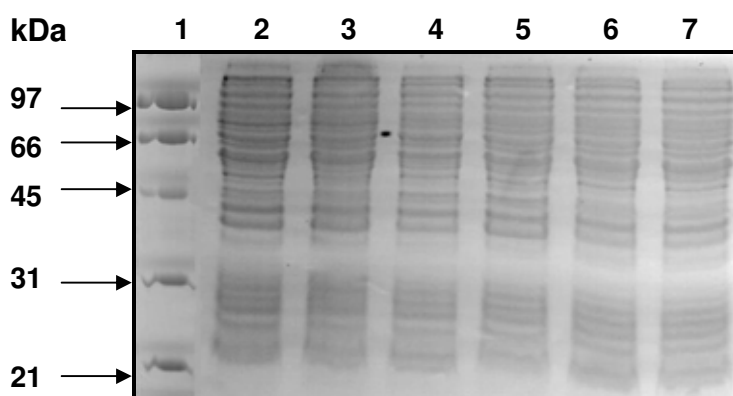


Figura 15. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) de amostras protéicas de culturas de *E. coli* BL21(DE3) pLYS, BL21 Star(DE3)pLysS e BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, transformadas com a construção plasmidial pET28a\_p28, induzidas com 0,8mM de IPTG a 30°C. As amostras correspondem a: linha 1, marcador de peso molecular de proteínas “Low Range” (Bio-Rad); linhas 2 e 3, BL21(DE3) pLYS obtida antes e após 4 horas de indução protéica; linhas 4 e 5, BL21 Star(DE3)pLysS obtida antes e após 4 horas de indução; e linhas 6 e 7, BL21-CodonPlus(DE3)-RIL obtida antes e após 4 horas de indução, respectivamente.

O resultado obtido após indução foi o mesmo nas diferentes temperaturas e para as diferentes amostras de *E. coli*. A Figura 16 ilustra o Western-blotting realizado com amostras da BL21 Star (DE3)pLysS transformadas com o plasmídeo pET28a\_p28 e com o controle positivo pET28a\_3607. Quando a membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo policlonal anti-*E. canis*, notou-se reatividade contra várias frações protéicas e, entre elas, uma banda de aproximadamente 35 kDa, que é o peso estimado para a proteína His6\_P28. Entretanto essa reatividade foi observada em todas as amostras, inclusive no controle positivo, mostrando a reatividade cruzada do soro de cão contra as frações protéicas da *E. coli*. Com o intuito de eliminar essas reações cruzadas, foi feita a indução protéica em larga escala, lise celular e purificação do sobrenadante. A análise de uma amostra do sobrenadante no gel de poliacrilamida não mostrou reatividade, e sim que não há proteína recombinante no sobrenadante purificado.

Para a confirmação da ausência de produção da proteína recombinante His6\_P28, a membrana de nitrocelulose contendo as frações protéicas da cultura de BL21(DE3) Star, transformada com o plasmídeo pET28a\_p28 e do controle positivo 3607, foi incubada com anticorpo monoclonal Anti-His, que detecta a cauda de polihistidina presente nas proteínas expressas pela subclonagem com o vetor pET-28a. Observou-se reatividade apenas no controle positivo 3607. Nota-se que não houve reação contra as frações protéicas da BL21 Star(DE3)pLysS transformada com a construção plasmidial pET28a\_p28, mostrando a ausência da histidina e, portanto, a ausência de expressão da proteína recombinante His6\_P28 (Fig. 17).

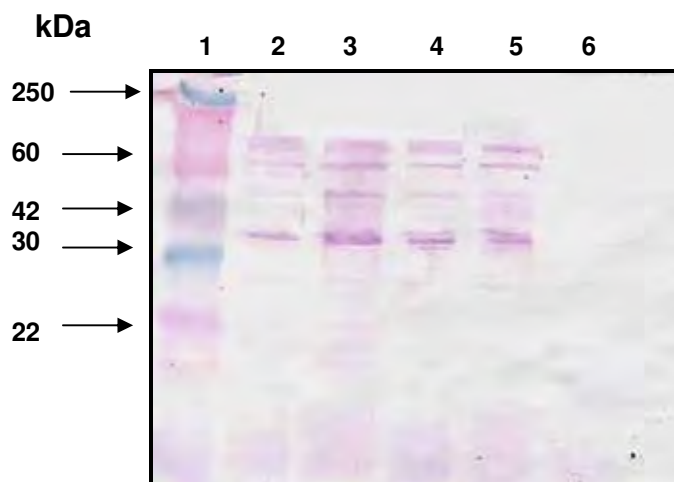


Figura 16. Visualização das bandas protéicas na membrana de nitrocelulose pelo Western-blotting de amostras de cultura de BL21 Star(DE3) pLysS transformada com a construção pET28a\_p28, após incubação da membrana de nitrocelulose com soro policlonal de cão positivo para *E. canis*. As amostras correspondem a: linha 1, marcador de peso molecular de proteínas Multimark Multi-Colored Standard (Invitrogen); linha 2, amostra obtida do controle positivo 3607 antes da indução; linha 3, amostra obtida do controle positivo 3607 após 4 horas de indução; linha 4, amostra da BL21 Star(DE3)pLysS contendo o plasmídeo pET28a\_p28 antes da indução; linha 5, amostra de BL21 Star(DE3)pLysS, contendo o plasmídeo pET28a\_p28, obtida após 4 horas de indução; linha 6, sobrenadante após purificação por cromatografia de afinidade.

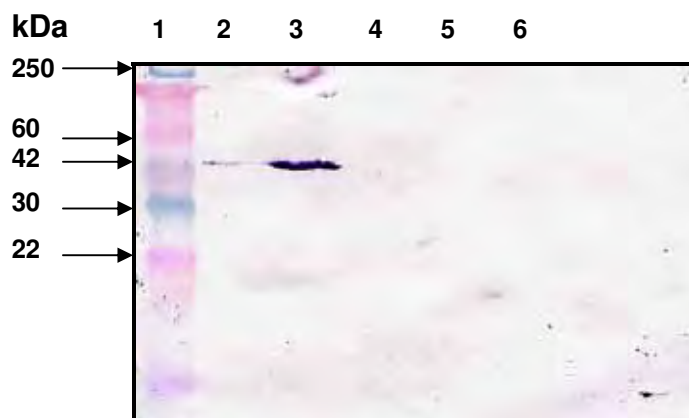


Figura 17. Visualização das bandas protéicas na membrana de nitrocelulose pelo Western-blotting de amostras da cultura de BL21 (DE3) Star transformada com a construção pET28a\_p28, após incubação da membrana de nitrocelulose, com anticorpo monoclonal Anti-His. As amostras correspondem a: linha 1, marcador de peso molecular de proteínas Multimark Multi-Colored Standard (Invitrogen); linha 2, amostra obtida do controle positivo 3607 antes da indução; linha 3, amostra obtida do controle positivo 3607 após 4 horas de indução; linha 4, amostra de BL21 Star(DE3)pLysS contendo o plasmídeo pET28a\_p28 antes da indução; linha 5, amostra de BL21 Star(DE3)pLysS contendo o plasmídeo pET28a\_p28 obtida após 4 horas de indução; linha 6, sobrenadante após purificação por cromatografia de afinidade.

### 5.7. Análise da expressão da proteína SUMO\_P28 em *E. coli*

Os resultados negativos, obtidos pela indução da expressão da proteína recombinante com o vetor de expressão pET-28<sup>a</sup>, nas diferentes linhagens de *E. coli* BL21, motivaram a utilização do vetor pET SUMO para a expressão gênica.

Assim como no vetor pET-28a, a indução da expressão foi realizada nas bactérias *E. coli* BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21 Star(DE3)pLysS e BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. A análise da expressão da proteína recombinante SUMO\_P28 pela bactéria *E. coli* foi visualizada em gel de poliacrilamida após eletroforese (SDS-PAGE). O peso molecular esperado para a proteína fusionada à partícula SUMO e à cauda de polihistidina é de 44 kDa, que representa a soma do fragmento polipeptídico P28 (31 kDa) a 13 kDa que é o peso molecular das partículas de fusão. O peso molecular do controle positivo 3607 é 45 kDa, enquanto o do controle positivo CAT é de, aproximadamente, 39 kDa. O gel revelou várias bandas polipeptídicas da bactéria transformada com pET-SUMO\_p28, que não diferiram entre as amostras colhidas antes e após a indução da expressão da proteína recombinante. Os controles positivos de indução apresentaram uma banda diferenciada correspondente à expressão da proteína e, portanto, mostrou não haver problemas nos métodos de indução ou nos reagentes utilizados (Fig. 18). As frações de *E. coli* transformadas com o plasmídeo de interesse e com os controles positivos, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo monoclonal anti-His. A membrana revelou reatividade do anticorpo apenas contra as proteínas expressas dos controles positivos, confirmando ausência de expressão da proteína P28 também com o vetor pET SUMO (Fig. 19).

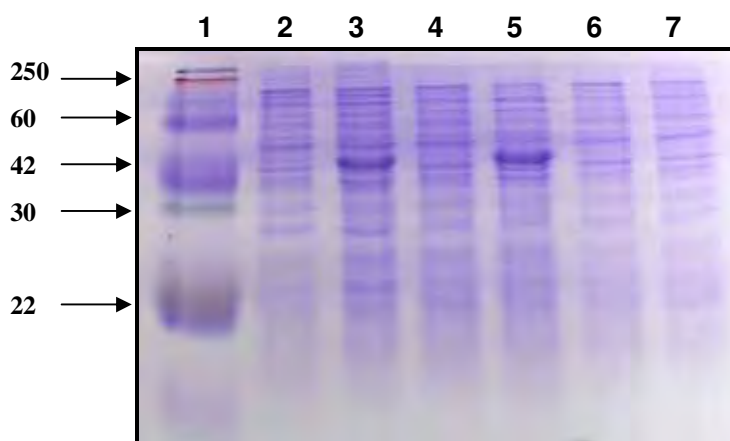


Figura 18. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) de amostras protéicas de culturas de *E. coli* BL21(DE3) pLYS, transformadas com a construção plasmidial pET SUMO\_p28 e controles positivos, antes e após indução com 0,8mM de IPTG a 37°C. As amostras correspondem a: linha 1, marcador de peso molecular de proteínas Low Range (Bio-Rad); linhas 2 e 3, amostras do controle positivo do vetor; linhas 4 e 5, amostras do controle positivo de indução, e linhas 6 e 7 amostra protéica da bactéria transformada com plasmídeo pET SUMO\_p28.

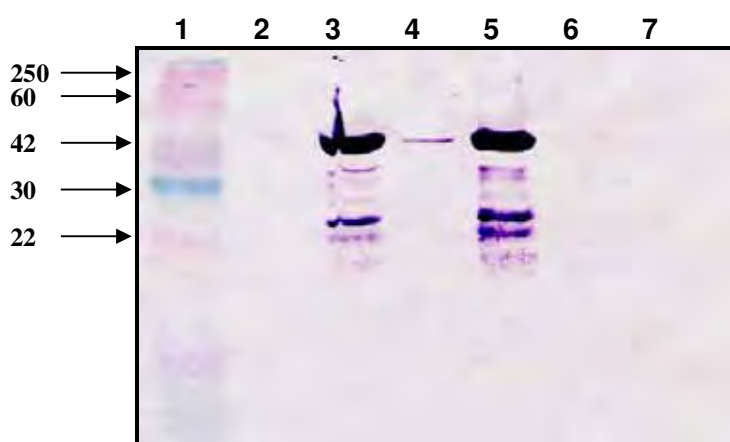


Figura 19. Visualização das bandas protéicas na membrana de nitrocelulose pelo Western-blotting de amostras da cultura de *E. coli* BL21(DE3) pLYS, transformadas com a construção plasmidial pET SUMO\_p28 e controles positivos, antes e após indução com 0,8mM de IPTG a 37°C. A membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo monoclonal anti-His. As amostras correspondem a: linha 1, marcador de peso molecular de proteínas Low Range (Bio-Rad); linhas 2 e 3, amostras do controle positivo do vetor; linhas 4 e 5, amostras do controle positivo de indução, e linhas 6 e 7 amostra protéica da bactéria transformada com plasmídeo pET SUMO\_p28.

## 6. DISCUSSÃO

A erliquiose monocítica canina é uma importante doença de etiologia bacteriana com distribuição mundial, especialmente em áreas tropicais e subtropicais. Infecções erliquiais podem mimetizar várias outras doenças, e os sinais clínicos inespecíficos dificultam o diagnóstico (COHN, 2003). Neste estudo, amostras séricas de cães foram submetidas à RIFI e ao Dot-ELISA para a detecção de anticorpos anti-*E. canis*. A análise comparativa dos resultados mostrou 86% de concordância entre os testes. Resultados similares foram encontrados em estudo comparativo entre a RIFI e Dot-ELISA, mostrando que os métodos são qualitativamente eficientes no diagnóstico da erliquiose canina (OLIVEIRA et al., 2000; HARRUS et al., 2002; NAKAGHI et al., 2008). Neste experimento, foram testadas, pela RIFI, a amostra Jaboticabal e a amostra Oklahoma de *E. canis*. Estudos realizados por AGUIAR et al. (2007) mostraram resultados idênticos obtidos pela RIFI a partir da amostra Jaboticabal e a partir da amostra Oklahoma de *E. canis*.

A otimização da PCR com base no gene *p28* de *E. canis* permitiu a amplificação de um fragmento de 843 pares de bases, e a sua comparação com a nested PCR para detecção do gene 16S rRNA mostrou uma relativa concordância entre as duas técnicas. A nPCR-16S rRNA foi capaz de detectar maior número de amostras positivas e, dentre estas, 17 não foram amplificadas pela PCR-*p28*. Avaliando a sensibilidade da PCR-*p28*, foi possível detectar o parasita em uma célula infectada dentre  $10^9$  células, enquanto a nPCR-16S rRNA é capaz de detectar o parasita dentre  $10^{36}$  células (NAKAGHI et al., 2008). Tais resultados demonstram uma maior sensibilidade da nPCR-16S rRNA em relação à PCR-*p28*. Contudo, estudos comparando ensaios da PCR para detecção de *E. chaffeensis* mostram que a PCR-*p28* é 1.000 vezes mais sensível que a nPCR-16S rDNA, naquela reação em que o tamanho do produto amplificado era de 277 pares de bases (WAGNER et al., 2004). Uma única amplificação também foi mais sensível na detecção do gene *p30* de *E. canis*, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores dentro de uma região de 135 pares de bases ou menos. Acredita-se que a maior sensibilidade esteja relacionada à seleção de oligonucleotídeos e/ou “amplicons” ótimos inseridos na

seqüência alvo, amplificando fragmentos pequenos. A sensibilidade é essencial para um ensaio de PCR aplicada em condições experimentais, mas a especificidade é de extrema importância quando utilizada em condições naturais ou experimentais que envolvem infecções concomitantes (STICH et al., 2002).

A nested PCR é o método mais comumente utilizado para o diagnóstico molecular da erliquiose (BULLA et al., 2004; MACIEIRA et al., 2005; SANTOS et al., 2007, NAKAGHI et al., 2008), pois uma única amplificação do gene 16S rRNA de *Ehrlichia* geralmente não é sensível o suficiente para detectar baixas parasitemias no sangue e nos tecidos de animais experimentalmente infectados (WEN et al., 1997; HARRUS et al., 1998; SEAMAN et al., 2004). Entretanto, uma nova amplificação a partir do DNA já amplificado pode resultar em produtos inespecíficos, em consequência do alto grau de conservação do gene 16S rRNA entre as espécies de *Ehrlichia*. Sendo assim, uma única amplificação pela PCR parece ser o método mais específico para detecção de DNA de *E. canis*. Resultados da PCR utilizando um oligonucleotídeo iniciador genérico e outro específico, demonstraram 100% de especificidade na amplificação de um fragmento de 765 pares de bases do gene 16S rRNA de *E. canis* (ALVES et al., 2005). Desvantagens na nested PCR incentivaram estudos com a PCR em tempo real que é um método quantitativo e altamente sensível para a amplificação do gene *dsb* do gênero *Ehrlichia* (LABRUNA et al., 2007).

A seqüência do gene *p28* da amostra Jaboticabal de *E. canis*, resultante do seqüenciamento, foi alinhada pelo programa computacional BLASTN que mostrou um alto grau de identidade entre os genes *p28* das amostras Jaboticabal, São Paulo e Jake. Esses resultados mostram conservação genética e protéica das amostras brasileiras e da amostra Jake. Essa conservação genética e protéica entre as amostras já foi observada em estudos realizados com isolados de *E. canis* dos Estados Unidos, que indicam o gene *p28* para produção de vacinas e padronização de métodos de imunodiagnóstico (McBRIDE et al., 1999). Neste estudo, foi revelada importante identidade entre a proteína P28 de *E. canis* e de *E. chaffeensis*. Acredita-se que, quanto mais próximos geneticamente são os organismos, maior é a reatividade cruzada entre as proteínas P28, lembrando que esta proteína já foi detectada na maioria das espécies de *Ehrlichia* (McBRIDE et al., 1999; YU et al., 1999; GUSA et al., 2001), e que

a *E. canis* é a espécie que contém mais membros da família multigênica *p28* que qualquer outra espécie (MAVROMATIS et al., 2006). Estudos sobre o genoma da *E. canis* mostram que 32 proteínas, correspondentes a 3,1% do proteoma, são comuns dentre as *Ehrlichias* (MAVROMATIS et al., 2006).

Um alto grau de identidade foi observado entre as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos do gene *p28* da amostra Jaboticabal e do gene *p30* da amostra de Oklahoma. Sabe-se que as proteínas imunodominantes de membrana P28 e P30 são codificadas por uma mesma família multigênica e que dividem epítomos entre si e, ainda, com as proteínas P25 e P29 (OHASHI et al., 1998). Em estudo preliminar, o anti-soro de camundongo contra o antígeno recombinante P28 de *E. chaffeensis* apresentou reação cruzada contra uma proteína de 30kDa da *E. canis* (OHASHI et al., 1998).

Divergências foram encontradas entre as seqüências nucleotídicas da amostra Jaboticabal e das amostras Oklahoma, Florida, Louisiana e amostras da Carolina do Norte. Tais divergências também correspondem a diferenças entre as seqüências de aminoácidos das proteínas P28 dessas amostras de *E. canis*. Estudos com diferentes isolados de *E. chaffeensis* demonstraram divergências moleculares relacionadas ao gene *p28*, as quais resultaram em variações antigênicas. (CHEN et al., 1997; YU et al., 1999).

O estudo comparativo entre diferentes isolados fornece informações sobre a resposta imune no hospedeiro e sobre o desenvolvimento de técnicas de imunodiagnóstico que sejam eficientes em detectar infecção, independentemente da amostra de *Ehrlichia* (CHEN et al., 1997).

No presente estudo, o gene *p28* foi, inicialmente, subclonado no vetor pET-28a de expressão, contudo não foi observada a produção da proteína P28 a partir da amostra Jaboticabal de *E. canis*. O sistema de expressão aqui utilizado não permitiu a produção da proteína recombinante, induzida na *E. coli* BL21(DE3). Diferentes temperaturas e concentrações do indutor IPTG foram utilizadas, mas sem sucesso. Resultados negativos motivaram o uso de diferentes linhagens da bactéria *E. coli*, na tentativa de contornar problemas de expressão, possivelmente encontrados relacionados à presença de códons raros na seqüência do gene *p28*, insolubilidade ou

toxicidade da proteína. Ainda assim, não foi observada a expressão da proteína P28 induzida nessas linhagens.

Posteriormente, optou-se por substituir o vetor de expressão pET-28a pelo vetor pET SUMO, e realizar protocolos de indução semelhantes àqueles utilizados para o vetor pET-28a. Novamente, não foi possível a produção da proteína recombinante P28 de *E. canis*.

Os vetores apresentavam diferentes características, porém, em ambos os vetores, as proteínas produzidas ao final da expressão seriam fusionadas a 6 resíduos de histidina. Não há relatos sobre a subclonagem do fragmento *p28* de *Ehrlichia canis* no vetor pET-28a ou no vetor pET SUMO, entretanto, a maioria dos estudos com proteínas recombinantes de *E. canis* descrevem a utilização do sistema pET para clonagem e expressão dessas proteínas (OHASHI et al., 1998; McBRIDE et al., 1999; ZHANG et al., 2004). Esse sistema é o mais utilizado para expressar proteínas em *Escherichia coli* (BANEYX, 1999). Muitos sistemas de expressão têm sido desenvolvidos para produção de proteínas recombinantes na bactéria *Escherichia coli*, os quais envolvem a utilização de vetores plasmidiais com diferentes características, como promotores, sítios de ligação para o ribossomo (ribosomal-binding site - RBS), genes para proteínas de fusão, terminadores da transcrição e marcadores de resistência a antibióticos. Apesar das inúmeras publicações que relatam sucesso na expressão de proteínas heterólogas por meio destes sistemas, muitos pesquisadores, freqüentemente, deparam-se com problemas como a baixa ou até a ausência de expressão protéica, formação de corpúsculos de inclusão ou degradação proteolítica (SORENSEN & MORTENSEN, 2005). Segundo BANEYX & MUJACIC (2004), esses problemas podem ser contornados pelo uso de diferentes concentrações do indutor ou do meio de cultura, uso de mutantes da célula hospedeira e/ou diferentes temperaturas de indução. Uma alternativa interessante é transferir o gene que codifica a proteína de interesse para outro vetor que utilize um sistema de expressão distinto.

Várias hipóteses poderiam explicar, neste estudo, a ausência de expressão da proteína P28 na *E. coli*, deste estudo. A expressão de proteínas de membrana em sistema heterólogo é difícil e a proteína, quando produzida, pode ser tóxica para a célula hospedeira (SHAW & MIROUX, 2003). Além disso, ESHAGHI et al. (2005)

relatam que, para a obtenção de proteínas recombinantes de membrana em quantidades suficientes, é necessária a indução da expressão em grandes volumes de cultura bacteriana.

Sabe-se que os vetores pET promovem a síntese de grandes quantidades do mRNA, acarretando acúmulo da proteína de interesse em altas concentrações. A expressão exagerada da T7 RNA polimerase pode resultar em instabilidade na expressão (BANEYX, 1999). Também a composição nucleotídica na região codificadora inicial parece ser importante para a expressão gênica, bem como a presença de códons raros, localizados ao final do gene, que podem causar alterações na fase de leitura, problemas no início da transcrição pelo ribossomo e término precoce da transcrição (KANE, 1995; LAURSEN et al., 2005; BANDMANN & NYGREN, 2007). A expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* pode se tornar difícil, quando códons do gene recombinante diferem de códons da célula hospedeira. Tal fato pode ser explicado pelo retardamento da transcrição do RNA recombinante, que resulta na degradação protéica ou substituições e erros na reunião dos códons que destroem as características funcionais da proteína (CARSTENS & WAESHE, 1999). Com o intuito de minimizar o problema, recomenda-se examinar a seqüência do gene recombinante para a presença desses códons raros e, então, utilizar células hospedeiras contendo o plasmídeo com o tRNA apropriado, ou até sintetizar o gene para a remoção desses códons (KANE, 1995).

O estudo comparativo entre códons do fragmento *p28* da amostra Jaboticabal de *E. canis* e códons da *E. coli* mostraram uma diferença de 38,64% entre eles. Os códons raros encontrados não estão localizados em regiões iniciadoras ou terminadoras da seqüência do gene *p28*. Contudo, considerando a presença de códons raros, foram utilizadas várias diferentes linhagens de *E. coli*. Ainda assim, não foi detectada expressão da proteína P28.

Estudos realizados por McBRIDE et al. (2000) mostraram não haver transcrição por RNAm policistrônico de transcritos *p28-1-2-3* ou *p28-3-4-5* e, portanto, concluíram que os genes *p28* são expressos por mensagens monocistrônicas. Considerando a transcrição desse locus multigênico por um RNAm monocistrônico, neste experimento, a expressão gênica foi baseada na utilização da seqüência codificadora do gene *p28-7*,

do códon iniciador (ATG) ao códon terminador (TAA). OHASHI et al. (2001), atentaram para a presença do códon iniciador em todas os genes deste locus, portanto, todos são funcionalmente ativos. Segundo LONG et al. (2002), os genes *p28* da *E. chaffeensis* e da *E. canis* são transcritos de maneiras diferentes e inconsistências entre expressão, e o número de genes transcritos indicam que algumas proteínas P28 são expressas, mas dificilmente seqüenciadas ou os genes são transcritos, porém, não necessariamente expressos. A expressão dos genes parece ser regulada, inicialmente, por eventos policistrônicos na extremidade 5' e monocistrônicos na extremidade 3'. O gene *p28* é um "operon", que, em primeiro lugar, ocorre em procariotos, como a *E. canis*. Um "operon" é a unidade de transcrição, que contém genes que são transcritos por um RNAm policistrônico, ou seja, um único RNAm que codifica mais de uma proteína, além de genes reguladores. A ausência de produção da proteína recombinante neste experimento, poderia ser explicada pela clonagem do gene *p28* sem a região não codificadora, que contém genes reguladores necessários para o controle da expressão de um "operon" (NELSON & COX, 2000).

A análise da produção da proteína P28 em *E. coli* por meio do Western Blotting, revelou reatividade de anticorpos do soro de cão contra as frações protéicas da *E. coli*, mesmo na ausência da expressão. Essas reações cruzadas impossibilitam a detecção da reação contra a proteína recombinante, principalmente quando a expressão ocorre em níveis basais, não diferenciados pelo gel de poliacrilamida. Cães normalmente albergam uma diversa população de amostras de *E. coli*, que podem ser transitórias ou residentes, causando infecções no trato urinário e intestinal (LOW et al., 1988). A freqüente presença dessa bactéria na flora normal de cães explicaria a reatividade demonstrada pelo Western Blotting, quando se busca a detecção da expressão da proteína P28.

O desenvolvimento de métodos de diagnóstico para a erliquiose canina é de muita importância, visto que a erliquiose é uma doença de alta incidência em cães e o diagnóstico precoce da doença propicia a escolha de um tratamento mais adequado. Estudos visando à utilização de técnicas de diagnóstico mais sensível e específico estimularam a utilização de métodos moleculares para detecção direta de agentes patogênicos e de proteínas recombinantes nos testes sorológicos. Os resultados do

presente estudo demonstraram que o gene *p28* é parcialmente conservado entre os isolados, e que é um gene bastante útil para o diagnóstico direto da *E. canis*. Ainda que muitos estudos descrevem a produção de proteínas recombinantes, muitas dificuldades são encontradas durante a padronização das técnicas de expressão das proteínas. Um maior conhecimento sobre a proteína P28 de isolados brasileiros de *E. canis* e a família multigênica que a codifica poderiam auxiliar a contornar os problemas encontrados na expressão dessa proteína. Estudos de proteoma de amostras brasileiras de *E. canis* devem ser estimulados, para promover o maior conhecimento sobre as proteínas que exercem importante função no mecanismo de evasão do sistema imune do hospedeiro, necessárias não só para utilização em técnicas de diagnóstico, mas também para o desenvolvimento de vacinas.

## 7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que:

- a PCR-*p28* é menos sensível, porém mais específica que a nPCR-16S rRNA quando utilizados oligonucleotídeos iniciadores amplificando um fragmento de 843 pares de bases do gene *p28*;
- o gene *p28* apresenta conservação genética e protéica entre as amostras brasileiras, entretanto mostra relativo polimorfismo com algumas amostras americanas;
- o gene *p28* é muito semelhante ao gene *p30* da *E. canis*.

## 8. REFERÊNCIAS

AGUIAR, D.M. et al. Serological diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis with Brazilian antigen of *Ehrlichia canis*. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p.796-802, 2007.

ALLEMAN, A.R. et al. Recombinant major antigenic protein 2 of *Ehrlichia canis*: a potencial diagnostic tool. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.39, n.7, p.2494-2499, 2001.

ALVES, L.M. et al. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da pancitopenia tropical canina por PCR. **Cienc. Anim. Bras.**, Goiânia, v.6, n.1, p.49-54, 2005.

ALTSCHUL, S.F. et al. Basic Local Alignment Search Tool. **J. Mol. Biol.**, Londres, v. 215, p. 403-410, 1990.

BANDMANN, N.; NYGREN, P.A. Combinatorial expression vector engineering for tuning of recombinant protein production in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.35, n.5, no prelo, 2007.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Curr. Opin. Biotechnol.**, Londres, v.10, p.411-421, 1999.

BANEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nat. Biotechnol.**, Nova York, v.22, n.11, p.1399-1408, 2004.

BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; HANCOCK, S.I. Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strains. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Bethesda, v. 42, n.2, p.362-368, 1998.

BULLA et al. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Vet. Res.**, Les Ulis, v.35, p. 141-146, 2004.

CARSTENS, C.P.; WAESCHE, A. Strategies, **Stratagene Manual**, La Jolla, v.12, p49-51, 1999.

CASTRO, M.B. et al. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 119, n. 1, p. 73-86, 2004.

CHANG, W.L; PAN, M.J. Specific amplification of *Ehrlichia platys* dna from blood specimens by two-step PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.34, n.12, p.3142-3146, 1996.

CHEN, S.M.; CULLMAN, L.C.; WALKER, D.H. Western immunoblotting analysis of the antibody responses of patients with human monocytropic ehrlichiosis to different strains of *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia canis*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v.4, n.6, p.731-735, 1997.

CLARK, J.M. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. **Nucl. Acids Res.**, Oxford, v .16, p. 9677–9686, 1988.

COHN, L.A. Ehrlichiosis and related infectious. **Vet. Clin. Small Anim.**, Philadelphia, v.33, p.863-884, 2003.

COSTA, J.O. et al. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte – Brazil. **Arq. Esc. Vet. Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, p. 199-200, 1973.

COWELL R.L. et al. Ehrlichiosis and polyarthrititis in three dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 192, p. 1093-1095, 1988.

DAGNONE, A.S. et al. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 117, p. 285-290, 2003.

DAGNONE, A.S. **Caracterização molecular de espécies da Família Anaplasmataceae em leucócitos e plaquetas de cães de Jaboticabal – SP e de Campo Grande – MS.** 2006. 118f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

DAVOUST, B. et al. Eriiquiose Canine Chronique: intérêt de la numération plaquettaire. **Rev. Méd. Vét.**, Toulouse, v. 142, n. 4, p. 287-292, 1991.

DUMLER, J.S. et al. 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*. **Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.**, Reading, v. 51, p.2145-2165, 2001.

DUMLER, J.S. Molecular methods for ehrlichiosis and Lyme disease. **Clin. Lab. Med.**, Washington, v.23, n.4, p.867-884, 2003.

ENGVALL, E.O. et al. A 16S rRNA-based PCR assay for detection and identification of granulocytic *Ehrlichia* species in dogs, horses, and cattle. **J. Clin. Microbiol.** Washington, v.34, n.9, p.2170-2174, 1996.

ESHAGHI, S. et al. An efficient strategy for high-throughput expression screening of recombinant integral membrane proteins. **Protein Sci.**, v.14, p.676-683, 2005.

EWING, S.A. Canine ehrlichiosis. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.**, San Diego, v.13, p.331-353, 1969.

EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using Phred I. Accuracy Assessment. **Genome Res.**, Cold Spring Harbor, v.8, n.3, p. 175-185, 1998.

FARIA, J.M.L. **Estudo comparativo de detecção de DNA de *Ehrlichia canis* em sangue total e em aspirado de baço pelo nested PCR em cães naturalmente infectados.** 2006. 65f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

GROOVES, M.G. et al. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **Am. J. Vet. Res.** Schaumburg, v.36, n.7, p.937-940, 1975.

GUSA, A.A. et al. Identification of *p28* gene in *Ehrlichia ewingii*: evaluation of gene for use as a target for a species-specific PCR diagnostic assay. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.39, n.11, p.3871-3876, 2001.

HARRUS, S. et al. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.36, n.1, p.73-76, 1998.

HARRUS, S. et al. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, n.9, p. 2745-2749, 1999.

HARRUS, S. et al. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam , v.86, p.361-368, 2002.

IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 32, n. 7, p. 1658-1662, 1994.

IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. Application of the polymerase chain reaction for the detection of *Ehrlichia canis* in tissues of dogs. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 42, p. 281-287, 1994.

JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

KANE, J.F. Effects of rare codons clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Curr. Opin. Biotechnol.**, Londres, v.6, n.5, p.494-500, 1995.

KNOWLES, T.T. et al. Characterization of the major antigenic protein 2 of *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia chaffeensis* and its application for serodiagnosis of ehrlichiosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v.10, n.4, p.520-524, 2003.

KORDICK, S.K. et al. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound Kennel in North Carolina. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.37, n.8, p.2631-2638, 1999.

KWOK, S.; HIGUCHI, R. Avoiding false positives with PCR. **Nature**, Londres, v. 339, p.237-238, 1989.

LABRUNA, M.B. et al. A preliminary investigation of Ehrlichia species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.143, n.2, p.189-195, 2007.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Londres, v.227, n.5259, p.680-685, 1970.

LAURSEN, B.S. et al. Initiation of protein synthesis in bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Nova York, v.69, n.1, p.101-123, 2005.

NELSON, D.; COX, M.M. Regulation of gene expression. In: **Lehninger Principles of Biochemistry**, 3 ed. New York, Worth Publishers, 2000, p. 1072-1118.

LOCKHART, J.M. et al. Natural history of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichiae) in the Piedmont physiographic province of Georgia. **J. Parasitol.**, Lawrence, v.83, p.887-894, 1997.

LONG, S.W. et al. Antigenic variation of *Ehrlichia chaffeensis* resulting from differential expression of the 28-kilodalton protein gene family. **Infect. Immun.** Washington, v.70, n.4, p.1824-1831, 2002.

LOW, D.A. et al. Isolation and comparison of *Escherichia coli* strains from canine and human patients with urinary tract infections. **Infect. Immun.**, Washington, v.56, n.10, 1988.

MACHADO, R. Z. Erliquiose canina. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Rio de Janeiro, v.13, supl.1, p.53-57, 2004.

MACIEIRA et al. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Vet. Clin. Pathol.**, Malden v.34, n.1, p. 44-48, 2005.

MAVROMATIS, K. et al. The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.188, n.11, 2006.

McBRIDE, J.W.; YU, X.J.; WALKER, D.H. Molecular cloning of the gene for a conserved major immunoreactive 28-kilodalton of *Ehrlichia canis*: a potential serodiagnostic antigen. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v. 6, n.3, p.392-399, 1999.

McBRIDE, J.W.; YU, X.J.; WALKER, D.H. A conserved, transcriptionally active *p28* multigene locus of *Ehrlichia canis*. **Gene**, Amsterdam , v.254, p.254-252, 2000a.

McBRIDE, J.W.; YU, X.J.; WALKER, D.H. Glycosylation of homologous immunodominant proteins of *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia canis*. **Infect. Immun.**, Washington, v.68, p.13-18, 2000b.

MEZEI, L.M.; STORTS, D.R. Purification of PCR products. In: **PCR Technology: Current Innovations**, Griffin, H.G. and Griffin, A.M., eds., CRC Press, Boca Raton, FL, p.21, 1994.

MURPHY, G.L. et al. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.79, p.325-339, 1998.

MYLONAKIS, M.E. et al. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam , v. 91, p.197-204, 2003.

NAKAGHI, A.C.H. et al. Estudo comparativo entre a PCR baseada no gene *dsb* e a nested PCR no diagnóstico da erliquiose canina. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Rio de Janeiro, v.13, supl.01, p.357, 2004.

NAKAGHI, A.C.H. et al. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v.38, n.3, 2008.

NYINDO, M.B.A. et al. Tropical canine pancitopenia: in vitro cultivation of causative agent - *Ehrlichia canis*. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 32, n.11, p.1651-1658, 1971.

OHASHI, N.; ZHI, N.; ZHANG, Y.; RIKIHISA, Y. Immunodominant major outer membrane proteins of *Ehrlichia chaffeensis* are encoded by a polymorphic multigene family. **Infect. Immun.**, Washington, v.66, p.132-139, 1998.

OHASHI, N.; RIKIHISA, Y.; UNVER, A. Analysis of transcriptionally active gene clusters of major outer membrane protein multigene family in *Ehrlichia canis* and *E. chaffeensis*. **Infect. Immun.**, Washington, v.69, n.4, p.2083-2091, 2001.

OLIVEIRA, D. et al. Anti-*Ehrlichia canis* antibodies detection by "Dot- ELISA" in naturally infected dogs, **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Rio de Janeiro, v.9, n.1, p.1-5, 2000.

REDDY, G.R.; SULSONA, C.R.; BARBET, A.F.; MAHAN, S.M.; BURRIDGE, M.J.; ALLEMAN, A.R. Molecular characterization of a 28 kDa surface antigen gene family of the tribe Ehrlichiae. **Biochem. Bioph. Res. Commun.**, Orlando, v. 247, n.3, p. 636-643, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A LABORATORY MANUAL, 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 2001.

SANGER, F; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.74, p.5463-5467, 1977.

SANTOS, F. et al. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **Vet. J.**, Londres, no prelo. 2007.

SEAMAN, R.L. et al. Comparison of results for serologic testing a polymerase chain reaction assay to determine the prevalence of stray dogs in eastern Tennessee seropositive to *Ehrlichia canis*. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.65, n.9, p.1200-1203, 2004.

SHAW, A.Z.; MIROUX, B. A general approach for heterologous membrane protein expression in *Escherichia coli*. In: SELINSKY, B.S. (Ed.) **Membrane Protein Protocols: Expression, purification and characterization**. Methods in Molecular Biology, v.228. Totowa: Humana Press, 2003, p.23-35.

SILVA, V.L.D. **Avaliação das alterações hematológicas e dos aspectos citológicos e histopatológicos da medula óssea na erliquiose canina aguda: estudo experimental**. 2001. 102f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SORENSEN, H.P.; MORTENSEN, K.K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v.115, n.2, p.113-128, 2005.

STICH, R.W. et al. Detection of *Ehrlichia canis* in canine carrier blood and in individual experimentally infected ticks with a *p30*-based PCR assay. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.40, n.2, p.540-546, 2002.

STUDIER, F.W. ROSENBERG, A.H.; DUNN, J.J.; DUBENDORF, J.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods Enzymol.**, v.185 p.60-89, 1990.

TENG, C.; PALANIAPPAN, R.U.M.; CHANG, Y. Cloning and characterization of an *Ehrlichia canis* gene encoding a protein localized to the morula membrane. **Infect. Immun.**, Washington, v.71, n.4, p.2218-2225, 2003.

THRUSFIELD, M. et al. WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemical software for veterinary medicine. **Vet. Rec.**, Londres, v.148, n.18, p.567-72, 2001.

TOWBIN, H.; STAHLIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.76, p.4350-4354, 1979.

UNVER, A. et al. Western and dot blotting analyses of *Ehrlichia chaffeensis* indirect fluorescent-antibody assay-positive and -negative human sera by using native and recombinant *E. chaffeensis* and *E. canis* antigens. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.37, n.12, p.3888-3895, 1999.

WAGNER, E.T. Development of a *p28*-based PCR assay for *Ehrlichia chaffeensis*. **Mol. Cell. Probes**, Londres, v.18, p.111-116, 2004.

WALSH, G. **Biopharmaceuticals: biochemistry and biotechnology**. Londres: Wiley, 1998, p.94-99.

WANER, T. et al. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.95, p.1-15, 2001.

WEN, B. et al. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.35, n.7, p.1852-1855, 1997.

WINSLOW, G.M. et al. Antibody-mediated elimination of the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia chaffeensis* during active infection. **Infect. Immun.**, Washington, v.68, n.4, p.2187-2195, 2000.

YU, X.J.; McBRIDE, J.W.; WALKER, D.H. Genetic diversity of the 28-kilodalton outer membrane protein gene in human isolates of *Ehrlichia chaffeensis*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.37, n.4, p.1137-1343, 1999.

YU, X.J. et al. Molecular cloning and characterization of the 120-kilodalton protein gene of *Ehrlichia canis* and application of recombinant 120-kilodalton protein for serodiagnosis of canine ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.38, n.1, p.369-374, 2000.

ZHANG, J. Expression of members of the 28-kilodalton major outer membrane protein family of *Ehrlichia chaffeensis* during persistent infection. **Infect. Immun.**, Washington, v.72, n.8, p.4336-4343, 2004.

## **9. APÊNDICE**

Apêndice. Resultados obtidos pela RIFI, Dot-ELISA, nPCR-16S rRNA e PCR-*p28* de 80 amostras de cães com suspeita clínica de erliquiose, atendidos no Hospital Veterinário da UNESP/ Jaboticabal – SP, no período compreendido entre 2004 e 2005.

Número da amostra	RIFI*	Dot-ELISA**	nPCR-16S rRNA***	PCR- <i>p28</i> ***
01	+	-	-	-
02	+	-	-	-
03	+	+	+	+
04	+	+	+	+
05	+	+	+	+
06	+	+	+	+
07	+	+	+	+
08	+	+	+	+
09	+	+	+	+
10	+	+	-	-
11	+	+	+	+
12	+	+	+	+
13	+	+	-	-
14	+	+	-	-
15	+	+	+	+
16	+	+	+	-
17	+	+	+	-
18	+	+	+	+
19	+	+	+	-
20	+	+	-	-
21	-	+	+	-
22	+	+	+	+
23	+	-	+	-
24	+	+	+	+
25	+	+	+	+
26	+	+	+	+
27	+	+	+	-
28	+	+	+	-
29	+	+	+	+
30	+	+	+	+
31	-	+	-	-
32	+	+	-	-
33	+	+	+	-
34	+	+	+	+
35	+	+	+	+
36	+	+	+	-
37	-	-	-	-
38	+	+	+	-
39	+	+	+	+
40	+	+	-	-
48	+	+	+	+
49	+	-	+	+
50	+	+	+	+
51	+	+	+	+
52	+	+	+	+
53	+	+	-	-
54	-	-	+	+
55	-	+	-	-

---

56	-	-	-	-
57	+	+	-	-
58	+	+	+	-
59	-	+	+	+
60	+	+	+	+
65	+	+	-	-
66	+	+	-	-
67	+	+	+	-
68	+	+	+	+
69	+	+	+	+
70	+	+	+	-
71	+	+	+	-
77	+	+	+	+
78	+	+	+	-
79	+	-	+	+
80	+	+	-	-
81	-	-	+	+
82	-	+	-	-
83	+	+	+	+
84	-	+	+	+
85	+	+	-	-
86	+	+	+	+
87	+	+	-	-
88	+	+	-	-
89	-	-	+	+
90	-	-	+	+
91	+	+	+	+
92	+	+	+	+
93	+	+	-	-
94	-	-	+	+
95	+	+	+	-
96	+	+	+	-

---

\* Padrão de fluorescência: + positivo, - negativo

\*\* Título sorológico > 1:80

\*\*\* Visualização da banda correspondente à amplificação do gene de *E. canis*.