



Marcos André Ferreira Santos

Licenciado em Biologia – Ramo Biologia Molecular e Genética

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Desenvolvimento de métodos moleculares para detecção de *Theileria annulata*

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: João Inácio - Investigador Auxiliar (LNIV-INRB/I.P.)

Co-orientador: Jacinto Gomes - Técnico Superior, Responsável pelo Laboratório
De Parasitologia (LNIV-INRB/I.P.)

Co-orientadora: Ana Amaro - Assistente de Investigação (LNIV-INRB/I.P.)

Este trabalho foi apoiado pelo Deputado Europeu Rui Tavares através do financiamento de uma bolsa de estudo ao mestrando durante a realização do mesmo.

Este trabalho foi realizado no Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I.P.

Apresentações em painel em encontros científicos resultantes deste trabalho:

Santos M., Soares R., Costa P., Amaro A., Inácio J., Gomes J. 2011. Development of a *Tams1*-based real time PCR approach for detecting *Theileria annulata* in bovines. MICROBIOTEC'11, Braga, Portugal (1 – 3 Dezembro, *submetido*)

Santos M., Soares R., Costa P., Amaro A., Inácio J., Gomes J. 2011. Assessment of *Theileria annulata* infection in bovines using real time PCR and isothermal DNA amplification approaches. V Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias - CCV2011, Vale de Santarém, Portugal (13 – 15 Outubro, *aceite*)

Santos M., Soares R., Costa P., Amaro A., Inácio J., Gomes J. 2011. Assessment of *Theileria annulata* infection in bovines using a *Tams1*-based real time PCR approach. 4th Congress of European Microbiologists - FEMS 2011, Genebra, Suíça (26 – 30 Junho).

Desenvolvimento de métodos moleculares para detecção de *Theileria annulata*

Copyright Marcos André Ferreira Santos, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

É com sinceridade que digo que foi um prazer trabalhar nesta tese e que esta requereu um esforço colectivo que, de uma forma ou de outra, se não fosse a dedicação de todos não teria resultado no que resultou, e é por essa razão que os meus agradecimentos vão para essas pessoas.

Gostaria de expressar a minha gratidão ao Doutor João Inácio pela sua orientação durante este trabalho e pelo seu grande optimismo que nos faz seguir em frente mesmo que o futuro pareça incerto.

Agradeço ao Dr. Jacinto Gomes pelo seu apoio constante nas mais variadas vertentes do trabalho, assim como a sua compreensão e empatia que mostra que nos fazemos entender.

À Doutora Ana Amaro agradeço toda a ajuda dada e pelo seu importante papel de mediador durante as discussões e escolhas importantes.

Ao Doutor Patrick Freire e à Doutora Mónica Cunha agradeço os conselhos dados e os reagentes dispensados que foram de muita importância para este trabalho. Ao Laboratório de Virologia do LNIV agradeço também a cedência de amostras de DNA de sangue de bovino usadas neste estudo.

Os meus agradecimentos vão também para a BioRad pelos reagentes oferecidos.

Um especial agradecimento ao Deputado Europeu Rui Tavares que, de entre muitas candidaturas à sua “bolsa do bolso” seleccionou a minha e a de mais seis pessoas, que mais do que um apoio monetário se tornou um voto de confiança no meu trabalho. Este meu agradecimento vai também para os outros mecenas, não menos importantes: Ricardo Araújo Pereira, Miguel Góis e Zé Diogo Quintela.

Aos restantes membros dos Laboratórios de Parasitologia e de Biologia Celular gostaria de expressar o meu carinho pela simpatia demonstrada todos os dias durante a minha estadia.

Gostava de agradecer à Dona Filomena os sábios conselhos, a companhia afável e a paciência para aturar as “crianças” do laboratório.

Agradeço em geral aos meus colegas e amigos, mestrandos e doutorandos, que contribuíram para o meu trabalho de uma forma ou de outra, mas principalmente pelo apoio, amizade, companhia e compreensão que só alguém que se encontra na mesma posição pode dar.

Por último quero expressar toda a minha gratidão à minha família por todo o apoio e confiança em mim inculcidos durante todo este projecto, esperando deixá-los orgulhosos de mim.

Resumo

A theileriose tropical (ou mediterrânica) é uma doença transmitida por carrças e que afecta bovinos, resultando em elevadas perdas económicas na produção e comércio internacional destes animais. O agente da doença é o hemoparasita *Theileria annulata* e a sua detecção em animais infectados é habitualmente realizada através de exame microscópico de esfregaços de sangue, que apresenta baixa sensibilidade na identificação de animais portadores, onde apenas um número diminuto de eritrócitos se mantém infectado. O objectivo deste estudo foi desenvolver métodos melhorados de detecção de *T. annulata* em amostras de sangue de bovino, baseados nas tecnologias de PCR em tempo real e de amplificação isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP). Foram desenhados oligonucleótidos iniciadores com alvos complementares no gene *Tams1*, específico de *T. annulata*, para o método de LAMP. O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue de bovino, usando métodos comerciais robotizados e kits de extracção, e foi usado como molde nas reacções de PCR em tempo real (com o corante intercalante *EvaGreen*[®]) e LAMP. Estas amostras de DNA encontravam-se testadas para a presença de parasitas dos géneros *Theileria* e *Babesia*, usando um método de hibridação reversa em membrana (*Reverse Line Blotting* – RLB). A detecção de *T. annulata* por PCR em tempo real nestas amostras revelou uma especificidade e sensibilidade de 100% e 80%, respectivamente, usando o teste de RLB como referência. A técnica de LAMP, por sua vez, conseguiu detectar uma amostra com baixa parasitémia correspondente a 0,03%. Ambas as técnicas usadas neste trabalho demonstraram ser eficientes na detecção de *T. annulata*, constituindo a técnica de PCR em tempo real um bom método de detecção em laboratórios bem equipados e a técnica de LAMP uma promissora ferramenta em laboratórios de diagnóstico com menores recursos.

Palavras-chave: *Theileria annulata*, Theileriose tropical, PCR em tempo real, LAMP (*Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification*), *Tams1*, Diagnóstico molecular.

Abstract

Tropical (or mediterranean) theileriosis is a tick-borne disease that affects bovine cattle resulting in high economic losses in production and international trade. The agent is the hemoparasite *Theileria annulata* and its detection in infected animals is usually accomplished by microscopic examination of stained-blood smears, which has low sensitivity for the assessment of carrier animals in which low numbers of erythrocytes remain infected. The aim of this study was to develop improved detection methods for *T. annulata* in bovine blood samples, based on real time PCR and Loop Mediated Isothermal DNA Amplification (LAMP) assays. Novel primers for LAMP were designed targeting the *T. annulata* species-specific *Tams1*-encoding gene. Genomic DNA was extracted from blood samples, using both a robotized commercial method and commercial kits, and used as template for *EvaGreen*[®] chemistry real time PCR and LAMP. These DNA samples were previously characterized for the presence of *Theileria/Babesia* parasites using a standardized reverse line blotting (RLB) assay. The developed real time PCR assay presented 100% specificity and nearly 80% sensitivity for the detection of *T. annulata* in blood samples, using the RLB assay as gold-standard. The LAMP assay was capable of detecting a parasitaemia of 0.03%, corresponding to a low parasitaemia sample. Both assays used in this study proved to be efficient in detecting *T. annulata*, being real time PCR a good detection method in well-equipped laboratories and LAMP a promising tool in laboratories with fewer resources.

Keywords: *Theileria annulata*, Tropical theileriosis, Real time PCR, LAMP (*Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification*), *Tams1*, Molecular diagnostics.

Índice Geral

AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
ÍNDICE GERAL	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
ÍNDICE DE TABELAS	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	XIX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>THEILERIA ANNULATA</i> E A THEILERIOSE BOVINA.....	1
1.2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	6
1.2.1. Microscopia	6
1.2.2. Diagnóstico imunológico	7
1.2.3. Diagnóstico molecular	7
1.3 OBJECTIVOS DO TRABALHO REALIZADO E PLANO DE DISSERTAÇÃO	12
2. MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1. AMOSTRAS UTILIZADAS	13
2.2. REACÇÕES DE PCR CONVENCIONAL	13
2.3. REACÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL	14
2.4. REACÇÕES LAMP	15
2.5. VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE PCR CONVENCIONAL E LAMP	16
2.6. DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO DAS REACÇÕES DE PCR CONVENCIONAL, PCR EM TEMPO REAL E LAMP	17
3. RESULTADOS	19
3.1. DETECÇÃO DE <i>THEILERIA ANNULATA</i> POR PCR EM TEMPO REAL.....	19
3.1.1. Optimização das reacções	19
3.1.2. Elaboração de rectas padrão	21
3.1.3. Análise de amostras de sangue de bovino	24
3.1.4. Identificação de polimorfismos no gene <i>Tams1</i>	27
3.2. DETECÇÃO DE <i>THEILERIA ANNULATA</i> POR LAMP	28
3.2.1. Desenho dos Primers.....	28
3.2.2. Limite de detecção e especificidade.....	31
3.2.3. Optimização das reacções	32
3.2.4. Análise de amostras de DNA extraídas de sangue de bovino.....	34
3.3 COMPARAÇÃO DOS LIMITES DE DETECÇÃO DAS TÉCNICAS USADAS	34
4. DISCUSSÃO	37
5. BIBLIOGRAFIA	41

Índice de Figuras

	Página
Figura 1.1 Árvore filogenética resultante da análise por <i>neighbor-joining</i> de sequências do gene do rDNA 18S de espécies de <i>Theileria</i> e de uma selecção de sequências de outras espécies da ordem Piroplasmida	1
Figura 1.2 Ilustração do ciclo de vida de <i>Theileria annulata</i>	3
Figura 1.3 Distribuição geográfica de <i>Theileria annulata</i> , <i>T. parva</i> e <i>T. sergenti</i>	5
Figura 1.4 Microfotografia de um esfregaço de sangue de bovino corado com <i>Giemsa</i> .	6
Figura 1.5 Esquema ilustrativo dos parâmetros a considerar no desenho de <i>primers</i> para utilização com a técnica LAMP	10
Figura 1.6 Esquema representativo do mecanismo e passos da reacção de LAMP	11
Figura 3.1 Géis de electroforese representativos da amplificação parcial do gene <i>Tams1</i> de <i>Theileria annulata</i> a partir de amostras diluídas do controlo positivo	20
Figura 3.2 Curvas de amplificação e respectivas curvas de dissociação representativas de reacções de PCR em tempo real, usando como molde diluições de amostras de DNA do controlo positivo e a concentração optimizada de <i>primers</i>	20
Figura 3.3 Gráficos representativos das diferenças verificadas nas reacções de PCR em tempo real, para as mesmas amostras mas usando misturas reaccionais de diferentes fabricantes	21
Figura 3.4 Curvas de amplificação obtidas em reacções de PCR em tempo real para triplicados das diluições seriadas de produtos de PCR do gene <i>Tams1</i> e da amostra controlo positivo de <i>T. annulata</i>	22
Figura 3.5 Recta padrão elaborada a partir de diluições seriadas de produtos de PCR do gene <i>Tams1</i> de <i>T. annulata</i>	23
Figura 3.6 Recta padrão elaborada a partir de diluições seriadas da amostra controlo positivo de <i>T. annulata</i>	23
Figura 3.7 Exemplos de curvas de dissociação do fragmento do gene <i>Tams1</i> amplificado por PCR em tempo real a partir de diferentes amostras	27
Figura 3.8 Distribuição das temperaturas de desnaturação dos produtos do gene <i>Tams1</i> amplificados por PCR em tempo real, obtidas do total das 35 amostras positivas para <i>T. annulata</i>	27
Figura 3.9 Sequência ilustrativa da região alvo do gene <i>Tams1</i> de <i>T. annulata</i> com a	28

indicação da localização da região complementar dos segmentos com base nos quais foram desenhados os conjuntos de *primers* SET_1 e SET_2

- Figura 3.10** Exemplo de géis de electroforese obtidos correspondentes a reacções LAMP utilizando os conjuntos de *primers* SET_1 e SET_2 29
- Figura 3.11** Sequência ilustrativa da região alvo do gene *Tams1* de *T. annulata* com a indicação da localização da região complementar dos segmentos com base nos quais foi desenhado o conjunto de *primers* SET_1New 29
- Figura 3.12** Sequência ilustrativa da região alvo do gene rDNA 18S de *T. annulata* com a indicação da localização da região complementar dos segmentos com base nos quais foi desenhado o conjunto de *primers* SET_18S 30
- Figura 3.13** Exemplo de géis de electroforese obtidos correspondentes a reacções LAMP utilizando os conjuntos de *primers* SET_1New e SET_18S 30
- Figura 3.14** Determinação do limite de detecção dos conjuntos de *primers* SET_1New e SET_18S, utilizando como molde diluições de produtos de PCR purificados do gene *Tams1* e rDNA 18S 31
- Figura 3.15** Ilustração da especificidade do conjunto SET_1New 31
- Figura 3.16** Géis de electroforese representativos de reacções LAMP usando o conjunto SET_1New 32
- Figura 3.17** Reacções LAMP na presença de diferentes concentrações de dNTPs 33
- Figura 3.18** Esquema resumo dos intervalos de detecção das diferentes técnicas usadas neste trabalho, usando como referência valores estimados de parasitémia 36

Índice de Tabelas

	Página
Tabela 2.1 <i>Primers</i> para LAMP desenhados neste trabalho	16
Tabela 2.2 <i>Primers</i> para obtenção de produtos de PCR dos genes <i>Tams1</i> e rDNA 18S	17
Tabela 3.1 Resultados da detecção molecular de <i>Theileria annulata</i> por PCR em tempo real em amostras de DNA extraídas de sangue de bovino previamente caracterizadas	25
Tabela 3.2 Resultados da detecção molecular de <i>Theileria annulata</i> por LAMP em amostras de DNA extraídas de sangue de bovino previamente caracterizadas	34

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

BIP	<i>Backward Inner Primer</i>
Bst	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
°C	Graus Celsius
C_T	Ciclo em que se atinge o <i>threshold</i> na reacção de PCR em tempo real
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do Inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxiribonucleótido trifosfatado (do Inglês <i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>)
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético (do Inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (do inglês <i>Enzyme-linked immunosorbent Assay</i>)
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (do inglês <i>Food and Agriculture Organization</i>)
FIP	<i>Forward Inner Primer</i>
FRET	Transferência de Energia de Ressonância de Fluorescência (do inglês <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>)
FTA™	Tecnologia rápida para análise de ácidos nucleicos (do inglês <i>Fast Technology for Analysis of nucleic acids</i>)
GC	Guanina e citosina
HRP	Peroxidase de rábano (do inglês <i>Horseradish Peroxidase</i>)
IFA	Imunofluorescência Indirecta (do inglês <i>Indirect Fluorescent Antibody</i>)
ITS	Espaçador interno transcrito (do Inglês <i>Internal Transcribed Spacer</i>)
KCl	Cloreto de potássio
LAMP	Amplificação isotérmica de ácidos nucleicos (do inglês <i>Loop-mediated isothermal amplification</i>)
LNIV	Laboratório Nacional de Investigação Veterinária
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MgSO₄	Sulfato de magnésio
µL	Microlitro
µM	Micromolar
mM	Milimolar
NASBA	Amplificação baseada em sequência de ácidos nucleicos (do inglês <i>Nucleic Acid Sequence-Based Amplification</i>)
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica (do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i> [Estados Unidos])
(NH₄)₂SO₄	Sulfato de amónia
nM	Nanomolar

OIE	Organização Internacional de Saúde Animal (do Francês <i>Office International des Epizooties</i>)
pb	Par de base
PBS	Tampão fosfato salino (do Inglês <i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reacção em cadeia da Polimerase (do Inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossômico (do Inglês <i>Ribosomal deoxyribonucleic acid</i>)
RFU	Unidades relativas de fluorescência (do Inglês <i>Relative Fluorescence Units</i>)
RLB	Hibridação reversa em membrana (do Inglês <i>Reverse Line Blotting</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (do Inglês <i>Ribonucleic acid</i>)
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico (do Inglês <i>Ribosomal ribonucleic acid</i>)
RsaI	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i> I
TamsI	Antígeno 1 de superfície principal do merozoíto de <i>Theileria annulata</i> (do inglês <i>Theileria annulata major merozoite surface antigen 1</i>)
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA (do inglês <i>Tris-borate-EDTA buffer</i>)
Tm	Temperatura de desnaturação (do Inglês <i>Melting Temperature</i>)
TMA	Amplificação Mediada por Transcrição (do inglês <i>Transcription Mediated Amplification</i>)
Tris-HCl	Trizma com ácido clorídrico
U	Unidade enzimática
UV	Ultravioleta

1. Introdução

1.1. *Theileria annulata* e a theileriose bovina

Os protozoários do género *Theileria* são hemoparasitas intracelulares obrigatórios, transmitidos por carraças (ixodídeos), pertencentes à família Theileriidae, da ordem Piroplasmida, subclasse Piroplasmida e filo Apicomplexa (Coetzer e Tustin, 2004; Purnell, 1978; Robinson, 1982; Uilenberg, 1995). Este género possui diversas espécies, três das quais causam doenças relevantes em bovinos domésticos, particularmente em animais susceptíveis: *Theileria annulata*, *T. parva* e *T. sergenti* (Li *et al.*, 2007; Preston, 2001; Schnittger *et al.*, 2000) (Figura 1.1). Existem outras espécies consideradas menos patogénicas que as anteriores, tais como *T. mutans* e *T. taurotragi*, assim como espécies consideradas não patogénicas, entre as quais *T. buffeli* (Preston, 2001; Urquhart *et al.*, 1996). Os organismos filogeneticamente mais próximos do género *Theileria* pertencem ao género *Babesia*, incluídos também na ordem Piroplasmida (Figura 1.1).

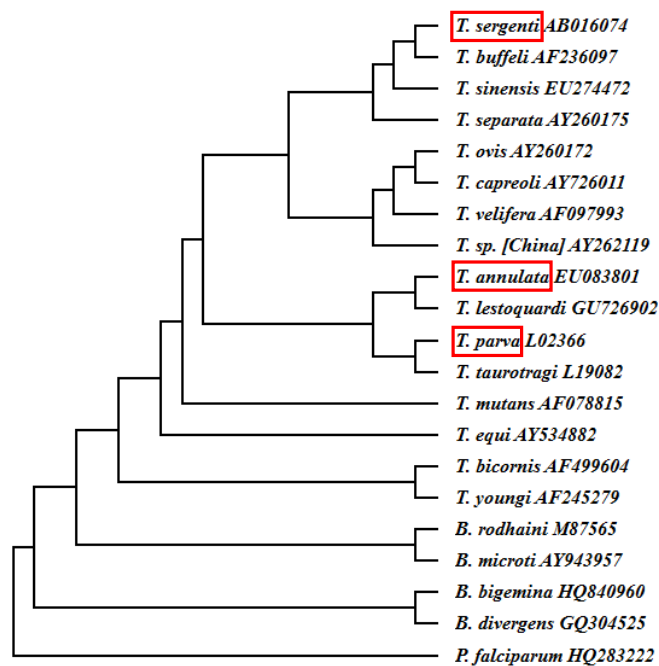


Figura 1.1. Árvore filogenética resultante da análise por *neighbor-joining* de sequências do gene do rDNA 18S de espécies de *Theileria* e de uma selecção de sequências de outras espécies da ordem Piroplasmida, utilizando o programa CLUSTAL X (2.0). As espécies patogénicas de *Theileria* em bovinos estão evidenciadas a vermelho. *Plasmodium falciparum* foi usado como *outgroup*. É indicado para cada espécie o número de acesso da respectiva sequência na base de dados do NCBI-GenBank®.

Theileria annulata e *T. parva* são as espécies de *Theileria* clinicamente mais relevantes em bovinos, sendo os agentes etiológicos da theileriose tropical (ou theileriose mediterrânica) e febre da Costa Este, respectivamente (Schnittger *et al.*, 2000). Estas duas formas de theileriose bovina são responsáveis por importantes problemas de saúde animal, provocando uma elevada mortalidade e

perdas de produtividade tendo, por isso, um elevado impacto económico na criação de bovinos, especialmente nas regiões onde esta actividade é uma prática necessária à subsistência das populações (Brown, 1997; Uilenberg, 1995). Em 1984 a *Food and Agriculture Organization* (FAO) estimou um total de 7000 milhões de dólares de perda total anual em todo o mundo devido a doenças transmitidas por carraças, que compreendem perdas directas em mortes de animais e produtividade, assim como em custos de medidas de controlo (Brown, 1997; Inci *et al.*, 2010; Uilenberg, 1995). A análise dos dados mostra também a importância destas duas doenças, verificando-se gastos na ordem dos 800 milhões de dólares na Índia devido à theileriose tropical e 168 milhões de dólares na África Este e Central devido à febre da Costa Este (Brown, 1997). Ambas as formas de theileriose bovina fazem parte de um grupo de doenças consideradas como as mais importantes e causadoras de maiores perdas na produção de bovinos a nível mundial, grupo esse que inclui também a babesiose bovina (provocada pelos protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina*), anaplasmose bovina (provocada pela bactéria *Anaplasma marginale*) e cowdriose (provocada por *Ehrlichia ruminantium*) (OIE, 2008; Schnittger *et al.*, 2000; Uilenberg, 1995). A elevada morbidade e consequente perda de produtividade resultantes da theileriose tropical e da febre da Costa Este ocorrem em bovinos de raças indígenas, embora estes tenham adquirido maior imunidade em resultado do seu maior contacto com os respectivos agentes etiológicos. Contudo estas doenças são bastante mais severas, levando mesmo à morte em animais importados e em vitelos (Preston, 2001; Samuel *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2001; Zhang, 1997). Animais infectados que sobrevivam à fase aguda da doença, passam a um estado crónico em que apresentam um nível baixo de parasitémia não apresentando sintomas, tornando-se assim reservatórios assintomáticos do parasita e contribuindo para a sua disseminação (Schnittger *et al.*, 2004).

Theileria annulata caracteriza-se por possuir um ciclo de vida bifásico, em que a primeira fase do ciclo ocorre num vector artrópode do género *Hyalomma* e a segunda fase no hospedeiro mamífero (Figura 1.2) (Branco *et al.*, 2010). No hospedeiro vertebrado, a infecção ocorre inicialmente nos macrófagos e posteriormente nos eritrócitos. O principal hospedeiro desta espécie e, possivelmente, o seu hospedeiro original, é o búfalo asiático (*Bubalus bubalis*), ao qual causa apenas infecções subclínicas (Norval *et al.*, 1992). Outros hospedeiros são o bisonte americano (*Bison bison*), o iaque tibetano (*Bos grunniens*) e os bovinos domésticos (*Bos taurus* e *Bos indicus*) (Coetzer e Tustin, 2004; Preston, 2001; Robinson, 1982; Samuel *et al.*, 2001). No hospedeiro invertebrado (ixodídeo) a infecção inicia-se na fase de larva ou ninfa, ao ingerir as formas de piroplasma que infectam eritrócitos dum hospedeiro bovino portador de *T. annulata* (Olsen, 1974). No intestino do ixodídeo ocorre então a fase de gametogonia originando gametócitos e, consequentemente, os gâmetas masculinos e femininos que, por recombinação sexuada, dão origem ao zigoto (Coetzer e Tustin, 2004; Preston, 2001). Com o ocorrer da muda de estádio e subsequente reorganização dos tecidos, o zigoto dá origem a um cineto móvel que migra pela hemolinfa até às glândulas salivares, onde ocorre a fase de esporogonia com diferenciação em esporozoítos (Coetzer e Tustin, 2004; Olsen, 1974; Preston, 2001; Robinson, 1982; Weir *et al.*, 2007). Estes esporozoítos, agora presentes nas glândulas salivares do ixodídeo, são

inoculados durante a próxima refeição num novo bovino, penetram em células mononucleadas (macrófagos e linfócitos B) onde sofrem esquizogonia, originando esquizontes (Coetzer e Tustin, 2004; Preston, 2001; Robinson, 1982). Na fase de esquizonte, ocorre a indução da proliferação da célula hospedeira, justificando o carácter linfoproliferativo da doença (resultando no aumento dos linfonodos) e subsequente expansão clonal de esquizontes (d'Oliveira *et al.*, 1995; von Schubert *et al.*, 2010). De seguida ocorre merogonia, onde os esquizontes se diferenciam em merozoítos e que, ao se libertarem da respectiva célula hospedeira, vão infectar eritrócitos. É nestas células hospedeiras que se dá a diferenciação em piroplasmas, que podem depois ser ingeridos por novos ixodídeos, fechando o ciclo (Coetzer e Tustin, 2004; d'Oliveira *et al.*, 1995; Preston, 2001; Robinson, 1982). É de realçar, no entanto, que surgem diferenças evidentes nos ciclos de vida de diferentes espécies de *Theileria*. Por exemplo, os esporozoítos de *T. annulata* invadem macrófagos e linfócitos B, já os esporozoítos de *T. parva* invadem linfócitos T e B (Preston, 2001).

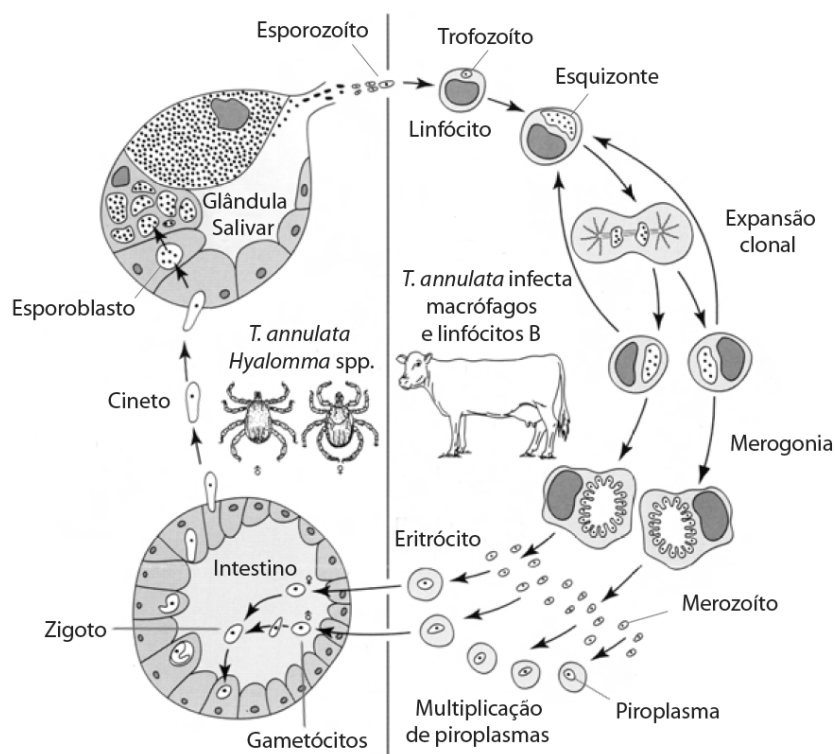


Figura 1.2. Ilustração do ciclo de vida de *Theileria annulata* (adaptado de Preston, 2001).

Na theileriose tropical, no caso de infecções agudas, os animais apresentam febre no intervalo de 40 a 41,7 °C, inapetência, cessação da ruminação, taquicardia, debilidade, diminuição da produção de leite, hipertrofia dos linfonodos superficiais, diarreia (contendo sangue e muco), icterícia, anemia e aparecimento de petéquias nos tecidos. Os animais afectados ficam emaciados, podendo mesmo terminar na sua morte (Taylor *et al.*, 2007). Nas lesões *post-mortem* pode observar-se o aumento dos linfonodos e do baço, hemorragias nos órgãos internos, edema pulmonar, espuma na traqueia, erosão e ulceração abomasal. Na análise histopatológica verifica-se a presença de parasitas nos linfócitos e/ou

macrófagos, bem como alterações linfo-proliferativas em tecidos viscerais. A linfo-proliferação ocorre numa fase inicial resultando posteriormente numa doença linfocitária destrutiva. O tecido linfóide torna-se maior numa fase inicial da doença, ocorrendo atrofia se o animal sobreviver e passar para um estágio crónico da doença. Ocasionalmente ocorrem recaídas em animais em recuperação. A fase mais severa da doença, no caso de infecção por *T. annulata* e *T. parva*, é causada pela linfoproliferação durante a multiplicação de esquizontes, enquanto o estágio de piroplasma é usualmente a fase menos patogénica e mais comumente encontrada nos bovinos em recuperação ou em casos sub-agudos (Taylor *et al.*, 2007).

Vários géneros de ixodídeos são vectores de diferentes espécies de *Theileria* (Robinson, 1982). *Theileria annulata* possui como vectores espécies de ixodídeos do género *Hyalomma*, sendo as principais *H. anatolicum anatolicum* e *H. detritum detritum* (mas *H. anatolicum excavatum*, *H. marginatum marginatum* e *H. dromedarii* são também vectores) (Aktas *et al.*, 2004; Robinson, 1982). Estes ixodídeos, apesar de possuírem meses restritos de actividade, potenciam a manutenção e a dispersão de *T. annulata* (Coetzer e Tustin, 2004; Schnittger *et al.*, 2004). Uma dessas razões prende-se com, ao contrário da maioria dos ixodídeos, que esperam na vegetação pela passagem de um hospedeiro, os adultos do género *Hyalomma* partem dos seus locais de descanso quando um potencial hospedeiro se aproxima (Jongejan e Uilenberg, 2004). Outra característica importante é a sua capacidade infectante, onde se verifica que os adultos ingurgitados deste género produzem grandes quantidades de esporozoítos do parasita, bastando uma só carraça para causar infecções fatais num ou mais bovinos (Coetzer e Tustin, 2004). *Theileria parva* é transmitida por ixodídeos do género *Rhipicephalus*, nomeadamente *R. appendiculatus*, *R. zambeziensis* e *R. duttoni* (Papli, 2010). Ambos estes géneros de ixodídeos, *Hyalomma* e *Rhipicephalus*, pertencentes à família Ixodidae, incluem espécies que se alimentam de diferentes hospedeiros e durante vários dias podendo ser assim transportados ao longo de grandes distâncias, evidenciando a sua importância como disseminadores das doenças.

A distribuição geográfica e temporal dos vectores artrópodes influencia a distribuição dos agentes e das respectivas doenças (Jongejan e Uilenberg, 2004; Preston, 2001). Assim, por exemplo, a theileriose tropical é uma doença de ocorrência sazonal, registando-se a maioria dos casos nos meses mais quentes do ano, entre Junho e Setembro, concomitante com os meses de maior actividade dos vectores de *T. annulata* (Bouattour *et al.*, 1996; Coetzer e Tustin, 2004; Darghouth *et al.*, 1996). Esta espécie possui também uma distribuição geográfica mais alargada que *T. parva*, acompanhando a distribuição dos respectivos vectores. *Theileria annulata* surge na bacia do Mediterrâneo, várias zonas do sul da Europa e norte de África, Médio Oriente e sul da Ásia (Índia e China), enquanto *T. parva* encontra-se limitada às regiões do este, centro e sul de África (Figura 1.3) (OIE, 2008; Uilenberg, 1995).

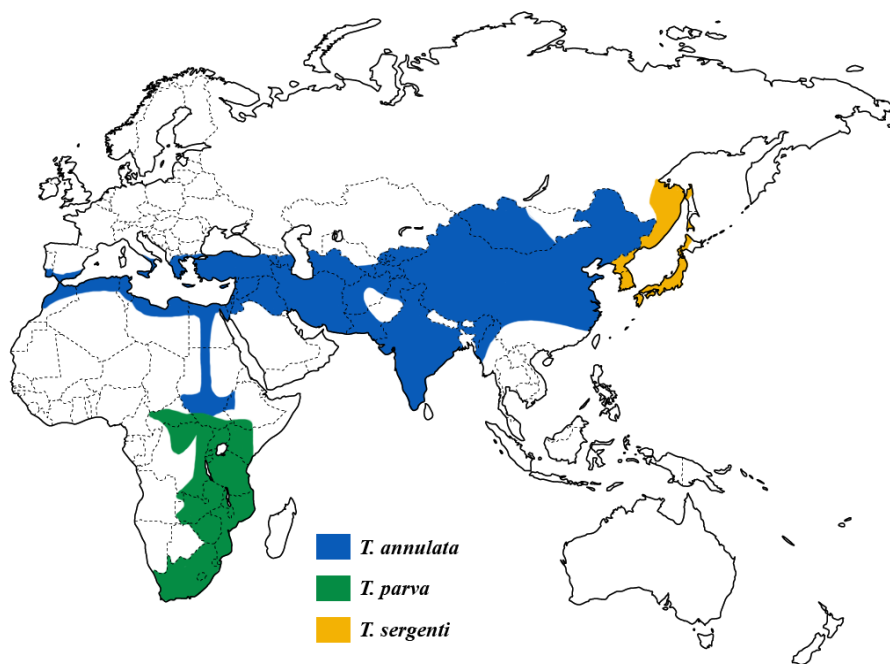


Figura 1.3. Distribuição geográfica de *Theileria annulata*, *T. parva* e *T. sergenti* (adaptado de <http://cochin.inserm.fr> e www.theileria.org acedidos a 11-08-2011).

A situação epidemiológica em Portugal é ainda pouco conhecida, mas foram confirmados casos fatais de theileriose bovina causados por *T. annulata* no sul de Portugal (Branco *et al.*, 2010). Estudos recentes confirmam também uma elevada prevalência desta e de outras espécies do género *Theileria* e *Babesia* na população bovina portuguesa (Silva *et al.*, 2010). A prevalência das espécies de *Theileria* é superior às das espécies de *Babesia*, com valores na ordem dos 70% (*T. buffeli*) e 30% (*T. annulata*), comparativamente aos cerca de 4% de *B. divergens* (Silva *et al.*, 2010). Portugal possui um clima propício à distribuição e manutenção dos ixodídeos vectores destes agentes e, consequentemente, à sua transmissão entre os animais (Estrada-Peña e Santos-Silva, 2005). As temperaturas mais elevadas e grandes áreas de montado assim como zonas de pastoreio, principalmente nas regiões Centro e Sul do país, favorecerem a existência dos ixodídeos do género *Hyalomma* (Estrada-Peña e Santos-Silva, 2005). Verifica-se também que parece haver uma maior propensão para as raças de bovinos não autóctones (tal como as raças *Limousin* e *Charolais*) apresentarem maior prevalência da infecção que os animais de raças autóctones (Branco *et al.*, 2010; Darghouth *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2010). A prevalência de *T. annulata* é inferior no norte do país, onde aliás o clima é mais desfavorável à presença dos vectores e os animais estão mais isolados, em oposição ao regime de criação extensiva mais usado no sul de Portugal (Brígido *et al.*, 2004).

1.2. Diagnóstico laboratorial

1.2.1. Microscopia

O método mais usado para diagnóstico de theileriose bovina envolve detectar e identificar o respectivo agente causal pela observação de esfregaços de sangue ao microscópio, permitindo analisar a morfologia do parasita (Figura 1.4) (Aktas *et al.*, 2005; Al-Amery e Hasso, 2002; Chae *et al.*, 1999; d'Oliveira *et al.*, 1995; Norval *et al.*, 1992; Preston, 2001; Schnittger *et al.*, 2004). Este método é, no entanto, pouco sensível em consequência da baixa parasitêmia geralmente presente no sangue e, também, pela dificuldade em distinguir morfologicamente entre as espécies patogênicas de *Theileria* bem como entre outras espécies consideradas não patogênicas (Aktas *et al.*, 2005; d'Oliveira *et al.*, 1995; Norval *et al.*, 1992). Adicionalmente, a sensibilidade da observação microscópica de esfregaços de sangue ou linfonodo, corados com solução de *Giemsa*, depende também bastante da experiência de observação do técnico (Zaemi *et al.*, 2010). Por conseguinte, a microscopia apenas permite detectar e identificar o parasita em amostras provenientes de animais em estado agudo da doença. Em animais em estado sub-clínico ou crônico, devido à muito baixa parasitêmia, torna-se mais difícil a detecção de piroplasmas nas amostras (Schnittger *et al.*, 2004). Estes animais, apesar de estarem aparentemente sãos, constituem um reservatório destes parasitas, potenciando a propagação destas doenças (Schnittger *et al.*, 2004).

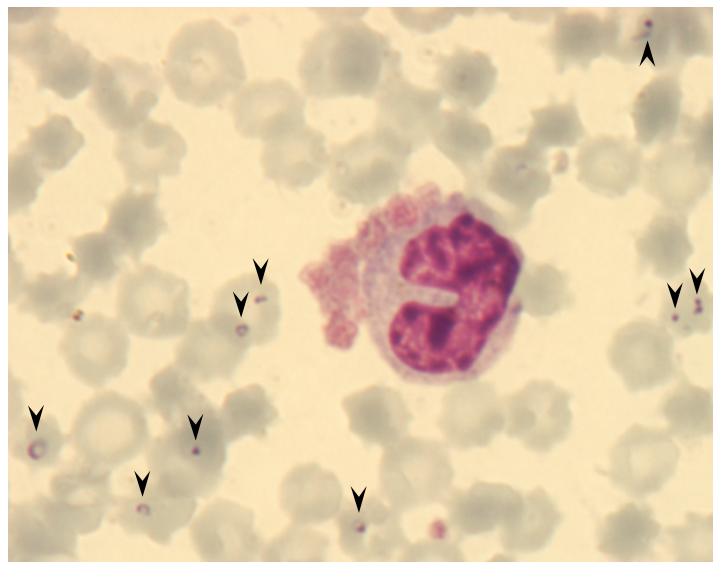


Figura 1.4. Microfotografia de um esfregaço de sangue de bovino corado com *Giemsa*. As setas indicam a presença de piroplasmas de *Theileria annulata* em eritrócitos. Ampliação 1000×.

1.2.2. Diagnóstico imunológico

Para além da microscopia, como técnica usual de diagnóstico de theileriose bovina, também se recorre a técnicas serológicas. De especial referência são os testes de imunofluorescência indirecta (IFA, do inglês *Indirect Fluorescent Antibody*), que se baseiam na detecção de anticorpos anti-antígenos de *Theileria* em soros de bovinos. Este teste utiliza cultura de células infectadas com esquizontes, imobilizadas numa lâmina, a que se vão associar os anticorpos circulantes do hospedeiro e que, em seguida, são reconhecidos por anticorpos secundários anti-bovino marcados com um fluorocromo, cujo sinal é posteriormente observado ao microscópio de fluorescência (Collins *et al.*, 2002; d'Oliveira *et al.*, 1995; Norval *et al.*, 1992). Estes testes, embora mais sensíveis que a observação microscópica directa, são relativamente trabalhosos, requerendo um técnico experiente (Norval *et al.*, 1992) e apresentam ainda problemas de especificidade devido a reacções cruzadas entre espécies próximas (Aktas *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2002; Gubbels *et al.*, 2000a; Norval *et al.*, 1992; Papadopoulos *et al.*, 1996). Por outro lado, os anticorpos circulantes nos hospedeiros tendem a desaparecer com o tempo apesar dos piroplasmas se manterem nos animais serologicamente negativos (Aktas *et al.*, 2005; d'Oliveira *et al.*, 1995). Estas desvantagens condicionam também a aplicação desta técnica em estudos epidemiológicos de grande escala (Gubbels *et al.*, 2000a). Outras técnicas imunológicas que se mostram promissoras para o diagnóstico de theileriose bovina baseiam-se em testes ELISA (do inglês *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*). Estes testes possuem a vantagem de serem mais fáceis de utilizar, permitindo o processamento de um maior número de amostras em simultâneo, o que os torna ideais para estudos epidemiológicos (Gubbels *et al.*, 2000a), como também a visualização dos resultados é mais objectiva que nos testes de imunofluorescência indirecta, diminuindo assim a probabilidade de erro por parte dos operadores (Norval *et al.*, 1992). Os testes ELISA são bastante sensíveis e baseiam-se na identificação quer de antígenos quer de anticorpos circulantes, com posterior marcação com um anticorpo secundário ligado a uma enzima que, na presença do seu substrato, produz um composto colorido (Norval *et al.*, 1992). No entanto estes testes, assim como os anteriores (IFA), continuam a apresentar reacções cruzadas entre espécies de *Theileria* e *Babesia*, comprometendo a sua especificidade (Bilgic *et al.*, 2010).

1.2.3. Diagnóstico molecular

As técnicas moleculares permitem detectar DNA de hemoparasitas directamente nas amostras biológicas com cada vez maior sensibilidade e especificidade, possibilitando a detecção de parasitémias muito baixas, que são muitas vezes características de animais portadores assintomáticos, assim como a distinção entre diferentes espécies (Calder *et al.*, 1996). A maioria dos testes moleculares descritos para detectar e identificar parasitas, designadamente membros do género *Theileria*, baseia-se na reacção de PCR (d'Oliveira *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 2010). Várias regiões genómicas foram já usadas como alvo nestes testes, entre as quais o gene do rDNA 18S (Criado-

Fornelio *et al.*, 2003), genes que codificam antígenos de superfície tal como o *Tams1* (d'Oliveira *et al.*, 1997) e proteínas como o Citocromo b (Bilgic *et al.*, 2010). Algumas destas regiões genómicas são também usadas para inferir as relações filogenéticas entre as espécies, nomeadamente o gene do rDNA 18S, que apresenta segmentos com uma elevada conservação nucleotídica mas também zonas particulares, como a região hiper-variável V4, que possuem uma grande variabilidade inter-específica (Chae *et al.*, 1998; Chansiri *et al.*, 1999). Os espaçadores internos transcritos (ITS, do inglês *Internal Transcribed Spacer*) têm sido também utilizados na identificação de estirpes de *Theileria* spp. em alguns estudos (Aktas *et al.*, 2007; Collins *et al.*, 2002). A análise da variabilidade intraspecífica destas espécies pode ser também aferida analisando outros alvos, nomeadamente as regiões micro e mini-satélites, já utilizadas com sucesso na genotipagem de certas populações de *T. annulata* (Beck *et al.*, 2009; Weir *et al.*, 2007) e *T. parva* (Katzner *et al.*, 2006; Oura *et al.*, 2003). Também a análise do gene *Tams1*, e dos genes homólogos, tem revelado a presença de polimorfismos interespecíficos e intraspecíficos em espécies de *Theileria* (Bhoora *et al.*, 2010; Gubbels *et al.*, 2000b; Manuja *et al.*, 2006; Nagore *et al.*, 2004). Nomeadamente, os polimorfismos verificados no gene *Tams1* de *T. annulata* evidenciam a existência de heterogeneidade nas respectivas populações. No entanto, não se tem conseguido verificar padrões de distribuição geográfica associados a estas diferenças, tendo sido observado, por exemplo, a presença de sequências idênticas do gene em regiões geográficas distantes (Gubbels *et al.*, 2000b; Weir *et al.*, 2007).

A técnica de hibridação reversa em membrana (RLB, do Inglês *Reverse Line Blotting*) é considerada uma técnica de referência para a detecção e identificação de espécies de *Theileria*, assim como de outros parasitas e bactérias (Georges *et al.*, 2001; Gubbels *et al.*, 1999). Esta técnica baseia-se na hibridação de produtos previamente amplificados numa reacção de PCR, que são marcados com uma molécula de biotina, com sondas específicas que se encontram immobilizadas numa membrana. A ocorrência de reacções específicas de hibridação é revelada pela aplicação de um conjugado de streptavidina com a enzima peroxidase de rábano (HRP, do inglês *horseradish peroxidase*) e consequente adição do seu substrato. As reacções de quimioluminescência resultantes da actividade enzimática sensibilizam uma película fotográfica, permitindo identificar com que sondas hibridaram os produtos de PCR (Gubbels *et al.*, 1999). Este tipo de procedimento tem várias vantagens: aumenta o nível de sensibilidade, sendo possível a detecção de parasitémias baixas em animais portadores (Altay *et al.*, 2007; Altay *et al.*, 2008; García-Sanmartín *et al.*, 2006; Gubbels *et al.*, 1999); permite a análise de várias amostras ao mesmo tempo; possibilita a detecção de várias espécies na mesma amostra (infecções mistas), usualmente difícil de detectar com outras técnicas (Georges *et al.*, 2001; Nagore *et al.*, 2004; Rijpkema *et al.*, 1995); e permite inferir a presença de espécies ainda não descritas ou variações nas sequências alvo, se ocorrer apenas marcação nas sondas universais (que hibridam com todas as espécies do género) e não nas sondas específicas para espécie (Altay *et al.*, 2007; Altay *et al.*, 2008; Gubbels *et al.*, 1999; Schnittger *et al.*, 2004). No entanto, devido ao seu carácter moroso e dispendioso, esta técnica não é normalmente aplicada no diagnóstico de rotina de

theileriose mas antes para a realização de estudos epidemiológicos (Ica *et al.*, 2007; Schnittger *et al.*, 2004).

A técnica de PCR convencional, já muito utilizada na actualidade, pressupõe a observação dos resultados somente no final da reacção e pela presença de um padrão de bandas no gel de agarose (Kim *et al.*, 2008). Foram desenvolvidas novas variantes desta técnica, nomeadamente o PCR em tempo real que introduz novas vantagens. Esta metodologia permite não só a visualização dos resultados em tempo real, sendo possível observar o decorrer da reacção ao longo dos ciclos e manter um registo dessa evolução, como também quantificar a carga parasitária alvo nas amostras (Ponchel *et al.*, 2003). O carácter quantitativo da técnica torna-se particularmente interessante em estudos de expressão génica e regulação, em discriminação alélica e detecção de agentes patogénicos (Abrantes *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008). O PCR em tempo real é baseado na detecção de fluorescência, utilizando uma de duas metodologias: uma que utiliza um corante não específico intercalante de ácidos nucleicos, como o SYBR[®] Green ou EvaGreen[®] (Buling *et al.*, 2007; Ponchel *et al.*, 2003); e outra que recorre a sondas oligonucleotídicas específicas, tais como as TaqMan e FRET (Criado-Fornelio *et al.*, 2009; Heid *et al.*, 1996; Leutenegger, 2001). A técnica mais simples, económica e fácil de aplicar é a que utiliza um corante intercalante que se liga a quaisquer moléculas de DNA em cadeia dupla pois só requer a sua adição à respectiva reacção de PCR (Buling *et al.*, 2007; Ponchel *et al.*, 2003). Esta técnica é, no entanto, menos específica que aquelas que utilizam sondas (Buling *et al.*, 2007; Ponchel *et al.*, 2003). De acordo com a literatura consultada, a detecção de espécies do género *Theileria* por PCR em tempo real foi aplicada somente para *T. parva* (Sibeko *et al.*, 2008), *T. sergenti* (Jeong *et al.*, 2003) e *T. equi* (Bhooma *et al.*, 2010).

Apesar das suas grandes potencialidades, os métodos moleculares de diagnóstico baseados em PCR continuam a requerer a utilização de recursos humanos muito qualificados bem como materiais e equipamentos sofisticados, nomeadamente termocicladores, limitando a sua aplicação no campo e em países com menores recursos (Gill e Ghaemi, 2008). Contudo, nas últimas duas décadas têm sido desenvolvidas novas técnicas para a amplificação de ácidos nucleicos baseadas em reacções isotérmicas, passíveis de serem mais facilmente integradas em dispositivos de diagnóstico mais acessíveis (Gill e Ghaemi, 2008). Exemplos relevantes destas técnicas são a *Transcription Mediated Amplification* (TMA), *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification* (NASBA) e, mais recentemente, a *Loop-mediated isothermal DNA amplification* (LAMP) (Gill e Ghaemi, 2008). A técnica de LAMP, descrita por Notomi e colaboradores (Notomi *et al.*, 2000), é a única metodologia isotérmica de amplificação de ácidos nucleicos que, até ao presente, foi adaptada para a detecção de espécies do género *Theileria*, nomeadamente *T. annulata* (Salih *et al.*, 2008), *T. parva* (Thekiso *et al.*, 2010), *T. sergenti* (Wang *et al.*, 2010), *T. lestoquardi* (Salih *et al.*, 2011) e *T. equi* (Alhassan *et al.*, 2007). Esta tecnologia baseia-se na utilização de uma polimerase de DNA com actividade de libertação das cadeias formadas e temperatura óptima de actividade entre 60 e 65 °C (nomeadamente, a polimerase *Bst*), permitindo que a reacção de amplificação se realize a uma temperatura relativamente baixa e

constante (Nagamine *et al.*, 2001; Notomi *et al.*, 2000). Nesta reacção é utilizado um sistema de, pelo menos, quatro oligonucleótidos iniciadores (*primers*) que hibridam a seis locais na região genómica alvo, tornando esta reacção muito específica (Notomi *et al.*, 2000). Estes *primers* são criteriosamente desenhados, obedecendo a vários parâmetros entre os quais o conteúdo respectivo em guanina e citosina e a correspondente temperatura de desnaturação teórica, assim como as distâncias entre os locais de hibridação (Figura 1.5) (Gill e Ghaemi, 2008; Nimitphak, 2008; Notomi *et al.*, 2000).

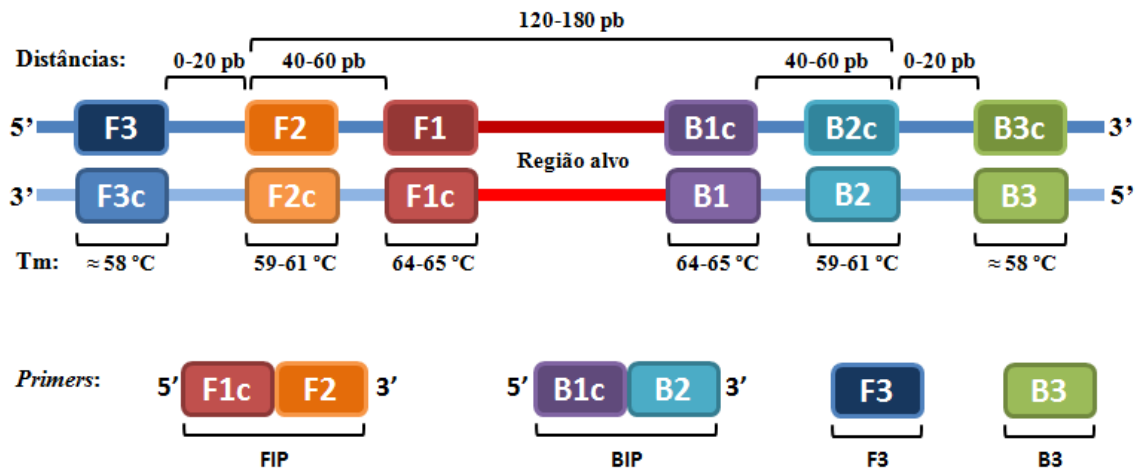


Figura 1.5. Esquema ilustrativo dos parâmetros a considerar no desenho de *primers* para utilização com a técnica LAMP.

Os *primers* usados constituem dois pares, um par externo (F3 e B3) e outro interno (FIP e BIP). O par externo flanqueia a região alvo e são *primers* semelhantes aos usados num PCR convencional. O par interno possui como alvo zonas internas à região flanqueada pelo par externo (Figura 1.5) (Gill e Ghaemi, 2008; Notomi *et al.*, 2000). Estes *primers* internos são construídos tendo em conta a seguinte estrutura: metade do *primer* FIP (do inglês, *Foward Inner Primer*) é constituída pela região F1c e a outra metade pela região F2, e o *primer* BIP (do inglês, *Backward Inner Primer*) possui numa metade a região B1c e na outra a região B2. Esta construção permite que a região F2 do *primer* FIP e a região B2 do *primer* BIP possam hibridar com os seus locais complementares, F2c e B2c respectivamente, e mantenham as porções F1c e B1c livres para se poderem ligar às regiões F1 e B1, entretanto formadas com a polimerização, criando um *loop* na estrutura resultante (Figura 1.6) (Gill e Ghaemi, 2008; Nimitphak, 2008; Notomi *et al.*, 2000). A formação destes *loops* é de extrema importância para a criação da estrutura base em forma de haltere (do inglês *dumb-bell*) que surge ao fim de algum tempo (Figura 1.6), sendo considerada a etapa limitante de toda a reacção (Tanaka *et al.*, 2010). Nas condições de reacção, é favorecida a hibridação dos *primers* internos em primeiro lugar, em detrimento dos externos, que só se ligam aos seus locais complementares mais tarde, obrigando a polimerase *Bst* a abrir a cadeia dupla que se encontra em frente, libertando a molécula previamente polimerizada (Figura 1.6) (Gill e Ghaemi, 2008; Nimitphak, 2008; Notomi *et al.*, 2000).

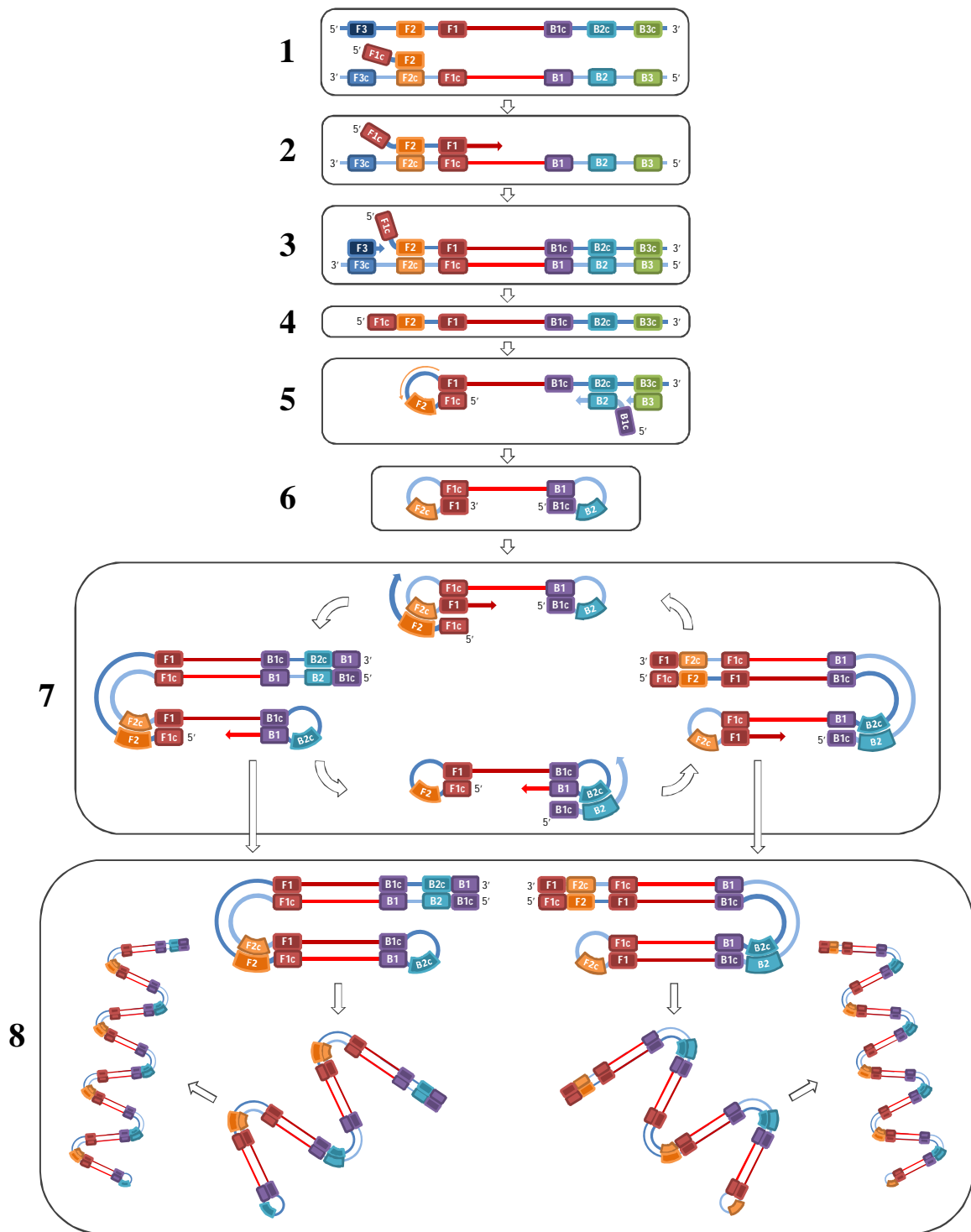


Figura 1.6. Esquema representativo do mecanismo e passos da reacção de LAMP. Num primeiro passo um dos *primers* internos (FIP ou BIP) hibrida com a região complementar alvo (F2c ou B2c), ocorrendo a polimerização da cadeia complementar (1, 2). A cadeia entretanto formada é removida quando o *primer* externo correspondente (F3 ou B3) hibrida no seu local alvo (F3c ou B3c), obrigando a polimerase *Bst* a abrir a cadeia dupla (3). Isto liberta a cadeia simples de DNA formada (4), que adquire um *loop* na extremidade 5' devido à complementaridade existente (5). A esta molécula de DNA em cadeia simples liga-se o outro *primer* interno, com subsequente polimerização e abertura das duas cadeias, libertando uma nova molécula, agora com um *loop* em cada extremidade (6). O passo seguinte é um processo cíclico em que a hibridação dos *primers* internos a esta estrutura em forma de haltere leva à formação de várias moléculas, que passam a ser novos moldes, aumentando assim o seu número de forma exponencial (7). Como resultado deste ciclo surgem estruturas de DNA em cadeia dupla complexas, com diferentes dimensões, que dão origem a um padrão em forma de escada (do inglês, *ladder-like pattern*) observado ao analisar estes produtos numa electroforese em gel de agarose (8).

A tecnologia LAMP constitui um método rápido para a amplificação específica de ácidos nucleicos, possuindo uma elevada especificidade já que depende da hibridação dos *primers* a seis locais complementares, assim como uma sensibilidade elevada em comparação com outras metodologias baseadas em PCR convencional (Alhassan *et al.*, 2007; Gill e Ghaemi, 2008; Guan *et al.*, 2008; Iseki *et al.*, 2007; Njiru *et al.*, 2010; Notomi *et al.*, 2000; Salih *et al.*, 2008; Salih *et al.*, 2011; Thekiso *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010). A detecção de agentes microbianos com a tecnologia LAMP tem sido conseguida directamente em amostras de proveniência variada, tais como água, meios de cultura, fluidos oculares, sangue e tecidos, entre outros, sendo normalmente considerada uma técnica de amplificação de ácidos nucleicos menos susceptível à presença de inibidores do que o PCR convencional (Kaneko *et al.*, 2007; Nimitphak, 2008). Os ácidos nucleicos são normalmente extraídos a partir das amostras de sangue através de sistemas comerciais de extracção, nomeadamente os cartões FTA[™], que possuem uma matriz que contém químicos capazes de lisar células, desnaturar proteínas e proteger os ácidos nucleicos, permitindo a manutenção das amostras durante muito tempo e o seu fácil transporte (Yamamura *et al.*, 2009).

1.3 Objectivos do trabalho realizado e plano de dissertação

A realização deste trabalho teve como objectivo global desenvolver testes de diagnóstico mais eficazes para a theileriose tropical, que possibilitassem a detecção directa do agente em amostras de sangue de animais infectados. Neste sentido, foram estabelecidos os seguintes objectivos específicos:

- Implementar um ensaio de PCR em tempo real para detectar e quantificar *Theileria annulata* em amostras de sangue de bovino, passível de utilização em laboratórios melhor equipados e de referência;
- Desenvolver um ensaio para detectar *Theileria annulata* no mesmo tipo de amostras, baseado na tecnologia isotérmica de amplificação de ácidos nucleicos LAMP. Devido às características desta tecnologia, este ensaio deverá ser passível de utilização futura em laboratórios e regiões com menores recursos.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostras utilizadas

Para este estudo foram seleccionadas 81 amostras de DNA total extraído a partir de sangue de bovino. Estas amostras, com origem em bovinos aparentemente saudáveis de vários distritos de Portugal, foram mantidas congeladas no biobanco de material biológico do LNIV. Sessenta e três amostras foram usadas para implementar a técnica de PCR em tempo real, tendo sido feita a sua extracção a partir de alíquotas de 150 µL de sangue, usando o módulo automatizado *BioSprint*[®]96 (Qiagen) e o sistema de extracção *BioSprint*[®]96 Blood kit (Qiagen), de acordo com as instruções dos fabricantes. As restantes 18 amostras foram usadas para a optimização da técnica de LAMP. Destas 18 amostras, 8 foram extraídas pelo método anterior e as outras 10 foram extraídas utilizando o *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche), de acordo com as instruções dos fabricantes. Todas as amostras de DNA foram armazenadas a - 20 °C até utilização posterior. Como controlo positivo foi utilizada uma solução de DNA extraído a partir de cultura celular de macrófagos infectados com esquizontes de *Theileria annulata*, mantida no LNIV após isolamento e cultura das células provenientes de sangue de um vitelo com sintomatologia compatível com theileriose bovina e em que havia sido confirmada a presença de *T. annulata* por microscopia e pelo teste de RLB (Gubbels *et al.*, 1999). Foi utilizada uma diluição de 1:10 desta solução como controlo positivo nas reacções de amplificação de ácidos nucleicos por PCR convencional e LAMP, e uma diluição de 1:1000 como controlo positivo nas reacções de PCR em tempo real. Adicionalmente, foi também usada nos testes de amplificação uma solução de DNA extraído a partir de uma amostra de sangue de bovino (amostra 8182) na qual foi observada a presença de *T. annulata* com um valor de parasitémia calculado em 0,03% recorrendo a microscopia óptica. O nível de parasitémia foi determinado pela observação de aproximadamente 10000 eritrócitos e contagem das células infectadas (que se verificaram ser 3). Foram ainda usadas soluções de DNA de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, cedidas gentilmente por Prof^a Varda Shkap (Kimron Veterinary Institute, Israel) e Prof^a Audrey Lau (Washington State University, USA), como controlos negativos das amplificações. A concentração de DNA total extraído de todas as amostras foi determinada por espectrofotometria (*Nanodrop*[®] 2000, Thermo Scientific).

2.2. Reacções de PCR convencional

Foi utilizado um par de *primers* específicos para *T. annulata* com alvos complementares em locais conservados do gene *Tams1* e que amplificam um fragmento de 319 pb (Soares, 2011). Estes oligonucleótidos, denominados Tams1_forw (5'-CAA ATT CGA GAC CTA CTA CGA TG-3') e Tams1_rev (5'-CCA CTT RTC GTC CTT AAG CTC G-3'), foram adquiridos à empresa STAB Vida Lda (Oeiras, Portugal). As reacções de amplificação continham 2,5 mM de MgCl₂ (Promega), 200 µM de cada dNTP (Promega), 1 U de *GoTaq*[®]*Flexi DNA Polymerase* (Promega) e 1× do respectivo

tampão. A esta mistura foram adicionadas diferentes concentrações de *primers*, entre 150 e 1000 nM, de modo a se determinarem as concentrações óptimas para maximizar a sensibilidade e a especificidade das reacções, assim como a redução da formação de dímeros de *primers*. Na optimização destas reacções foram utilizadas como molde diluições seriadas da amostra do controlo positivo. As concentrações de *primers* consideradas mais adequadas, e utilizadas depois no decurso do trabalho, foram de 300 nM para Tams1_forw e 150 nM para Tams1_rev. Cada reacção foi preparada para um volume total de 25 µL, incluindo a adição de 5 µL da amostra de DNA. As reacções foram realizadas num termociclador automático de DNA (*MJ Mini*TM, BioRad), com as seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C durante 10 minutos, seguido de 34 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 30 segundos, hibridação a 55 °C durante 30 segundos e extensão a 72 °C durante 45 segundos, acabando com um passo final de extensão de 72 °C durante 10 minutos. Cada reacção de amplificação incluiu também um controlo positivo (descrito em 2.1) e um controlo negativo (água destilada estéril livre de DNases/RNases, GIBCO, Invitrogen). Os produtos de PCR foram visualizados como referido na secção 2.5.

2.3. Reacções de PCR em tempo real

O mesmo par de *primers* que amplifica parcialmente o gene *Tams1* por PCR convencional (ver 2.2) foi utilizado, também, para a implementação e optimização de uma reacção de PCR em tempo real para detectar *Theileria annulata* nas amostras. Foi utilizada a química *EvaGreen*[®] (BioRad) no desenvolvimento deste sistema. Procedeu-se em primeiro lugar à optimização das concentrações dos *primers* nas reacções. Após optimização, as misturas das reacções de PCR em tempo real continham 300 nM de Tams1_forw, 150 nM de Tams1_rev e 1× da mistura reacçãoal *Supermix SsoFast*TM *Evagreen*[®] (BioRad), para um volume total de 20 µL, incluindo 5 µL de solução de DNA molde. As reacções de PCR em tempo real foram realizadas num sistema *CFX96*TM (BioRad) com o seguinte programa: um passo de desnaturação inicial a 95 °C durante 2 minutos, seguido de 45 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 15 segundos, hibridação a 55 °C durante 30 segundos e extensão a 72 °C durante 30 segundos. No final dos ciclos de temperatura foi incluído um passo adicional para a determinação da curva de dissociação dos fragmentos amplificados. Este passo consiste num aumento da temperatura em 0,5 °C a cada 5 segundos, começando a 55 °C e acabando a 95 °C, permitindo estudar a cinética de dissociação dos fragmentos de DNA amplificados e analisar, por exemplo, a ocorrência da formação de dímeros de *primers* ou de quaisquer outros subprodutos da reacção. Cada experiência de amplificação incluiu um controlo positivo (descrito em 2.1.) e um controlo negativo (água estéril destilada livre de DNases/RNases, GIBCO, Invitrogen). Os resultados das reacções de PCR em tempo real foram analisados utilizando o programa *CFX Manager*TM (versão 1.5, BioRad).

Adicionalmente, foi obtida uma recta padrão para o sistema de PCR em tempo real desenvolvido, usando como molde diluições seriadas de produtos de PCR amplificados e purificados

(do gene *Tams1*) com uma concentração conhecida, e a partir da qual se estimou o número de cópias dos alvos genómicos (descrição do protocolo de purificação na secção 2.6). Os valores médios de C_T (número do ciclo em que se detecta aumento de fluorescência), obtidos para cada diluição em triplicado, são representados graficamente em função do logaritmo do número estimado de cópias da região genómica presente nas reacções, obtendo-se uma regressão linear dos pontos assim como o seu coeficiente de correlação. Foi ainda calculada a eficiência da amplificação desta reacção utilizando o declive da recta obtida, através da equação $E = 10^{(-1/\text{declive})} - 1$ (Dhanasekaran *et al.*, 2010).

2.4. Reacções LAMP

Desenho de primers para LAMP. Foram desenhados três conjuntos de *primers* para LAMP, com alvos complementares no gene *Tams1* de *Theileria annulata* (SET_1, SET_2 e SET_1New), de acordo com as instruções descritas por Notomi *et al.* (2000) e no *LoopAmp Eiken Genome website* (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/index.html>) (Tabela 2.1). A selecção de segmentos oligonucleotídicos baseou-se na análise comparativa de um total de 174 sequências do gene *Tams1* de *T. annulata* e de genes homólogos em *T. parva*, *T. buffeli*, *T. sergenti*, *T. lestoquardi*, *T. luwenshuni*, *T. taurotragi* e *T. mutans*, disponíveis a partir de base de dados públicas (NCBI-Genbank®). Foi desenhado um conjunto adicional de *primers* com alvos complementares no gene do rDNA 18S (SET_18S) (Tabela 2.1), recorrendo-se à análise comparativa de um total de 128 sequências de *T. annulata* e de outras espécies próximas tais como *T. parva*, *T. buffeli*, *T. lestoquardi* e algumas espécies de *Babesia*, disponíveis na base de dados do NCBI-Genbank®.

Reacções LAMP. Os conjuntos de *primers* LAMP descritos na Tabela 2.1 foram adquiridos à STAB Vida Lda (Oeiras, Portugal) e a sua eficiência foi avaliada para a amplificação isotérmica de ácidos nucleicos. A mistura de reacção continha a seguinte composição: 6 mM de MgCl₂ (Promega), 1400 µM de cada dNTP (Promega), 0,8 M de betaína, 1,6 mM e 0,2 mM de ambos os *primers* externos (FIP e BIP) e internos (F3 e B3), respectivamente, 4,8 U de *Bst DNA Polymerase Large Fragment* (New England BioLabs) e 1× do tampão respectivo (*ThermoPol Reaction Buffer*: 20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, pH 8,8) (New England BioLabs). As reacções foram preparadas para um volume total de 15 µL, incluindo 3 µL da amostra de DNA. Antes de se efectuar a reacção de LAMP, todas as amostras de DNA foram submetidas a uma desnaturação prévia a 95 °C durante 10 minutos, com posterior arrefecimento a 4 °C, que se verificou importante para aumentar a sensibilidade da reacção. As reacções foram realizadas num termociclador (*C1000 Thermal Cycler*, BioRad), a uma temperatura constante de 63 °C durante 90 minutos, com um passo final a 80 °C durante 2 minutos para inactivação da polimerase. Tal como referido para as reacções de PCR convencional, cada reacção de amplificação LAMP incluiu também um controlo positivo (descrito em 2.1) e um controlo negativo (água destilada estéril livre de DNases/RNases, GIBCO,

Invitrogen). Para a confirmação da identidade dos fragmentos amplificados por LAMP, foi feita uma análise de restrição com a enzima *RsaI*, de acordo com as instruções do fabricante (New England Biolabs). Os produtos de amplificação das reacções de LAMP foram visualizados tal como descrito em 2.5.

Tabela 2.1. *Primers* para LAMP desenhados neste trabalho.

Conjunto	Designação	Sequência (5'-3')
SET_1	F3_1	CCGTTAATGCTGCAAATGAGG
	B3_1	CCCTTGAACAAGACWTCATCG
	FIP_1	GCTTAAGTTTGAATGCCTKTACTGG-CCCTTAAGGTCGGAGACAAG
	BIP_1	GATGTTCAAGAAGAAGGGAGACAAG-TAGGTCTCGAATTTGRMCTCAG
SET_2	F3_2	TCTATACCGGYGACTCAAGG
	B3_2	AAGGAAGTAAAGGACTGATGAG
	FIP_2	GCCTTGTTTGCATCTGHCTGTG-GAGCTTAAGGACGATAAGTGG
	BIP_2	CGACAAGTTCTCYCCCCTTGC-CGATGAGTACTGAGGCGAAG
SET_1New	F3_1	CCGTTAATGCTGCAAATGAGG
	B3_1New	CCACTTATCGTCCTTAAGCTCG
	FIP_1	GCTTAAGTTTGAATGCCTKTACTGG-CCCTTAAGGTCGGAGACAAG
	BIP_1New	GATGTTCAAGAAGAAGGGAGACAAG-CCCTTGAACAAGACWTCATCG
SET_18S	F3_18S	AGCAGCCGCGGTAATTC
	B3_RLB	CTAAGAATTTACCTCTGACAGT
	FIP_18S	CAGAGGGACACAAGCAATGCAG-CCAATAGCGTATATTTAAATTTGTTGC
	BIP_18S	CGGAGTTTCTTTGTCTCYGAATGTTTACTT-CTATTCAAGGCGAAAGCCTGC

2.5. Visualização dos produtos de amplificação de PCR convencional e LAMP

Os produtos de amplificação das reacções de PCR convencional e de LAMP foram visualizados em gel de agarose a 1,5 % (p/v) em tampão TBE 1×, reconstituído a partir de um tampão 5× concentrado (54 g de Trizma Base, 27,5 g de ácido bórico e 20 mL de uma solução 0,5 M de EDTA, pH 8, para um volume total de 1 L em água bidestilada). Utilizou-se 3 µL de *Hyperladder*TM IV (Bioline) ou de *Log Scale 100 bp DNA Ladder* (Jena Bioscience) como marcadores de pesos moleculares. Os produtos de PCR e LAMP foram submetidos a electroforese a 90 V durante 60 e 90 minutos, respectivamente, sendo os padrões de bandas de DNA visualizados num transiluminador de luz ultravioleta após coloração dos géis num banho de brometo de etídio (0,2 mg/µL) durante 30 minutos. Foram captadas imagens dos géis por um sistema de imagem digital *UVP BioDoc-It*TM *Imaging System* (Upland, California, USA).

2.6. Determinação do limite de detecção das reacções de PCR convencional, PCR em tempo real e LAMP

Com o objectivo de determinar o limite de detecção das reacções de PCR convencional, LAMP e PCR em tempo real, bem como para construir uma recta padrão para a reacção de PCR em tempo real, foram preparadas amostras padrão obtidas de produtos de PCR de cada gene nomeadamente *Tams1* e rDNA 18S. Uma extensa porção do gene *Tams1* foi amplificada numa reacção de PCR, a partir de uma amostra de controlo positivo (descrita em 2.1), utilizando *primers* originalmente descritos por Gubbels e colegas (2000b) (Tabela 2.2) para a amplificação de um fragmento de 851 pb que contém as regiões alvo amplificadas nas reacções descritas atrás (Secções 2.2, 2.3 e 2.4). Para amplificação do gene rDNA 18S foram utilizados os *primers* descritos por Georges e colegas (2001) (Tabela 2.2), que flanqueiam a região hiper-variável V4 e produzem fragmentos amplificados com 431 pb. Os produtos de PCR foram submetidos a um protocolo de purificação utilizando o sistema *illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) e a concentração de DNA foi determinada num espectrofotómetro *Nanodrop® 2000* (Thermo Scientific). O número de cópias de fragmentos de DNA existentes nas amostras foi em seguida estimado utilizando a seguinte expressão (Dhanasekaran *et al.*, 2010):

$$N^{\circ} \text{ de cópias}/\mu\text{L} = \frac{[\text{DNA}](\text{g}/\mu\text{L}) \times 6,022 \times 10^{23} (\text{moléculas}/\text{mole})}{[\text{Comprimento do fragmento}] \times 660 \text{ daltons}}$$

Após preparação e caracterização das amostras padrão para ambos os genes foram, em seguida, preparadas diluições seriadas dos produtos purificados a serem utilizados nas respectivas reacções de amplificação desenvolvidas neste trabalho para a determinação dos correspondentes limites de detecção.

Tabela 2.2. *Primers* para obtenção de produtos de PCR dos genes *Tams1* e rDNA 18S.

Alvo	Designação	Sequência (5'-3')	Origem
<i>Tams1</i>	F	ATGTTGTCCAGGACCACCC	Gubbels <i>et al.</i> (2000b)
	R	GGGTTTTAAAGGAAGTAAAGG	
rDNA 18S	RLB-F2	GACACAGGGAGGTAGTGACAAG	Georges <i>et al.</i> (2001)
	RLB-R2	CTAAGAATTTACCTCTGACAGT	

3. Resultados

3.1. Detecção de *Theileria annulata* por PCR em tempo real

A primeira parte deste trabalho consistiu na optimização de um sistema baseado na técnica de PCR em tempo real, usando o corante intercalante *EvaGreen*[®], para detectar o agente patogénico *Theileria annulata* em amostras de DNA total extraído de sangue de bovino. Foram assim realizadas tarefas no sentido de otimizar a composição da mistura de reacção, com particular ênfase na concentração dos *primers* específicos do agente. Uma vez optimizada, a técnica foi testada na detecção de *T. annulata* em amostras biológicas previamente caracterizadas por PCR convencional e RLB.

3.1.1. Optimização das reacções

Neste trabalho foram usados *primers* específicos de *T. annulata*, que amplificam um fragmento do gene *Tams1*, denominados *Tams1_forw* e *Tams1_rev* (Soares, 2011). Estes oligonucleótidos foram originalmente adaptados para a detecção do agente por PCR convencional (Soares, 2011). Para a adaptação à técnica de PCR em tempo real (utilizando *EvaGreen*[®]), as suas concentrações na mistura de reacção tiveram de ser optimizadas com vista à eliminação da formação de dímeros, que de outra forma dificultariam a distinção entre resultados positivos e negativos. Na realidade, verificou-se que a utilização de concentrações demasiado elevadas de *primers* nas reacções levava à formação de uma grande quantidade de dímeros que, devido à reduzida dimensão dos respectivos fragmentos, se apresentam na região de menor peso molecular nos géis de electroforese (Figura 3.1). Também se verificou que uma formação mais acentuada de dímeros dificulta a amplificação dos fragmentos específicos a partir de amostras com uma menor concentração de DNA molde. Este facto pode ser observado na Figura 3.1 em que nos poços 4, 8 e 12, onde foram depositados produtos de amplificação de amostras com a mesma diluição de DNA molde, quase não se verifica a ocorrência de amplificação quando se usou uma maior concentração de *primers* nas reacções (1 µM; poço 4). Foram assim testadas várias combinações de concentrações de *primers*, de modo a diminuir a formação de dímeros e maximizar a eficiência das reacções de amplificação. As concentrações finais consideradas mais eficientes foram 300 nM de *Tams1_forw* e 150 nM de *Tams1_rev* na mistura das reacções, valores que foram seleccionados para as restantes experiências de PCR convencional e em tempo real. Na Figura 3.2, representativa de reacções de PCR em tempo real usando como molde diluições da amostra de DNA do controlo positivo é possível observar que a concentração seleccionada para os *primers* elimina a formação de dímeros na sua quase totalidade.

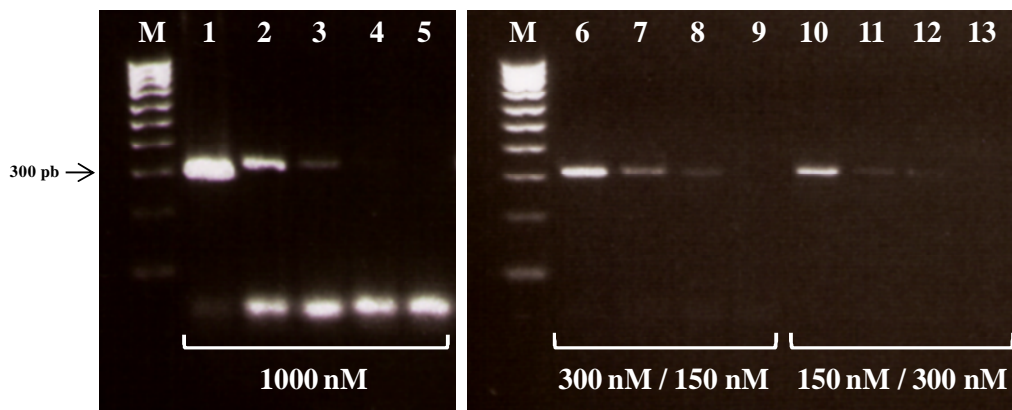


Figura 3.1. Géis de electroforese representativos da amplificação parcial do gene *Tams1* de *Theileria annulata* a partir de amostras diluídas do controlo positivo. Foram utilizadas diferentes concentrações dos *primers* *Tams1_forw* e *Tams1_rev*, que se encontram assinaladas na figura. As amostras de DNA molde de *T. annulata* usadas corresponderam a diluições 1:10 (poço 1), 1:1000 (poços 2, 6 e 10), 1:5000 (poços 3, 7 e 11) e 1:10000 (poços 4, 8 e 12) do controlo positivo. Os poços 5, 9 e 13 correspondem ao controlo negativo. (M) Marcador de pesos moleculares *HyperladderTM IV* (Bioline).

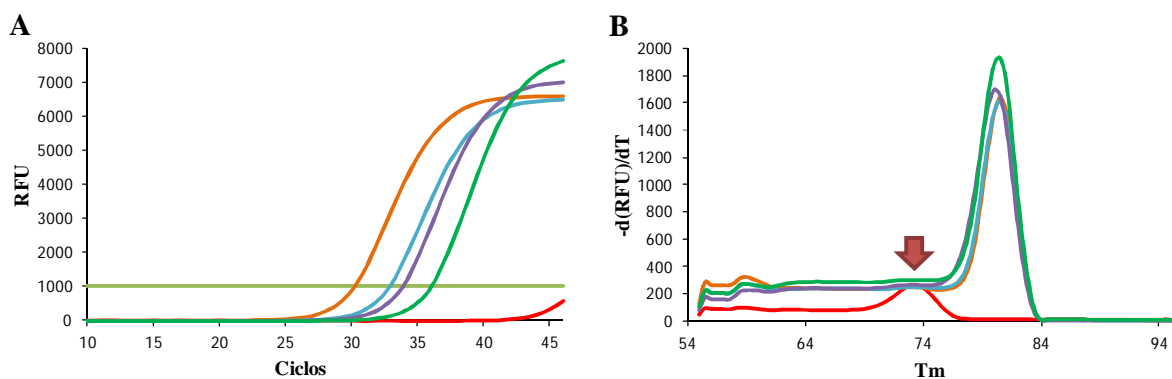


Figura 3.2. Curvas de amplificação (A) e respectivas curvas de dissociação (B) representativas de reacções de PCR em tempo real, usando como molde diluições de amostras de DNA do controlo positivo e a concentração otimizada de *primers* (300 nM de *Tams1_forw* e 150 nM de *Tams1_rev*). (—) Diluição 1:1000; (—) 1:5000; (—) 1:10000; (—) 1:50000; (—) Controlo Negativo. A seta indica a temperatura na curva de dissociação, onde surgem os eventuais picos correspondentes à formação de dímeros de *primers*. RFU – Unidades relativas de fluorescência; $-d(RFU)/dT$ – Regressão negativa da fluorescência em relação à temperatura; T_m – temperatura de desnaturação.

Para além da optimização da concentração dos *primers* na mistura das reacções de amplificação, foi também avaliada a eficiência das misturas de reacção de diferentes fabricantes, nomeadamente da *qPCR GreenMaster w/ROX* (Jena Bioscience) e da *SsoFast™ EvaGreen® Supermix* (BioRad). Verificou-se que, para as mesmas amostras de DNA molde, a segunda mistura reaccional originou os melhores resultados de amplificação, apresentando curvas com a cinética reaccional adequada e produzindo níveis de fluorescência mais elevados (Figura 3.3).

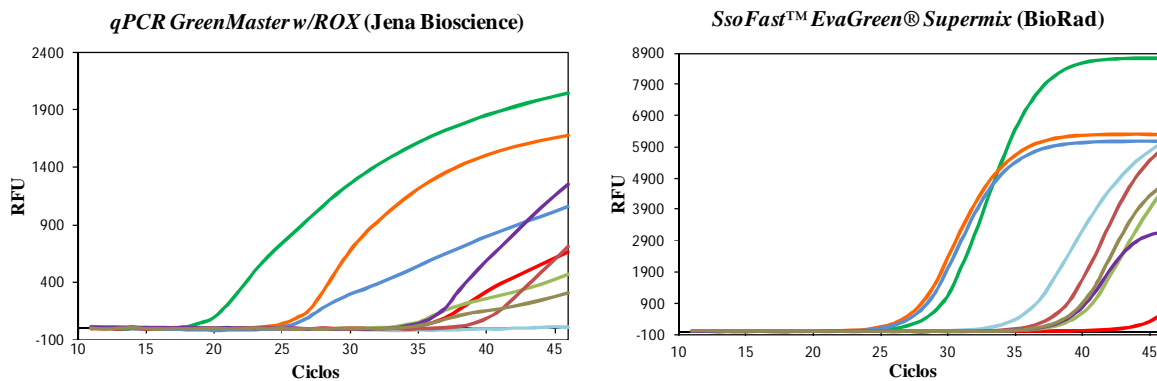


Figura 3.3. Gráficos representativos das diferenças verificadas nas reacções de PCR em tempo real, para as mesmas amostras mas usando misturas reaccionais de diferentes fabricantes (indicadas na figura). Amostras testadas: (—) FAG1; (—) MFC11; (—) EAB3; (—) NWA1; (—) MFB11; (—) EAD3; (—) MFC10; (—) Controlo Positivo e (—) Controlo Negativo. RFU – Unidades relativas de fluorescência.

3.1.2. Elaboração de rectas padrão

Após a optimização das reacções de PCR em tempo real para detectar o gene *Tams1* de *T. annulata* em amostras de DNA contendo ácidos nucleicos deste agente, foram obtidas rectas padrão para este sistema. A elaboração destas rectas padrão permite determinar a eficiência das reacções de PCR em tempo real, o limite de detecção da técnica e, em última análise, quantificar o número de cópias de DNA alvo nas amostras. Para a elaboração das rectas padrão é necessário efectuar reacções de PCR em tempo real usando como molde diluições seriadas de uma amostra de DNA alvo com uma concentração conhecida. Estas amostras padrão podem conter DNA extraído de amostras de sangue cuja parasitémia foi previamente determinada (Sibeko, 2008), DNA plasmídico contendo o gene ou região genómica alvo, ou produtos de PCR do mesmo DNA alvo (Dhanasekaran *et al.*, 2010). Neste trabalho foram usados produtos de PCR purificados para a preparação de uma recta padrão, a partir de uma amostra inicial com uma concentração estimada em $1,23 \times 10^{11}$ cópias/ μL (secção 2.6). Adicionalmente, foi também determinada uma recta padrão usando como molde diluições seriadas da amostra de controlo positivo com 147 ng/ μL de DNA total (secção 2.1), de modo a determinar a eficiência da reacção com estas amostras. Na Figura 3.4 estão representados os resultados obtidos para as reacções de amplificação, realizadas em triplicado, utilizando diluições seriadas decimais de soluções de produtos de PCR purificados (Figura 3.4A) e do controlo positivo (Figura 3.4B).

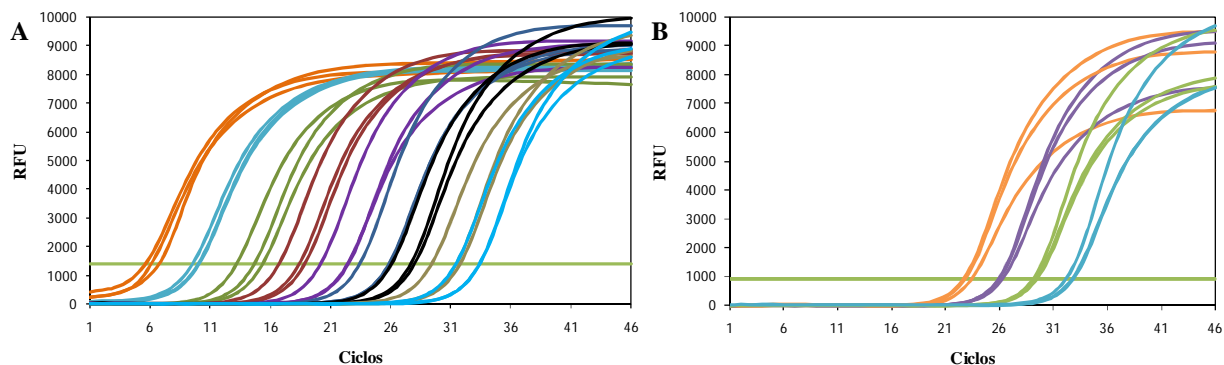


Figura 3.4. Curvas de amplificação obtidas em reacções de PCR em tempo real para triplicados das diluições seriadas de produtos de PCR do gene *Tams1* (**A**) e da amostra controlo positivo de *T. annulata* (**B**). Cada conjunto de triplicados encontra-se representado com a mesma cor de linha, designadamente em (**A**): (—) diluição 10^{-2} ; (—) 10^{-3} ; (—) 10^{-4} ; (—) 10^{-5} ; (—) 10^{-6} ; (—) 10^{-7} ; (—) 10^{-8} ; (—) 10^{-9} ; (—) 10^{-10} e em (**B**), (—) diluição 10^{-1} ; (—) 10^{-2} ; (—) 10^{-3} ; (—) 10^{-4} . RFU – Unidades relativas de fluorescência.

As rectas padrão foram obtidas representando a concentração de DNA alvo das diluições seriadas em relação aos respectivos números de ciclo (C_T) em que se detectou produção de fluorescência acima da linha de *Threshold* nessas diluições (Figuras 3.5 e 3.6). A aplicação de uma regressão linear a estes pontos permite calcular a eficiência da reacção (E), através do declive da recta, e o coeficiente de determinação (R^2). Utilizando o declive das rectas padrão representadas nas Figuras 3.5 e 3.6, a eficiência das reacções de PCR em tempo real usando como molde diluições de produtos de PCR e de uma amostra controlo positivo foi determinada em 98% e 105%, respectivamente (secção 2.3). Estes valores encontram-se dentro do intervalo recomendável (90 - 110%), confirmando que na fase exponencial da reacção ocorre a duplicação a cada ciclo dos produtos de PCR formados (Applied Biosystems, 2008). Os valores de R^2 , que indicam o quanto a regressão linear aplicada se aproxima dos pontos obtidos, encontram-se próximos de 1 conferindo uma boa confiança na regressão linear obtida (Figuras 3.5 e 3.6) (Applied Biosystems, 2008). Verificou-se também que esta técnica apresenta um limite de detecção estimado em, pelo menos, 1,23 cópias do gene *Tams1* por microlitro na amostra, que corresponde à diluição de 10^{-11} dos produtos de PCR purificados (ver secção 2.6).

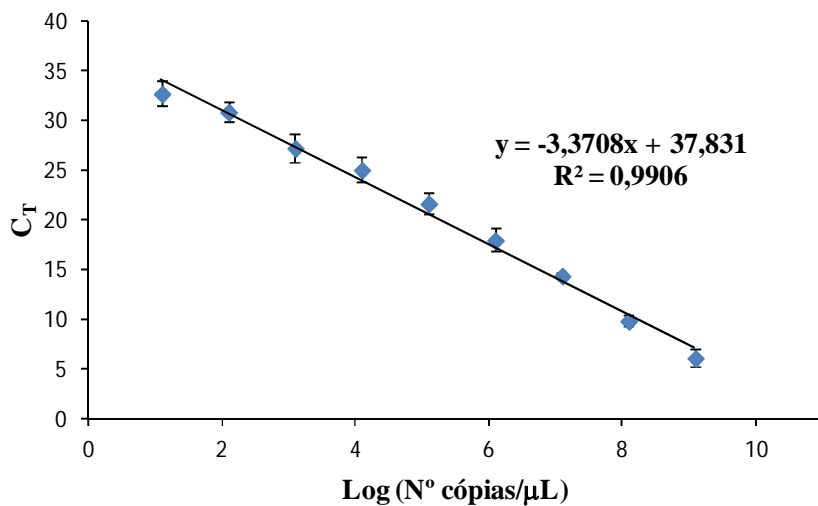


Figura 3.5. Recta padrão elaborada a partir de diluições seriadas de produtos de PCR do gene *Tams1* de *T. annulata*. Os valores de C_T em cada ponto (diluição) correspondem à média dos valores obtidos em triplicados das reacções. É apresentada a respectiva equação da recta e o coeficiente de determinação (R^2), assim como o desvio padrão de cada ponto.

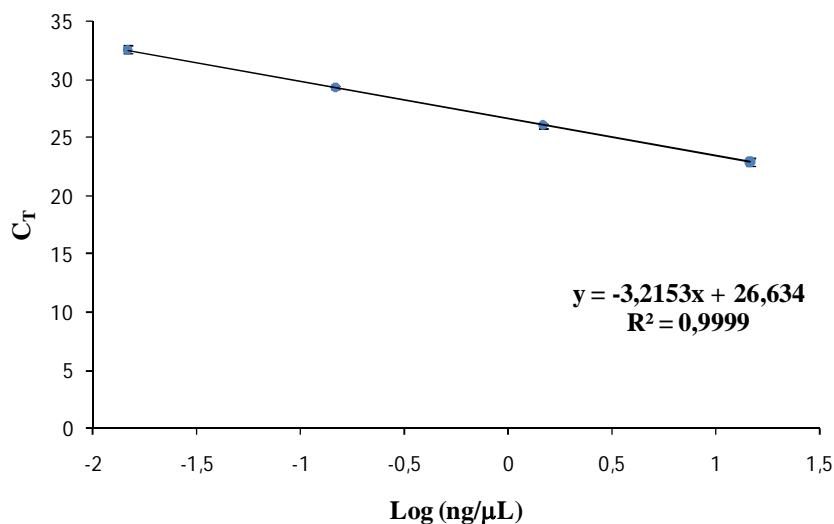


Figura 3.6. Recta padrão elaborada a partir de diluições seriadas da amostra controlo positivo de *T. annulata*. Os valores de C_T em cada ponto (diluição) correspondem à média dos valores obtidos em triplicados das reacções. É apresentada a respectiva equação da recta e o coeficiente de determinação (R^2), assim como o desvio padrão de cada ponto.

3.1.3. Análise de amostras de sangue de bovino

O sistema de PCR em tempo real implementado foi testado num total de 63 amostras de DNA extraído de sangue de bovinos. Estas amostras haviam sido previamente caracterizadas por PCR convencional para o *Tams1* e pela técnica de RLB (Soares, 2011), tendo sido determinado se estavam ou não infectadas com *Theileria annulata* ou qualquer outra espécie de *Theileria* ou de *Babesia*.

Na Tabela 3.1 estão apresentados os resultados obtidos para as 63 amostras testadas, as quais foram previamente divididas em cinco grupos (I-V), com base nos resultados de PCR convencional (região hiper-variável V4 do rDNA 18S) e correspondente teste de RLB. Em seguida, são caracterizados cada um dos cinco grupos:

- (I) - Amostras positivas para *Theileria annulata*, para as quais a região hiper-variável V4 do rDNA 18S foi amplificada por PCR, usando *primers* universais para espécies de *Theileria* e *Babesia*, e em que a presença do parasita foi demonstrada por RLB, com a hibridação reversa dos produtos com sondas específicas;
- (II) - Amostras consideradas positivas fracas para *T. annulata*, em que a amplificação por PCR da região V4 não resultou em banda visível num gel de electroforese mas que, mesmo assim, o parasita foi detectado por hibridação reversa com a respectiva sonda;
- (III) - Infecções mistas com *T. annulata*, correspondendo a amostras onde foi em simultâneo detectada *T. annulata* e outras espécies de *Theileria* e/ou *Babesia* por RLB;
- (IV) - Amostras com outros piroplasmas, encontrando-se infectadas com outras espécies de *Theileria* e/ou *Babesia* mas não com *T. annulata*;
- (V) - Amostras negativas para piroplasmas, para as quais não foi detectada infecção por nenhum dos géneros *Theileria* ou *Babesia*.

Tabela 3.1. Resultados da detecção molecular de *Theileria annulata* por PCR em tempo real em amostras de DNA extraídas de sangue de bovino previamente caracterizadas.

Grupo	Amostra	Região de origem	Detecção por RLB		PCR <i>Tams1</i> ³	PCR em tempo real ⁴	C _T
			PCR região V4 ¹	Espécies encontradas ²			
I	KPF1	Ourém	+	<i>T. annulata</i>	+	+	26,6
I	MCH5	Maфра	+	<i>T. annulata</i>	+	+	26,8
I	EAB3	Monforte	+	<i>T. annulata</i>	+	+	27,9
I	NWA1	Avis	+	<i>T. annulata</i>	+	+	28,3
I	MFC2	Cartaxo	+	<i>T. annulata</i>	-	+	28,5
I	NTH9	Alvito	+	<i>T. annulata</i>	+	+	29,4
I	MFF1	Castelo Branco	+	<i>T. annulata</i>	+	+	29,7
I	MJC11	Viana do Alentejo	+	<i>T. annulata</i>	+	+	29,7
I	KZA12	Alcácer do Sal	+	<i>T. annulata</i>	+	+	30,8
I	MCG11	Lourinhã	+	<i>T. annulata</i>	+	+	31,5
I	EDA1	Santiago do Cacém	+	<i>T. annulata</i>	+	+	33,5
I	EDE3	Montemor-o-Novo	+	<i>T. annulata</i>	+	+	33,8
I	GND10	Vila do Bispo	+	<i>T. annulata</i>	+	+	34,5
I	MCF8	Entroncamento	+	<i>T. annulata</i>	+	+	35,6
I	EEE4	S. Pedro do Sul	+	<i>T. annulata</i>	+	+	36,3
I	FAG1	Mértola	+	<i>T. annulata</i>	+	+	36,4
I	EDA12	Palmela	+	<i>T. annulata</i>	+	+	38,2
I	LPC1	Idanha a Nova	+	<i>T. annulata</i>	+	+	38,4
I	NGD11	Évora	+	<i>T. annulata</i>	+	+	38,7
I	MFC11	Portalegre	+	<i>T. annulata</i>	-	+	40,5
II	MFD5	Fundão	-	<i>T. annulata</i>	+	+	35,8
II	MFB11	Cartaxo	-	<i>T. annulata</i>	+	+	38,7
II	EEA6	Évora	-	<i>T. annulata</i>	+	+	41,2
II	MCE7	Rio Maior	-	<i>T. annulata</i>	-	+	41,6
II	EBA2	Coruche	-	<i>T. annulata</i>	-	+	41,9
II	EBD6	Campo Maior	-	<i>T. annulata</i>	-	-	*
II	EBD4	Campo Maior	-	<i>T. annulata</i>	-	-	n/a
II	NSF9	Chaves	-	<i>T. annulata</i>	-	-	n/a
II	KWE5	Viana do Alentejo	-	<i>T. annulata</i>	-	-	n/a
III	ECA6	Ourém	+	<i>T. buffeli</i> ; <i>T. annulata</i>	+	+	29,3
III	GVF1	Vila Pouca	+	<i>T. buffeli</i> ; <i>T. annulata</i>	+	+	39
III	GWB1	Campo Maior	+	<i>T. buffeli</i> ; <i>T. annulata</i>	+	+	39,7
III	EAD3	Coruche	+	<i>T. buffeli</i> ; <i>T. annulata</i>	+	+	40,1
III	MCD9	Santarém	+	<i>T. buffeli</i> ; <i>T. annulata</i>	-	-	n/a
III	NTD10	Montemor o Novo	+	<i>B. bigemina</i> ; <i>T. annulata</i>	+	+	37,3
III	MFG1	Portalegre	+	<i>B. bigemina</i> ; <i>T. annulata</i>	+	+	38,8
III	MF10	Idanha a Nova	+	<i>B. bigemina</i> ; <i>T. annulata</i>	-	+	39,8
III	NWC10	Avis	+	<i>B. bigemina</i> ; <i>T. annulata</i>	-	-	*
III	KMA4	Covilhã	+	<i>B. bigemina</i> ; <i>T. annulata</i>	-	-	n/a
III	MTD9	Maфра	+	<i>B. bigemina</i> ; <i>T. buffeli</i> ; <i>T. annulata</i>	+	+	36
III	GWC4	Ferreira do Zêzere	+	<i>B. bigemina</i> ; <i>T. buffeli</i> ; <i>T. annulata</i>	-	+	43,4
III	KIF8	Maфра	+	<i>B. bigemina</i> ; <i>T. buffeli</i> ; <i>T. annulata</i>	-	-	n/a
IV	NCH2	Gondomar	+	<i>T. buffeli</i>	-	-	*
IV	NCH4	Vila Verde	+	<i>T. buffeli</i>	-	-	*
IV	MRB4	Sines	+	<i>T. buffeli</i>	-	-	*
IV	KPD6	Ourém	+	<i>T. buffeli</i>	-	-	n/a
IV	KZB1	Alcácer do Sal	+	<i>T. buffeli</i>	-	-	n/a
IV	MRC9	Campo Maior	+	<i>T. buffeli</i>	-	-	n/a
IV	KMC9	Portalegre	+	<i>B. bigemina</i>	-	-	*
IV	KID5	Viana do Alentejo	+	<i>B. bigemina</i>	-	-	n/a
IV	MRF7	Montijo	+	<i>B. bigemina</i>	-	-	n/a
IV	MHE9	Benavente	+	<i>B. bigemina</i>	-	-	n/a
IV	GVE12	Vila Pouca	+	<i>B. bigemina</i>	-	-	n/a
V	GXH6	Coimbra	-	-	-	-	*
V	FRD5	Vila do Conde	-	-	-	-	*
V	FKD3	Redondo	-	-	-	-	*
V	MHA7	Castelo Branco	-	-	-	-	*
V	MCF7	Torres Vedras	-	-	-	-	n/a
V	NSF11	Chaves	-	-	-	-	n/a
V	KND6	Aljezur	-	-	-	-	n/a
V	MSE2	Sabugal	-	-	-	-	n/a
V	GFC8	Avis	-	-	-	-	n/a
V	FJE4	Santarém	-	-	-	-	n/a

¹Detecção (+) ou não detecção (-) de um fragmento de DNA com cerca de 431 pb em electroforese, correspondente à amplificação por PCR da região hiper-variável V4 do 18S rDNA; ²Espécies detectadas após hibridação dos produtos de PCR com sondas específicas da espécie; ³Detecção (+) ou não detecção (-) de um fragmento de DNA com cerca de 319 pb na electroforese, correspondente à amplificação parcial do gene *Tams1* de *T. annulata*; ⁴Detecção (+) ou não detecção (-) de um aumento de fluorescência correspondente à amplificação de gene *Tams1* por PCR em tempo real; *Amostras em que se registou alguma formação de dímeros de primers; n/a – não se aplica.

Analisando os resultados apresentados na Tabela 3.1 é possível determinar a especificidade e a sensibilidade das reacções de PCR em tempo real, usando a técnica de RLB como referência. Estes valores foram comparados com os da técnica de PCR convencional determinados previamente (Soares, 2011). Assim, observa-se que ambas as técnicas apresentaram uma especificidade de 100%, uma vez que não foi amplificado nenhum fragmento do gene *Tams1*, indicativo da presença de *T. annulata*, a partir das amostras negativas para este agente (grupos IV e V). Ao analisar amostras do Grupo I, que possuem infecções únicas de *T. annulata*, a sensibilidade da detecção de *T. annulata* por PCR convencional e PCR em tempo real foi de 90% e 100%, respectivamente. No entanto, a sensibilidade para amostras de DNA dos Grupos II e III, que representam amostras contendo uma menor quantidade de DNA alvo e amostras de infecções mistas, foi menor para ambas as técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real (33% e 56% para o Grupo II e 54% e 69% para o Grupo III, respectivamente). Globalmente, considerando todas as amostras dos Grupos I, II e III, as técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real apresentaram uma sensibilidade de 67% e de 81%, respectivamente, em relação à técnica de RLB.

No que diz respeito à quantificação das amostras, a amostra KPF1 foi a que apresentou o valor de C_T mais baixo (26,6), correspondendo assim à amostra com maior concentração de DNA alvo de todas as que foram analisadas. Utilizando a equação da recta padrão da Figura 3.5 é possível estimar a concentração de DNA alvo nesta amostra em cerca de 2132 cópias/ μL . Este valor corresponderá a uma parasitémia estimada de 0,02%, considerando o volume da amostra de sangue inicialmente usada para a extracção de DNA (200 μL), o volume total de solução de DNA obtida após os vários passos de extracção (150 μL) e que o sangue de bovino possui em média $7,5 \times 10^6$ eritrócitos por microlitro (Blood e Radostits, 1991) [Parasitémia = $\left(\frac{(2132 \times 150)}{200}\right) / (7,5 \times 10^6) \times 100$].

Em relação às curvas de dissociação observou-se uma predominância de valores de temperatura de desnaturação (T_m) dos fragmentos de DNA amplificados na ordem dos 81 °C, nomeadamente no controlo positivo (80,5 °C). Estes valores estão de acordo com a temperatura de desnaturação teórica, calculada pela seguinte equação (Howley *et al.*, 1979; Marmur e Doty, 1962):

$$T_m = 64,9^\circ\text{C} + 41^\circ\text{C} \times \left(\frac{\text{número de G's e C's na sequência} - 16,4}{N} \right)$$

N - Tamanho da sequência

Nº de Guaninas = 64

Nº de Citosinas = 70

Tamanho do fragmento amplificado = 319 pb

$$T_m = 64,9^\circ\text{C} + 41^\circ\text{C} \times \left(\frac{64 + 70 - 16,4}{319} \right)$$

$$T_m = 80^\circ\text{C}$$

3.1.4. Identificação de polimorfismos no gene *Tams1*

A análise das curvas de dissociação permitiu verificar que as temperaturas de desnaturação (T_m) dos fragmentos amplificados por PCR em tempo real a partir de diferentes amostras apresentavam variações (Figura 3.7), evidenciando a existência de polimorfismos neste gene. Na Figura 3.8 apresenta-se a distribuição das temperaturas de desnaturação obtidas para os fragmentos do gene *Tams1* amplificados a partir de amostras dos Grupos I, II e III, verificando-se que a temperatura de 81 °C é o valor predominante nas temperaturas registradas cuja amostragem tem uma aparente distribuição normal.

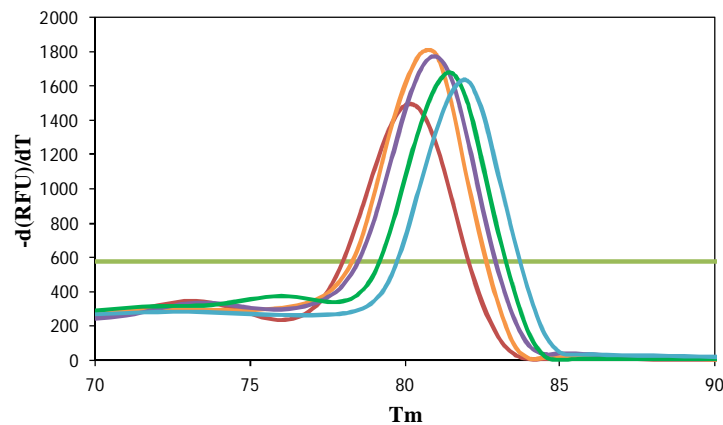


Figura 3.7. Exemplos de curvas de dissociação do fragmento do gene *tams1* amplificado por PCR em tempo real a partir de diferentes amostras. Amostras usadas: (—) NWA1 (80 °C); (—) EEE4 (80,5 °C); (—) MFD5 (81 °C); (—) NGD11 (81,5 °C); (—) FAG1 (82 °C). $-d(RFU)/dT$ – Regressão negativa da fluorescência em relação à temperatura; T_m – temperatura de desnaturação.

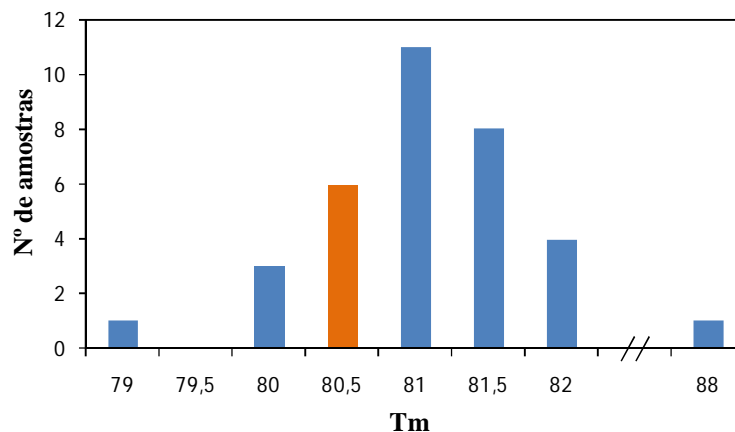


Figura 3.8. Distribuição das temperaturas de desnaturação (T_m) dos produtos do gene *Tams1* amplificados por PCR em tempo real, obtidas do total das 35 amostras positivas para *T. annulata*. A barra a laranja corresponde à temperatura de desnaturação obtida para a amostra do controle positivo.

3.2. Detecção de *Theileria annulata* por LAMP

3.2.1. Desenho dos *Primers*

Foram desenhados inicialmente dois conjuntos de *primers* LAMP para o gene *Tams1* (SET_1 e SET_2) (Figura 3.9), contudo estes conjuntos não permitiram detectar este gene em nenhuma das amostras comprovadamente infectadas com *T. annulata*, incluindo a amostra controlo positivo (Figura 3.10). Estes *primers* apresentaram-se pouco eficazes, com um limite de detecção bastante deficiente, tendo-se revelado funcionais apenas para a amplificação de grandes quantidades de DNA alvo, nomeadamente proveniente de alíquotas de produtos de PCR do gene *Tams1*, previamente amplificados a partir de uma amostra controlo positivo com os respectivos *primers* externos (F3/B3) (Figura 3.10).

```
1 TAAATCGCTCACTAGTCTGCCCTTTCTTATCTTTTTATAATATAATTATTTGAGATGTTGTCCAGGACCAC
72 CCTCAAGTTCTTATATTTGAGCTTCTTCGTTATCTCATCCGTTAATGCTGCAAATGAGGATGAAAAGAAAA
143 AGGAGGAAAAAAGATGTTGTTCTTGATGTTACTCTCACTTCATGTGAGAATGTAACCTTTAAAAACGTC
214 GACTCTAACACCACTGAGTTAACTGTGCGGATGGCTACCGTTTCAAGA F2_1
F3_1
285 CTTGTTCAATGTTGACACCTCAAACATAACC F1_1
B1c_1
356 GGTTCAGACTTAATCTTACCCTGCCAGCCAAA B2c_1
B3c_1
427 B2c_1 B3c_1
GTCAAATTCGAGACCTACTACGATGATGCTTGTTC AAGGGAAAATCCGCCAAGGAAGTAGATGCTTCCAA
498 GTTCGAAGATACATCTTTGTTACCTCCTCCGCCTTCGGCACTGGAAAGATGTACACCTTTAAAAAGGAAT
569 TTAAACCTTCCAAAGTCACCTTCGACAAGAAAGAAGTCGAAAAACCAAACAATGCCAAGTATCTTGAAGTT
640 GTTGTTTTTGTGGTTCTGATTCCAAGAAGTTCGTCAAACCTCTACTACT F3_2
F2_2 F1_2
711 GAAGGAGACCTACTTCC F2_2 F1_2
B1c_2
782 TGAATGCCATGAACTCATCCTGGTCAACCGATTACAAACCAGTTGT B1c_2
B2c_2 B3c_2
853 B2c_2 B3c_2
TTCGCCTCAGTACTCATCGTCTTCTCATCAGTCCTTTACTTCCTTTAAAACCCATGTTTCGTAACAAC TTAT
924 CAACTTTTAAAAACAATTTGATAATTTGTATACAATTGCAGAACTAAATAACTAGCTTAAGTCATTATAT
995 GCCACTTAATTTTATACTTT
```

Figura 3.9. Sequência ilustrativa da região alvo do gene *Tams1* de *T. annulata* com a indicação da localização da região complementar dos segmentos (F1, F2, F3, B1, B2 e B3), com base nos quais foram desenhados os conjuntos de *primers* SET_1 (←) e SET_2 (→) para LAMP. Sequência usada na figura tem o número de acesso U22887 na base de dados NCBI-GenBank.

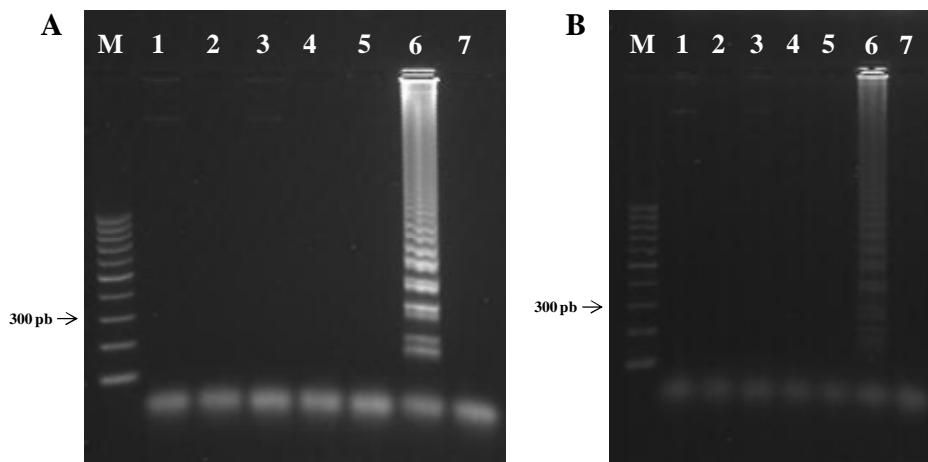


Figura 3.10. Exemplo de géis de electroforese obtidos correspondentes a reacções LAMP utilizando os conjuntos de *primers* SET_1 (A) e SET_2 (B). Amostras: Controlo Positivo diluído 1:10 (1) e 1:1000 (2); Amostras MFB9 (3), EAC2 (4) e EAB6 (5); produtos de PCR do gene *Tams1* amplificados com os respectivos *primers* externos de cada conjunto (6); Controlo Negativo (7). (M) Marcador de pesos moleculares *Log Scale 100 bp DNA Ladder* (Jena Bioscience).

O conjunto SET_1 foi redesenhado, com vista ao melhoramento da sua eficiência de amplificação, obtendo-se o novo conjunto SET_1New (Figura 3.11). Foi ainda desenhado um novo conjunto alternativo, com alvos complementares para o gene rDNA 18S (SET_18S), igualmente específico para *T. annulata* (Figura 3.12).

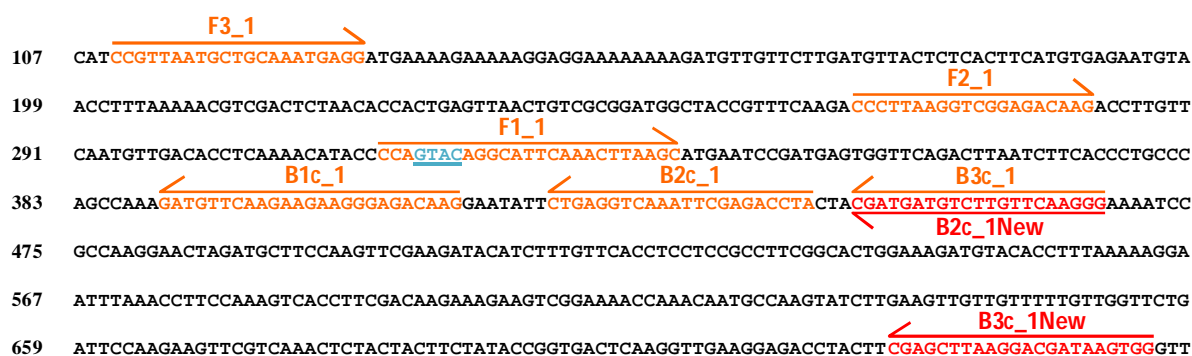


Figura 3.11. Sequência ilustrativa da região alvo do gene *Tams1* de *T. annulata* com a indicação da localização da região complementar dos segmentos (F1, F2, F3, B1, B2 e B3), com base nos quais foi desenhado o conjunto de *primers* SET_1New. É indicada a versão do SET_1 (—) e a respectiva reformulação, com a substituição dos segmentos B2c_1 e B3c_1 pelos novos segmentos B2c_1New e B3c_1New (—). Está também assinalado na sequência, a azul e sublinhado, o local alvo da enzima de restrição *RsaI*.

```

1   CCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACGGGGCTTAAAGTCTTGTAATTGGAAT
64  GATGGGAATTTAAACCTCTTCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCG
127 GTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTT
190 CTGCTGCATTGCTTGTGTCCCTCTGGGGTCTGTGCATGTGGCTTTTTTTCGGACGGAGTTTCTT
253 TGTCTGAATGTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTCAAAGCAGGCTTTTCGCCTTGAATAGTTT
316 AGCATGGAATAATAAAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTGGTTTTAGGTACCAAAGTAATGG
379 TTAATAGGAACAGTTGGGGGCATTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATT

```

F3_18S
 F2_18S
 F1_18S
 B1c_18S
 B2c_18S
 B3c_18S

Figura 3.12. Sequência ilustrativa da região alvo do gene rDNA 18S de *T. annulata* com a indicação da localização da região complementar dos segmentos (F1, F2, F3, B1, B2 e B3), com base nos quais foi desenhado o conjunto de *primers* SET_18S (—). Sequência usada na figura tem o número de acesso EU083800 na base de dados NCBI-GenBank.

Os novos conjuntos SET_1New e SET_18S foram testados usando as mesmas amostras de DNA alvo, observando-se amplificação na maioria das amostras testadas para ambos os conjuntos (Figura 3.13).

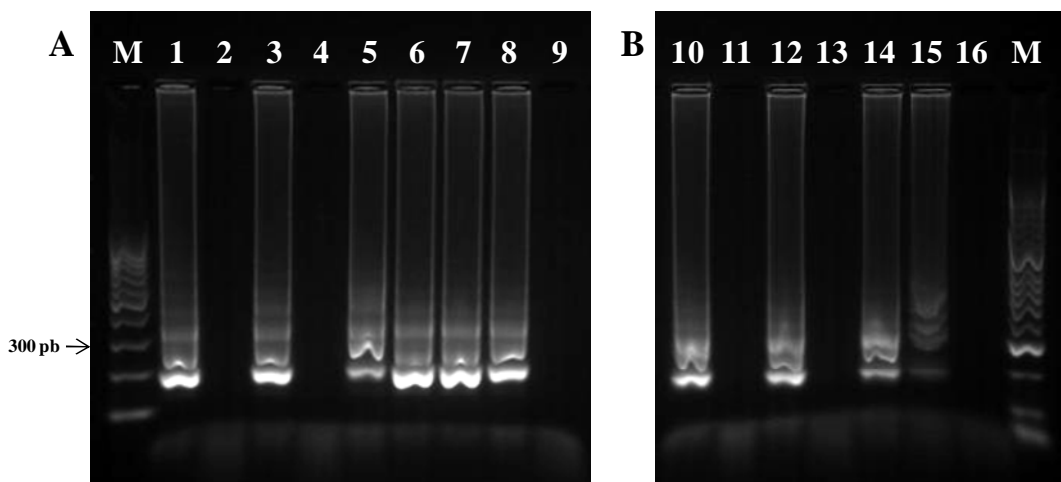


Figura 3.13. Exemplo de géis de electroforese obtidos correspondentes a reacções LAMP utilizando os conjuntos de *primers* SET_1New (A) e SET_18S (B). Amostras: Controlo Positivo diluído 1:10 (1, 10) e 1:1000 (2, 11); Amostras MFB9 (3, 12), EAC2 (4, 13) e EAB6 (5, 14); produtos de PCR do gene *Tamsl* amplificados com o par F3_1/B3c_1New (6) e de acordo com Gubbels *et al.* (2000b) (7); Amostra de DNA extraído de sangue de bovino 8182 (8, 15); Controlo Negativo (9, 16). (M) Marcador de pesos moleculares *Log Scale 100 bp DNA Ladder* (Jena Bioscience).

3.2.2. Limite de detecção e especificidade

O limite de detecção das reacções LAMP com os conjuntos SET_1New e SET_18S foi determinado utilizando como molde diluições seriadas de produtos de PCR purificados do gene *Tams1* e do rDNA 18S (secção 2.6) (Figura 3.14). O conjunto SET_1New conseguiu amplificar até à diluição 10^{-6} (com cerca de $1,23 \times 10^5$ cópias de DNA alvo por microlitro) enquanto o SET_18S amplificou até à diluição 10^{-5} (com cerca de $1,95 \times 10^6$ cópias/ μL) (Figura 3.14). Verificou-se assim que o primeiro conjunto é 10 vezes mais eficiente que o segundo, pelo que se utilizou esse conjunto SET_1New para as restantes experiências. Foi também testada a especificidade deste conjunto de *primers* em relação a outras espécies de piroplasmas do género *Babesia* frequentes em bovinos, verificando-se a ocorrência de amplificação apenas em amostras contendo *T. annulata* (Figura 3.15). A correcta identidade do fragmento amplificado foi comprovada pela sua restrição com a enzima *RsaI* (Figura 3.15), cuja região alvo na sequência se encontra assinala na Figura 3.11.

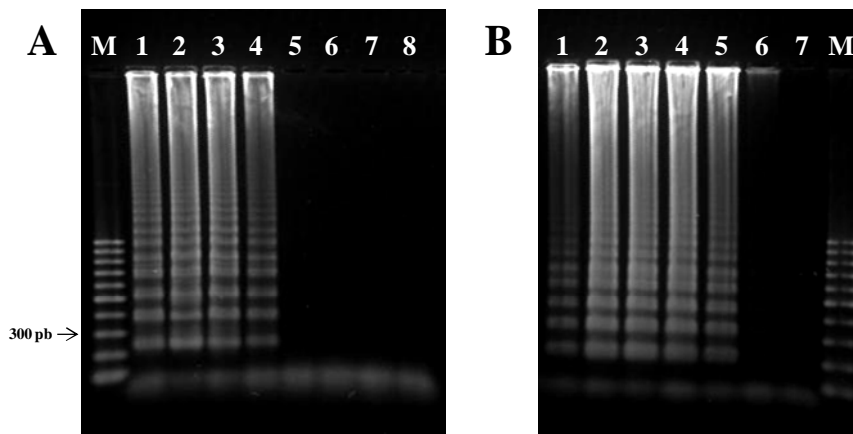


Figura 3.14. Determinação do limite de detecção dos conjuntos de *primers* SET_1New (A) e SET_18S (B), utilizando como molde diluições de produtos de PCR purificados do gene *Tams1* e rDNA 18S. Colunas no gel A: Amostra controlo positivo diluída 1:10 (1); Produtos de PCR do gene *Tams1* diluídos 10^0 (2), 10^{-2} (3), 10^{-6} (4), 10^{-9} (5), 10^{-10} (6) e 10^{-11} (7); Controlo negativo (8). Colunas no gel B: Amostra controlo positivo diluída 1:10 (1); Produtos de PCR do rDNA 18S diluídos 10^{-2} (2), 10^{-3} (3), 10^{-4} (4), 10^{-5} (5) e 10^{-6} (6); Controlo negativo (7). (M) Marcador de pesos moleculares *Log Scale 100 bp DNA Ladder* (Jena Bioscience).

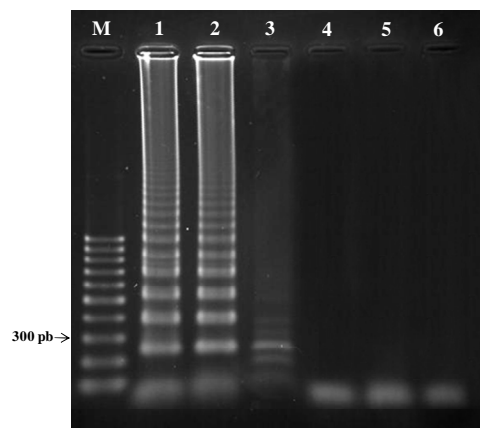


Figura 3.15. Ilustração da especificidade do conjunto SET_1New. Amostras: Controlo Positivo 1:10 (1); Produtos de PCR do gene *Tams1* diluídos 10^{-5} (2); Restrição enzimática da amostra do poço 2 com *RsaI* (3); Amostra com DNA de *Babesia bigemina* (4) e de *B. bovis* (5); Controlo Negativo (6). (M) Marcador de pesos moleculares *Log Scale 100 bp DNA Ladder* (Jena Bioscience).

3.2.3. Optimizaç o das reac es

Apesar das reac es LAMP serem realizadas em condi es reac onais relativamente estandardizadas, usadas normalmente nos testes preliminares de amplifica o com novos *primers*, foram realizadas neste trabalho algumas experi ncias no sentido de averiguar se a utiliza o de outras condi es poderiam melhorar a sua efici ncia. O conjunto de *primers* SET_1New foi testado em reac es de amplifica o em que se compararam os par metros i) tempo da reac o, ii) necessidade de desnatura o pr via do DNA molde e iii) concentra es de alguns componentes da mistura reac onal, nomeadamente as concentra es de dNTPs, da polimerase *Bst* e dos *primers* externos (F3_1 e B3_1New). Na Figura 3.16 est o apresentados os resultados obtidos nas reac es de amplifica o referentes   necessidade de desnatura o pr via das amostras e   influ ncia do tempo de reac o na amplifica o.

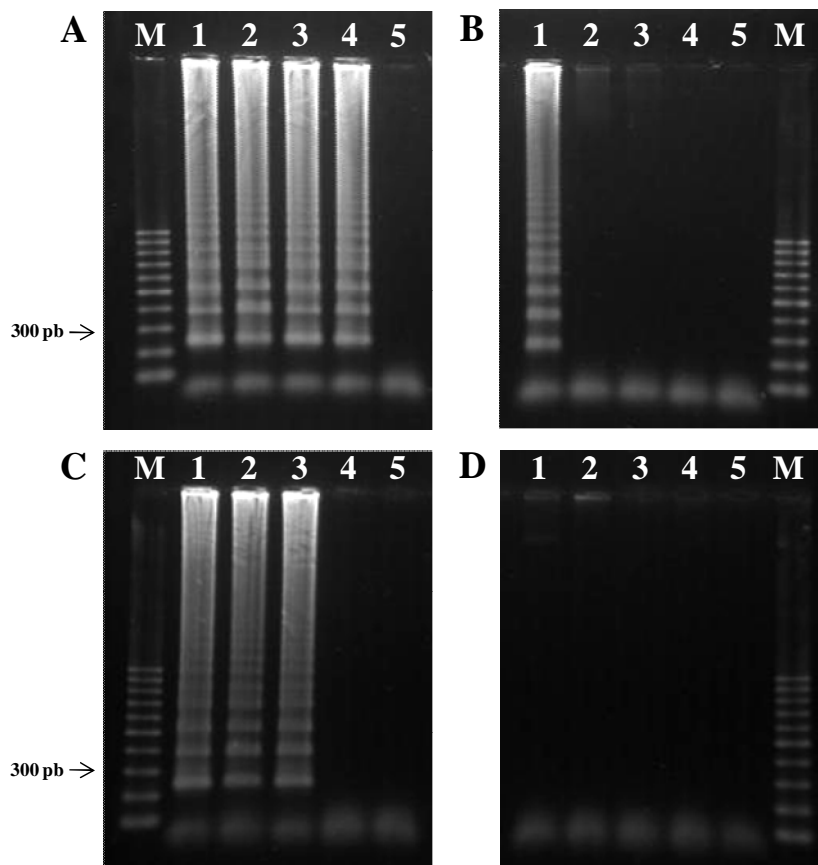


Figura 3.16. G is de electroforese representativos de reac es LAMP usando o conjunto SET_1New. G is representativos de reac es LAMP com a dura o de 1:30h (**A** e **C**) e 1:00h (**B** e **D**). As reac es representadas nos g is **A** e **B** foram realizadas com DNA molde previamente desnaturado. Nas reac es representadas nos g is **C** e **D** o DNA molde n o foi previamente desnaturado. As amostras usadas foram as seguintes: Controlo Positivo dilu do 1:10 (**1**); Amostra MFB9 (**2**); Produtos de PCR do gene *Tams1* purificados e dilu dos 10^{-5} (**3**), 10^{-6} (**4**) e 10^{-7} (**5**). (**M**) Marcador de pesos moleculares *Log Scale 100 bp DNA Ladder (Jena Bioscience)*.

Pela análise dos resultados obtidos verifica-se que a eliminação do passo prévio de desnaturação das amostras, que se faz a 95 °C durante 10 minutos, resulta numa diminuição do limite de detecção dos produtos amplificados numa ordem de base 10 (Figura 3.16C). A redução do tempo de reacção para 1:00h resulta também na ausência da detecção de amplificação para a maioria das amostras (Figura 3.16B). Verificou-se também que a diminuição da concentração de dNTPs na mistura reaccional de LAMP levou à ausência completa de resultados de amplificação em todas as amostras usadas (Figura 3.17).

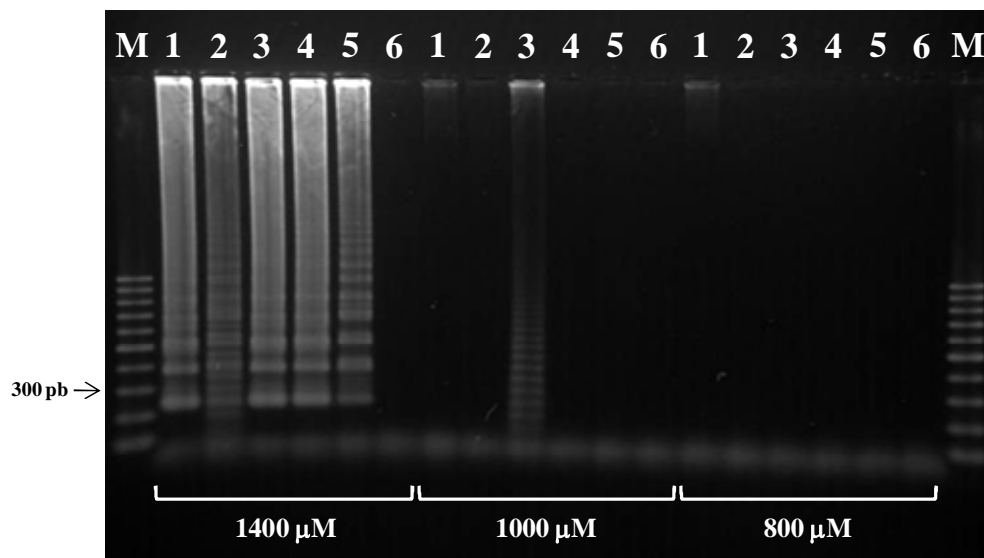


Figura 3.17. Reacções LAMP na presença de diferentes concentrações de dNTPs (indicadas na figura). As amostras usadas são as seguintes: Controlo Positivo diluído 1:10 (1); Amostra EAB6 (2); Produtos de PCR do gene *TamsI* purificados diluídos 10^{-5} (3), 10^{-6} (4) e 10^{-7} (5); (6) Controlo Negativo. (M) Marcador de pesos moleculares *Log Scale 100 bp DNA Ladder* (Jena Bioscience).

O aumento da concentração dos *primers* (para o dobro da normalmente usada) e da concentração da polimerase *Bst* na mistura reaccional também não resultaram numa melhoria da eficiência da amplificação LAMP (resultados não apresentados). Por último, verificou-se que as reacções de amplificação não são influenciadas pela fonte de calor utilizada para incubar a mistura reaccional a temperaturas entre 60 e 65 °C já que os resultados de amplificação foram semelhantes, quer se utilize um banho de água termostaticado ou um termobloco/termociclador.

3.2.4. Análise de amostras de DNA extraídas de sangue de bovino

Foram seleccionadas 18 amostras de DNA total extraídas de sangue de bovinos, para serem testadas com a técnica LAMP (Tabela 3.2). Verifica-se que esta técnica consegue detectar *T. annulata* em amostras contendo uma concentração de pelo menos 800 - 1600 cópias de DNA alvo por microlitro (de acordo com a estimativa feita por PCR em tempo real, correspondendo a um C_T na ordem dos 27 - 28 ciclos e usando a recta padrão representada na Figura 3.5). Recorrendo à expressão descrita anteriormente na Secção 3.1.3 estes valores corresponderiam a parasitémias estimadas de 0,008 – 0,016 %. Estes valores de concentração registados são inferiores aos obtidos aquando da determinação do limite de detecção da reacção LAMP, com o conjunto de *primers* SET1_New, com base no teste de diluições de produtos de PCR do gene alvo (Secção 3.2.2).

Tabela 3.2. Resultados da detecção molecular de *Theileria annulata* por LAMP em amostras de DNA extraídas de sangue de bovino previamente caracterizadas

Amostra	Região de origem	Detecção por RLB		PCR Tams1 ³	PCR em tempo real ⁴	C _T	LAMP ⁵
		PCR região V4 ¹	Espécies encontradas ²				
GNB8	Évora	+	<i>T. annulata</i>	+	+	24,6	+
NWD4	Avis	+	<i>T. annulata</i>	+	+	24,9	+
PCC10	Mora	+	<i>T. annulata</i>	+	+	26,3	+
PBE10	Borba	+	<i>T. annulata</i>	+	+	27,1	+
EEB6	Montemor-o-Novo	+	<i>T. annulata</i>	+	+	27,6	+
GWC10	Ferreira do Zêzere	+	<i>T. annulata</i>	+	+	28,6	-
MJD8	Montemor-o-Novo	+	<i>T. annulata</i>	+	+	29,1	+
PBE4	Borba	+	<i>T. annulata</i>	+	+	29,2	-
6066	Alandroal	n/a	n/a	+	+	23,6	+
8182	Benavente	n/a	n/a	+	+	25,1	+
3406	Alandroal	n/a	n/a	+	+	25,3	+
3008	Benavente	n/a	n/a	+	+	25,9	+
3340	Alandroal	n/a	n/a	+	+	26,7	+
1196	Benavente	n/a	n/a	+	+	27,1	+
7900	Benavente	n/a	n/a	+	+	27,4	+
6045	Benavente	n/a	n/a	+	+	33,0	-
3395	Alandroal	n/a	n/a	+	+	35,4	-
0431	Alandroal	n/a	n/a	-	-	44,2	-

¹Detecção (+) ou não detecção (-) de um fragmento de DNA com cerca de 431 pb em electroforese, correspondente à amplificação por PCR da região hiper-variável V4 do rDNA 18S; ²Espécies detectadas após hibridação de produtos de PCR com sondas específicas de espécie; ³Detecção (+) ou não detecção (-) de um fragmento de DNA com cerca de 319 pb e electroforese, correspondente à amplificação parcial do gene *Tams1* de *Theileria annulata*; ⁴Detecção (+) ou não detecção (-) de um aumento de fluorescência correspondente à amplificação parcial do gene *Tams1* por PCR em tempo real; ⁵Detecção (+) ou não detecção (-) de um padrão tipo escada em gel de electroforese; n/a – não se aplica. As amostras de DNA indicadas nas primeiras oito linhas da tabela foram extraídas com o sistema automatizado *Biosprint*[®]96 (Qiagen) e as restantes com o sistema comercial *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche).

3.3 Comparação dos limites de detecção das técnicas usadas

Integrando a globalidade dos resultados obtidos foi possível elaborar um esquema resumo dos intervalos de detecção das diferentes técnicas usadas neste trabalho, usando como referência os valores de C_T obtidos nas reacções de PCR em tempo real (que serão directamente proporcionais à quantidade de DNA alvo presente nas amostras) (Figura 3.18). Verificou-se então que a técnica de RLB, utilizada neste trabalho como técnica *gold-standard*, permite detectar *T. annulata* em amostras com quantidades muitíssimo baixas de DNA alvo, incluindo amostras com valores de C_T superiores a 43. A técnica de

PCR em tempo real surge em seguida, com um limite de detecção correspondente a valores de C_T até 43 (cerca de 0,03 cópias de DNA alvo por microlitro de amostra). A técnica de PCR convencional revela conseguir detectar *T. annulata* em amostras com valores de C_T até 40 (cerca de 0,2 cópias/ μ L). Por último, a técnica LAMP apresentou-se como a menos eficiente, detectando *T. annulata* em amostras com valores de C_T até 28 (ver 3.2.4).

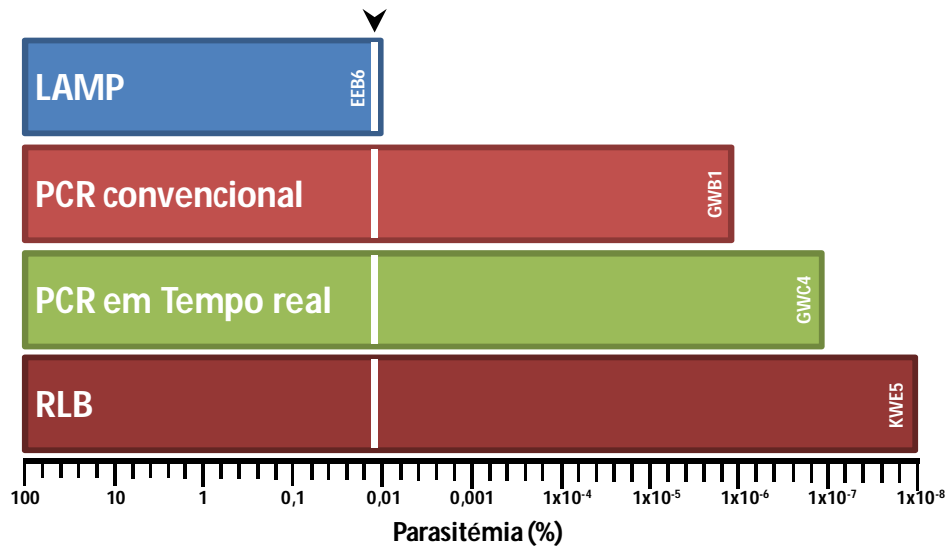


Figura 3.18. Esquema resumo dos intervalos de detecção das diferentes técnicas usadas neste trabalho, usando como referência valores estimados de parasitemia, utilizando a recta padrão da Figura 3.5 e a expressão descrita na Secção 3.1.3. Estão assinaladas as amostras usadas para definir o limite de detecção de cada uma das técnicas: EEB6 (0,01 %); GWB1 ($2,8 \times 10^{-6}$ %); GWC4 ($2,2 \times 10^{-7}$ %); KWE5 ($\leq 1 \times 10^{-8}$ %). O valor de parasitemia da amostra 8182 (0,024 %) encontra-se evidenciado pela seta.

Foi estimada uma concentração de cerca de 5900 cópias de DNA alvo por microlitro na amostra 8182 (correspondente a um valor de C_T de 25,1 obtido na respectiva reacção de PCR em tempo real e usando a recta padrão da Figura 3.5). Utilizando a expressão descrita anteriormente na Secção 3.1.3, e se tivermos em consideração que esta amostra proveio de um volume total de 150 μ L, extraído de 500 μ L de sangue, e que um microlitro de sangue de bovino contém em média $7,5 \times 10^6$ eritrócitos, estima-se um valor de cerca de 0,024% de parasitemia para esta amostra. Na análise microscópica de esfregaços de sangue da qual a amostra 8182 foi extraída, foram observados um total de cerca de 10000 eritrócitos, tendo-se identificado apenas três piroplasmas, o que corresponde a uma parasitemia observada de 0,03%. O valor da parasitemia desta amostra estimado pela técnica de PCR em tempo real revela-se assim semelhante ao determinado por análise microscópica.

4. Discussão

A detecção de *Theileria annulata* consiste habitualmente na sua identificação em esfregaços de sangue ao microscópio, técnica essa que carece em sensibilidade na análise de amostras com baixas parasitémias, e em especificidade, devido à dificuldade na sua distinção com outras espécies (Aktas *et al.*, 2005; d'Oliveira *et al.*, 1995; Norval *et al.*, 1992). Por estas razões neste trabalho foi implementado um protocolo de PCR em tempo real para detectar *T. annulata*, em amostras de DNA extraídas de sangue de bovino, que demonstrou maior sensibilidade e especificidade. Foi igualmente desenvolvido um protocolo de amplificação isotérmica LAMP para a detecção de *T. annulata* para o mesmo tipo de amostras, que se provou ser eficaz na identificação de amostras com baixas parasitémias.

A implementação do ensaio de PCR em tempo real teve por base um conjunto de *primers* específicos para *T. annulata*, anteriormente desenvolvido por Soares (2011), com alvos complementares no gene *Tams1*. A sequência nucleotídica deste gene, específica deste parasita, apresenta diferenças significativas em relação às sequências correspondentes a genes homólogos noutras espécies do género *Theileria* (Gubbels *et al.*, 2000b). A concentração dos *primers* utilizados na mistura reaccional foi optimizada, uma vez que as concentrações usadas inicialmente por Soares (2011) em reacções de PCR convencional originam uma formação exacerbada de dímeros, dificultando a leitura dos resultados nas reacções de PCR em tempo real com a química *Evagreen*[®] (Biorad). A formação destes dímeros é detectada, na técnica de PCR em tempo real, pela análise das curvas de dissociação dos fragmentos amplificados, pelo aparecimento de picos adicionais nos gráficos, surgindo com uma temperatura de desnaturação inferior à do fragmento alvo (~ 73 °C). Determinou-se assim, que uma concentração de 300 nM e 150 nM para os *primers* *Tams1_forw* e *Tams1_rev*, respectivamente, permitiu diminuir consideravelmente a formação de dímeros, mantendo-se no entanto bons sinais de amplificação dos fragmentos específicos.

O limite de detecção da reacção de PCR em tempo real, após optimização, foi determinado em cerca de 1,23 cópias da região-alvo *Tams1* por microlitro de amostra (a partir de produtos de PCR). Ambas as rectas padrão elaboradas neste trabalho, utilizando como molde diluições seriadas de uma amostra controlo positivo e produtos de PCR purificados da região alvo, permitiram aferir que a eficiência da reacção de PCR em tempo real se encontra dentro do intervalo aconselhado (90 - 110%), confirmando que na fase exponencial da amplificação existe a duplicação a cada ciclo do número de produtos de PCR formados.

A técnica de PCR em tempo real possibilita quantificar a concentração de DNA alvo nas amostras e, conseqüentemente, estimar parasitémias. Foi estimado com esta técnica que a amostra 8182 contém 5900 cópias de DNA alvo por microlitro. Esta concentração de DNA alvo corresponde a uma parasitémia de 0,03% determinada por microscopia. Deste modo, sendo o limite de detecção do PCR em tempo real de pelo menos 1,23 cópias/μL (cerca de 4800 vezes menos do que o encontrado na

amostra 8182), aplicando a mesma proporção, podemos esperar detectar parasitémias tão baixas como 0,000006% (= 0,03%/4800) com esta técnica. De todos os registos existentes na literatura somente três artigos apresentam trabalhos em que é aplicado o método de PCR em tempo real a espécies de *Theileria*, sendo que a metodologia aplicada se baseia em sondas TaqMan. Nestes trabalhos são identificados limites de detecção de parasitémias nas ordens de 0,0009% para *T. parva* (Sibeko *et al.*, 2008), 0,0002% para *T. equi* (Bhooma *et al.*, 2010) e 0,00005% para *T. sergenti* (Jeong *et al.*, 2003). Considerando estes dados, o protocolo de PCR em tempo real utilizando a química *Evagreen*[®] parece apresentar um limite de detecção superior aos já existentes para outras espécies do género *Theileria* utilizando sondas TaqMan, podendo ser uma alternativa viável e mais barata na detecção de membros deste género.

A técnica de PCR em tempo real implementada revelou-se superior ao PCR convencional na detecção de *T. annulata* em amostras de DNA extraídas de sangue de bovino. A especificidade da reacção foi determinada em 100%. A sensibilidade total foi determinada em 81%. No entanto, a sensibilidade encontrada tendo em conta a detecção do agente apenas em amostras do Grupo I, que possuem infecções únicas de *T. annulata*, foi de 100%. Em amostras de DNA dos Grupos II e III verificou-se uma menor sensibilidade da técnica, com valores na ordem dos 56% e 69%, respectivamente. Estes grupos correspondem a amostras contendo uma menor quantidade de DNA alvo de *T. annulata* (Grupo II) e infecções mistas (Grupo III). No entanto, as amostras representativas destes dois grupos corresponderão a uma minoria daquelas que chegam normalmente a um laboratório de diagnóstico veterinário para análise (~ 5%) (Gomes *et al.* Resultados não publicados).

A análise das curvas de dissociação dos fragmentos amplificados por PCR em tempo real permitiu não só confirmar a sua identidade mas também verificar a ocorrência de alguma variabilidade nas temperaturas de desnaturação de diferentes amostras. Isto evidencia o carácter polimórfico da região amplificada do gene *Tams1* observada também noutros estudos (Gubbels *et al.*, 2000b; Weir *et al.*, 2007). No entanto, não foi observada nestes estudos nenhuma associação de determinados polimorfismos com a distribuição geográfica das amostras. Gubbels e colegas (2000a) sugerem que o gene *Tams1* seja constituído por “blocos” ou “domínios”, sendo essas porções do gene trocadas em processos de recombinação aquando da reprodução sexuada que se pensa existir nos parasitas dentro da carraça, originando os vários polimorfismos observados.

Os métodos de diagnóstico baseados em PCR em tempo real são considerados bastante específicos e sensíveis mas, no entanto, requerem a utilização de equipamentos sofisticados, reagentes dispendiosos e pessoal técnico qualificado para a sua execução. Neste trabalho foi também otimizada a técnica de amplificação isotérmica LAMP para a detecção de *T. annulata* em amostras de sangue de bovino. Esta técnica possibilita a amplificação específica de ácidos nucleicos a uma mesma temperatura reaccional, não estando por isso dependente da utilização de equipamentos sofisticados, como os termocicladores. É assim passível de mais facilmente vir a ser integrada em dispositivos de diagnóstico molecular para utilização em laboratórios e regiões com menores recursos.

A técnica LAMP foi usada num estudo recente para detectar *T. annulata*, usando como alvo genómico sequências pouco conhecidas de proteínas hipotéticas (Salih *et al.*, 2008). Neste trabalho decidiu-se implementar a técnica LAMP para este parasita, mas desenhando novos conjuntos de *primers* com regiões alvo no gene *Tams1*, específico de *T. annulata*, e no gene rDNA 18S. Estes genes são muito estudados e existem bastantes sequências disponíveis em bases de dados públicas, tornando-se assim opções mais seguras e robustas para o desenho de *primers* específicos do parasita. É de realçar, no entanto, que nem todos os *primers* LAMP que se desenham são eficientes, o que também se verificou neste trabalho. Os primeiros conjuntos de *primers* desenhados, denominados SET_1 e SET_2, mostraram-se ineficazes na amplificação das respectivas regiões alvo do gene *Tams1* de *T. annulata*. Existem aliás na literatura sugestões contraditórias por parte de vários autores sobre as características a que devem obedecer no desenho deste tipo de *primers*, nomeadamente relativas às distâncias recomendadas entre as várias regiões alvo complementares, o que poderá contribuir para o insucesso de muitos deles. Estas contradições são inclusivamente encontradas na própria empresa que detém a patente da tecnologia. Por exemplo, no seu *LoopAmp Eiken Genome website* (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/index.html>) é sugerido que a distância entre as extremidades 5' da região F2 e 3' da região F1 deve situar-se entre as 40 e as 60 bases. Mas no manual de instruções do programa *Primer Explorer V4* (<http://primerexplorer.jp/e/>), disponível na sua página, muito referenciado na maioria das publicações existentes sobre LAMP, essa mesma distância é antes sugerida para a região entre 5' de F2 e 5' de F1. Estas discrepâncias poderão ter origem no facto de que no artigo original onde a técnica LAMP foi descrita (Notomi *et al.*, 2000) a descrição desta distância torna-se um pouco confusa, levando a diferentes interpretações que são depois propagadas por autores diferentes. Da revisão bibliográfica efectuada (Tanaka *et al.*, 2010), e do teste dos vários conjuntos de *primers* desenhados neste trabalho, sugerimos que o intervalo mais adequado para a distância entre as extremidades 5' da região F2 e 5' da região F1, para o desenho dos *primers* FIP, deve situar-se entre as 40 e as 60 bases (o mesmo para os *primers* BIP). Foram desenhados dois novos conjuntos de *primers* LAMP mais eficientes, com base nestas distâncias, denominados SET_1New e SET_18S, com alvos complementares no gene *Tams1* e rDNA 18S, respectivamente. O conjunto de *primers* SET_1New revelou-se mais eficiente, com um melhor limite de detecção, tendo sido seleccionado para testar amostras de campo após optimização das reacções. É de realçar que a técnica LAMP requer normalmente a utilização de concentrações extremamente elevadas de dNTPs (na ordem dos 1400 µM), embora alguns autores afirmem ter utilizado concentrações bastante inferiores nos seus sistemas de detecção de espécies de *Theileria* usando LAMP, na ordem dos 125 µM (Salih *et al.*, 2008; Salih *et al.*, 2011), o que não conseguimos de todo confirmar neste trabalho.

A técnica LAMP foi testada com amostras de DNA extraídas de sangue de bovino. Verifica-se que esta técnica consegue detectar *T. annulata* em amostras contendo uma concentração de pelo menos 800 – 1600 cópias de DNA alvo por microlitro (de acordo com a estimativa feita por PCR em tempo real, correspondendo a um C_T na ordem dos 27 – 28). Estes valores de concentração são

inferiores aos obtidos aquando da determinação do limite de detecção da reacção LAMP, com o conjunto de *primers* SET1_New, com base no teste de diluições de produtos de PCR do gene alvo (cerca de $1,23 \times 10^5$ cópias de DNA alvo por microlitro). Não encontramos uma explicação óbvia para esta discrepância, à parte talvez da potencial degradação acentuada das diluições dos produtos de PCR purificados do gene *Tams1*, entre a altura em que foi obtida a recta padrão de PCR em tempo real e a sua utilização posterior para determinar o limite de detecção da técnica LAMP. Esta questão terá de ser esclarecida futuramente com a repetição destas experiências.

Neste trabalho foi evidenciado que a técnica de RLB apresenta a maior sensibilidade, sendo capaz de detectar amostras com baixíssimas quantidades de DNA, sinónimo de cargas parasitárias muito baixas. A segunda técnica mais sensível corresponde à técnica de PCR em tempo real, seguida pela técnica de PCR convencional. A técnica LAMP revelou-se a menos eficiente, apesar de ser habitualmente considerada tão ou mais sensível que as reacções baseadas em PCR (Kaneko *et al.*, 2007; Notomi *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2010). Diferentes conjuntos de *primers*, mesmo apresentando pequenas diferenças entre si, podem ter eficiências de amplificação totalmente distintas (como por exemplo o SET_1 e SET_1New, desenhados neste trabalho). O desenho de novos *primers*, eventualmente para novos alvos genómicos de *T. annulata*, poderá vir a melhorar em muito a eficiência das reacções LAMP para detectar este agente. No entanto, mesmo com as actuais condições experimentais, a técnica LAMP é capaz de detectar *T. annulata* em amostras com parasitémias comprovadamente muito baixas, como a amostra 8182 já referida acima. Esta técnica será assim capaz de detectar o agente em qualquer amostra originária de um animal em estado agudo da doença e, como tal, passível de utilização no diagnóstico clínico.

Para que a técnica LAMP tenha uma utilização mais alargada no sector do diagnóstico veterinário será necessário simplificar a leitura dos resultados da amplificação dos ácidos nucleicos alvo. A utilização de sistemas de electroforese em géis de agarose para este fim é relativamente simples, mas não será uma técnica vantajosa para aplicação em sistemas descartáveis e mais acessíveis de diagnóstico. Neste contexto, a combinação de tecnologias isotérmicas de amplificação de DNA, como o LAMP, com dispositivos imunocromatográficos de resposta colorimétrica para a detecção dos produtos amplificados poderá vir a revelar-se bastante adequada para o desenvolvimento de dispositivos moleculares de diagnóstico com essas características. Esta temática deverá ser merecedora de estudos posteriores, para os quais o trabalho aqui apresentado constitui um primeiro passo.

5. Bibliografia

- Abrantes, P., Lopes, L.F., do Rosário, V.E. e Silveira, H. 2005. Effect of chloroquine on the expression of genes involved in the mosquito immune response to *Plasmodium* infection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35(10): 1124-1132.
- Aktas, M., Dumanli, N. e Angin, M. 2004. Cattle infestation by *Hyalomma* ticks and prevalence of *Theileria* in *Hyalomma* species in the east of Turkey. *Veterinary Parasitology* 119: 1-8.
- Aktas, M., Altay, K. e Dumanli, N. 2005. Survey of *Theileria* parasites of sheep in eastern Turkey using polymerase chain reaction. *Small Ruminant Research* 60: 289-293.
- Aktas, M., Bendele, K.G., Altay, K., Dumanli, N., Tsuji, M. e Holman, P.J. 2007. Sequence polymorphism in the ribosomal DNA internal transcribed spacers differs among *Theileria* species. *Veterinary Parasitology* 147: 221-230.
- Al-Amery, M.A.Y. e Hasso, S.A. 2002. Laboratory diagnosis of novel species of *Theileria hirci*, *Eimeria caprovina* and *Eimeria pallidain* goats in Iraq. *Small Ruminant Research* 44: 163-166.
- Alhassan, A., Thekiso, O.M., Yokoyama, N., Inoue, N., Motloang, M.Y., Mbatia, P.A., Yin, H., Katayama, Y., Anzai, T., Sugimoto, C. e Igarashi, I. 2007. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmiasis. *Veterinary Parasitology* 143(2): 155-160.
- Altay, K., Dumanli, N. e Aktas, M. 2007. Molecular identification, genetic diversity and distribution of *Theileria* and *Babesia* species infecting small ruminants. *Veterinary Parasitology* 147(1-2): 161-165.
- Altay, K., Aydin, M.F., Dumanli, N. e Aktas, M. 2008. Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infections in cattle. *Veterinary Parasitology* 158(4): 295-301.
- Beck, H., Blake, D., Dardé, M., Felger, I., Pedraza-Díaz, S., Regidor-Cerrillo, J., Gómez-Bautista, M., Ortega-Mora, L., Putignani, L., Shiels, B., Tait, A. e Weir, W. 2009. Molecular

approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. *International Journal for Parasitology* 39: 175-189.

- Bhoora, R., Quan, M., Matjila, P.T., Zwegarth, E., Guthrie, A.J. e Collins, N.E. 2010. Sequence heterogeneity in the equi merozoite antigen gene (ema-1) of *Theileria equi* and development of an ema-1-specific TaqMan MGB assay for the detection of *T. equi*. *Veterinary Parasitology* 172(1-2): 33-45.
- Bilgic, H.B., Karagenc, T., Shiels, B., Tait, A., Eren, H., Weir, W. 2010. Evaluation of cytochrome b as a sensitive target for PCR based detection of *T. annulata* carrier animals. *Veterinary Parasitology* 174(3-4): 341-347.
- Blood, D.C. e Radostits, O.M. 1991. *Clínica Veterinária*, 7ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Bouattour, A., Darghouth, M.A. e Miled, L.B. 1996. Cattle infestation by *Hyalomma* ticks and prevalence of *Theileria* in *H. detritum* species in Tunisia. *Veterinary Parasitology* 65(3-4): 233-245.
- Branco, S., Orvalho, J., Leitão, A., Pereira, I., Malta, M., Mariano, I., Carvalho, T., Baptista, R., Shiels, B.R. e Peleteiro, M.C. 2010. Fatal cases of *Theileria annulata* infection in calves in Portugal associated with neoplastic-like lymphoid cell proliferation. *Journal of Veterinary Science* 11(1): 27-34.
- Brígido, C., Fonseca, I.P., Parreira, R., Fazendeiro, I., Rosário, V.E. e Centeno-Lima, S. 2004. Molecular and phylogenetic characterization of *Theileria* spp. parasites in autochthonous bovines (Mirandesa breed) in Portugal. *Veterinary Parasitology* 123: 17-23.
- Buling, A., Criado-Fornelio, A., Asenzo, G., Benitez, D., Barba-Carretero, J.C. e Florin-Christensen, M. 2007. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Veterinary Parasitology* 147: 16-25.
- Calder, J.A., Reddy, G.R., Chieves, L., Courtney, C.H., Littell, R., Livengood, J.R., Norval, R.A., Smith, C. e Dame, J.B. 1996. Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR-based tests. *Journal of Clinical Microbiology* 34(11): 2748-2755.

- Chae, J., Lee, J., Kwon, O., Holman, P.J., Waghela, S.D. e Wagner, G.G. 1998. Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene variable (V4) region among and within geographic isolates of *Theileria* from cattle, elk and white-tailed deer. *Veterinary Parasitology* 75(1): 41-52.
- Chae, J., Levy, M., Hunt, J. Jr., Schlater, J., Snider, G., Waghela, S.D., Holman, P.J. e Wagner, G.G. 1999 *Theileria* sp. Infections associated with bovine fatalities in the United States confirmed by small-subunit rRNA gene analyses of blood and tick samples. *Journal of Clinical Microbiology* 37(9): 3037-3040.
- Coetzer, J.A.W. e Tustin, R.C. 2004. *Infectious Diseases of Livestock*, Oxford University Press.
- Collins, N.E., Allsopp, M.T.E.P. e Allsopp, B.A. 2002. Molecular diagnosis of theileriosis and heartwater in bovines in Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96: 217-224.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A. e Barba-Carretero, J.C. 2003. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. *Veterinary Parasitology* 113(3-4): 189-201.
- Criado-Fornelio, A., Buling, A., Asenzo, G., Benitez, D., Florin-Christensen, M., Gonzalez-Oliva, A., Henriques, G., Silva, M., Alongi, A., Agnone, A., Torina, A. e Madruga, C.R. 2009. Development of fluorogenic probe-based PCR assays for the detection and quantification of bovine piroplasmids. *Veterinary Parasitology* 162(3-4): 200-206.
- d'Oliveira, C., van der Weide, M., Habela, M.A., Jacquet, P. e Jongejan, F. 1995. Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33(10): 2665-2669.
- d'Oliveira, C., van der Weide, M., Jacquet, P. e Jongejan, F. 1997. Detection of *Theileria annulata* by the PCR in ticks (Acari: Ixodidae) collected from cattle in Mauritania. *Experimental & Applied Acarology* 21: 279-291.

- Darghouth, M.E.A., Bouattour, A., Miled, L.B., Kilani, M. e Brown, C.G.D. 1996. Epidemiology of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection of cattle) in an endemic region of Tunisia: characterization of endemicity states. *Veterinary Parasitology* 65: 199-211.
- Dhanasekaran, S., Doherty, T. M. e Kenneth, J. 2010. Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *Journal of Immunological Methods* 354(1-2): 34-9.
- Estrada-Peña, A. e Santos-Silva, M.M. 2005. The distribution of ticks (Acari: Ixodidae) of domestic livestock in Portugal. *Experimental and Applied Acarology* 36(3): 233-246.
- Ferreira, I.D., Rosário, V.E. e Cravo, P.V. 2006. Real-time quantitative PCR with SYBR Green I detection for estimating copy numbers of nine drug resistance candidate genes in *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal* 5:1.
- García-Sanmartín, J., Nagore, D., García-Pérez, A.L., Juste, R.A. e Hurtado, A. 2006. Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species infecting cattle in Northern Spain using reverse line blot macroarrays. *BMC Veterinary Research* 2(16).
- Georges, K., Loria, G.R., Riili, S., Greco, A., Caracappa, S., Jongejan, F. e Sparagano, O. 2001. Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Veterinary Parasitology* 99(4): 273-286.
- Gill, P. e Ghaemi, A. 2008. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 27(3): 224-243.
- Guan, G., Chauvin, A., Luo, J., Inoue, N., Moreau, E., Liu, Z., Gao, J., Thekisoe, O.M., Ma, M., Liu, A., Dang, Z., Liu, J., Ren, Q., Jin, Y., Sugimoto, C. e Yin, H. 2008. The development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of *Babesia* spp. infective to sheep and goats in China. *Experimental Parasitology* 120(1): 39-44.
- Gubbels, J.M., de Vos, A.P., van der Weide, M., Viseras, J., Schouls, L.M., de Vries, E. e Jongejan, F. 1999. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 37(6): 1782-1789.

- Gubbels, M.J., d'Oliveira, C. e Jongejan, F. 2000a. Development of an Indirect Tams1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of *Theileria annulata* Infection in Cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7(3): 404-411.
- Gubbels, M.J., Katzer, F., Hide, G., Jongejan, F. e Shiels, B.R. 2000b. Generation of a mosaic pattern of diversity in the major merozoite-piroplasm surface antigen of *Theileria annulata*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 110(1): 23-32.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. e Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6(10): 986-994.
- Ica, A., Vatansever, Z., Yildirim, A., Duzlu, O. e Inci, A. 2007. Detection of *Theileria* and *Babesia* species in ticks collected from cattle. *Veterinary Parasitology* 148(2): 156-160.
- Iseki, H., Alhassan, A., Ohta, N., Thekiso, O.M., Yokoyama, N., Inoue, N., Nambota, A., Yasuda, J. e Igarashi, I. 2007. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. *Journal of Microbiological Methods* 71(3): 281-217.
- Jongejan, F. e Uilenberg, G. 2004. The global importance of ticks. *Parasitology* 129: S3-S14.
- Kaneko, H., Kawana, T., Fukushima, E. e Suzutani, T. 2007. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70(3): 499-501.
- Katzer, F., Ngugi, D., Oura, C., Bishop, R.P., Taracha, E.L., Walker, A.R. e McKeever, D.J. 2006. Extensive genotypic diversity in a recombining population of the apicomplexan parasite *Theileria parva*. *Infection and Immunity* 74(10): 5456-5464.
- Kim, C.M., Blanco, L.B., Alhassan, A., Iseki, H., Yokoyama, N., Xuan, X. e Igarashi, I. 2008. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. *Veterinary Parasitology* 151(2-4): 158-163.
- Li, Y., Luo, J., Liu, Z., Guan, G., Gao, J., Ma, M., Dang, Z., Liu, A., Ren, Q., Lu, B., Liu, J., Zhao, H., Li, J., Liu, G., Bai, Q. e Yin, H. 2007. Experimental transmission of *Theileria* sp.

(China 1) infective for small ruminants by *Haemaphysalis longicornis* and *Haemaphysalis qinghaiensis*. Parasitology Research 101(3): 533-538.

- Leutenegger, C.M. 2001. The Real-Time TaqMan PCR and Applications in Veterinary Medicine. Veterinary Sciences Tomorrow 1: 1-15.
- Manuja, A., Malhotra, D.V., Sikka, V.K., Sangwan, A.K., Sharma, R., Kumar, B., Mehta, B.D., Gulati, B.R. e Nichani, A.K. 2006. Isolates of *Theileria annulata* collected from different parts of India show phenotypic and genetic diversity. Veterinary Parasitology 137(3-4): 242-252.
- Nagamine, K., Watanabe, K., Ohtsuka, K., Hase, T. e Notomi, T. 2001. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template. Clinical Chemistry 47(9): 1742-1743.
- Nagore, D., García-Sanmartín, J., García-Pérez, A.L., Juste, R.A. e Hurtado, A. 2004. Detection and identification of equine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting: epidemiological survey and phylogenetic analysis. Veterinary Parasitology 123(1-2): 41-54.
- Nimitphak, T. 2008. The Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification with Lateral-Flow Dipsticks (LAMP-LFD) to detect infection of hepatopancreatic parvovirus (HPV). Tese de Mestrado. Faculdade de Pós-Graduações, Universidade Mahidol.
- Njiru, Z.K., Ouma, J.O., Enyaru, J.C. e Dargantes, A.P. 2010. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) test for detection of *Trypanosoma evansi* strain B. Experimental Parasitology 125(3): 196-201.
- Norval, R.A.I., Perry, B.D. e Young, A.S. 1992. The Epidemiology of Theileriosis in Africa. Academic Press Limited, London.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. e Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research 28(12): E63.
- Office International des Epizooties 2008. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Theileriosis - Chapter 2.4.16. Version 14 August 2009. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.16_THEILIERIOSIS.pdf

in World Organization for Animal Health, <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>

- Olsen, O.W. 1974. Family Theileriidae. *In* Animal Parasites - Their Life Cycles and Ecology, 3^a ed., pp 163-167, University Park Press, Dover Publications Inc., New York.
- Oura, C.A., Odongo, D.O., Lubega, G.W., Spooner, P.R., Tait, A. e Bishop, R.P. 2003. A panel of microsatellite and minisatellite markers for the characterisation of field isolates of *Theileria parva*. *International Journal for Parasitology* 33(14): 1641-1653.
- Papadopoulos, B., Perié, N.M. e Uilenberg, G. 1996. Piroplasms of domestic animals in the Macedonia region of Greece. 1. Serological cross-reactions. *Veterinary Parasitology* 63(1-2): 41-56.
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F.T., Douglas, S.H., Field, S.L., Bell, S.M., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A.J., Robinson, P.A., Inglehearn, C.F., Isaacs, J.D. e Markham, A.F. 2003. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology* 3.
- Preston, P.M. 2001. Theilerioses. *In* The Encyclopedia of Arthropod-transmitted Infections of Man and Domesticated Animals (M. W. Service ed), pp 487-502, CABI Publishing, Oxon, UK.
- Purnell, R.E. 1978. *Theileria annulata* as a hazard to cattle in countries on the northern Mediterranean littoral. *Veterinary Science Communications* 2: 3-10.
- Applied Biosystems 2008. Real-time PCR: Understanding C_t. 10 August 2011. http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocument/s/cms_053906.pdf in Applied Biosystems, <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home.html>.
- Rijpkema, S.G., Molkenboer, M.J., Schouls, L.M., Jongejan, F. e Schellekens, J.F. 1995. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology* 33(12): 3091-3095.

- Robinson, P.M. 1982. Theileriosis annulata and its transmission - A review. *Tropical Animal Health and Production* 14(1): 3-12.
- Salih, D.A., Liu, Z., Bakheit, M.A., Ali, A.M., El Hussein, A.M., Unger, H., Viljoen, G., Seitzer, U. e Ahmed, J.S. 2008. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis of tropical theileriosis. *Transboundary and Emerging Diseases* 55(5-6): 238-243.
- Salih, D.A., Ali, A.M., Liu, Z., Bakheit, M.A., Taha, K.M., El Imam, A.H., Kullmann, B., El Hussein, A.M., Ahmed, J.S. e Seitzer, U. 2011. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Theileria lestoquardi*. *Parasitology Research* 9.
- Samuel, W.M., Pybus, M.J. e Kocan, A.A. 2001. *Parasitic Diseases of Wild Mammals*. Iowa State University Press, Ames.
- Schnittger, L., Yin, H., Jianxun, L., Ludwig, W., Shayan, P., Rahbari, S., Voss-Holtmann, A. e Ahmed, J.S. 2000. Ribosomal small-subunit RNA gene-sequence analysis of *Theileria lestoquardi* and a *Theileria* species highly pathogenic for small ruminants in China. *Parasitology Research* 86(5): 352-358.
- Schnittger, L., Yin, H., Qi, B., Gubbels, M.J., Beyer, D., Niemann, S., Jongejan, F. e Ahmed, J.S. 2004. Simultaneous detection and differentiation of *Theileria* and *Babesia* parasites infecting small ruminants by reverse line blotting. *Parasitology Research* 92(3): 189-196.
- Sibeko, K.P., Oosthuizen, M.C., Collins, N.E., Geysen, D., Rambritch, N.E., Latif, A.A., Groeneveld, H.T., Potgieter, F.T. e Coetzer, J.A. 2008. Development and evaluation of a real-time polymerase chain reaction test for the detection of *Theileria parva* infections in Cape buffalo (*Syncerus caffer*) and cattle. *Veterinary Parasitology* 155(1-2): 37-48.
- Silva, M.G., Marques, P.X. e Oliva, A. 2010. Detection of *Babesia* and *Theileria* species infection in cattle from Portugal using a reverse line blotting method. *Veterinary Parasitology* 174(3-4): 199-205.

- Singh, S., Khatri, N., Manuja, A., Sharma, R.D., Malhotra, D.V. e Nichani, A.K. 2001. Impact of field vaccination with a *Theileria annulata* schizont cell culture vaccine on the epidemiology of tropical theileriosis. *Veterinary Parasitology* 101(2): 91-100.
- Soares, R.F.P.N. 2011. Diagnóstico molecular de doenças em bovinos: theileriose e tuberculose. Tese de Mestrado. Escola Superior de Saúde Egas Moniz.
- Tanaka, Y., Kimura, Y., Mitani, Y., Kawai, Y., Lezhava, A., Noma, S., Tagami, M., Kawai, J., Hayashizaki, Y. e Usui, K. 2010. Effects of the turn-back primer on intermediate product generation in isothermal DNA amplification. *BioTechniques* 49(6): 888-92.
- Taylor, M.A., Coop, R.L. e Wall, R.L. 2007. *Veterinary Parasitology*. 3ª ed. Oxford: Blackwell Science Ltd, Blackwell Publishing.
- Thekiso, O.M., Rambritch, N.E., Nakao, R., Bazie, R.S., Mbatia, P., Namangala, B., Malele, I., Skilton, R.A., Jongejan, F., Sugimoto, C., Kawazu, S. e Inoue, N. 2010. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detection of *Theileria parva* infections targeting the PIM and p150 genes. *International Journal for Parasitology* 40(1): 55-61.
- Uilenberg, G. 1995. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. *Veterinary Parasitology* 57(1-3): 19-41.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M. e Jennings, F.W. 1996. *Veterinary Parasitology*. In *Veterinary Protozoology Class Piroplasmidia*, 2ª ed., pp 242-249, Blackwell Publishing Ltd., GraphyCems, Navarra, Spain.
- von Schubert, C., Xue, G., Schmuckli-Maurer, J., Woods, K.L., Nigg, E.A. e Dobbelaere, D.A.E. 2010. The Transforming Parasite *Theileria* Co-ops Host Cell Mitotic and Central Spindles to Persist in Continuously Dividing Cells. *PLoS Biology* 8(9): 1-18.
- Wang, L.X., He, L., Fang, R., Song, Q.Q., Tu, P., Jenkins, A., Zhou, Y.Q. e Zhao, J.L. 2010. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of *Theileria sergenti* infection targeting the p33 gene. *Veterinary Parasitology* 171(1-2): 159-162.

- Weir, W., Ben-Miled, L., Karagengç, T., Katzer, F., Darghouth, M., Shiels, B. e Tait, A. 2007. Genetic exchange and sub-structuring in *Theileria annulata* populations. *Molecular and Biochemical Parasitology* 154(2): 170-180.
- Yamamura, M., Makimura, K. e Ota, Y. 2009. Evaluation of a new rapid molecular diagnostic system for *Plasmodium falciparum* combined with DNA filter paper, loop-mediated isothermal amplification, and melting curve analysis. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 62(1): 20-25.
- Zaeemi, M., Haddadzadeh, H., Khazrainia, P., Kazemi, B. e Bandehpour, M. 2010. Identification of different *Theileria* species (*Theileria lestoquardi*, *Theileria ovis*, and *Theileria annulata*) in naturally infected sheep using nested PCR-RFLP. *Parasitology Research*
- Zhang, Z.H. 1997. A general review on the prevention and treatment of *Theileria annulata* in China. *Veterinary Parasitology* 70(1-3): 77-81.