

Extração de DNA a partir de coágulos sanguíneos bovinos



ISSN 1677-8618
Outubro, 2006

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 43

Extração de DNA a partir de coágulos sanguíneos bovinos

Luciana Gatto Brito
Márcia Cristina de Sena Oliveira
Maria Manuela da Fonseca Moura
Francelino Goulart da Silva Netto
Francisco Aloísio Cavalcante
Adriana Denise Marim
Gislaine Cristina Rodrigues de Souza
Juliana Leite da Silva

Porto Velho, RO
2006

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Rondônia

BR 364 km 5,5, Caixa Postal 406, CEP 78900-970, Porto Velho, RO

Telefones: (69) 3901-2510, 3225-9387, Fax: (69) 3222-0409

www.cpafrro.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Flávio de França Souza*

Secretária: *Marly de Souza Medeiros*

Membros:

Abadio Hermes Vieira

André Rostand Ramalho

Luciana Gatto Brito

Michelliny de Matos Bentes Gama

Vânia Beatriz Vasconcelos de Oliveira

Normalização: *Daniela Maciel*

Editoração eletrônica: *Marly de Souza Medeiros*

Revisão gramatical: *Wilma Inês de França Araújo*

1ª edição

1ª impressão: 2006, tiragem: 100 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Rondônia.

Extração de DNA a partir de coágulos sanguíneos bovinos /
Luciana Gatto Brito... [et al]. – Porto Velho: Embrapa
Rondônia, 2006.

13 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa
Rondônia, ISSN 0677-8618; 43).

1. Epidemiologia molecular. 2. Parasitologia. 3. Bovinos –
Doenças. 4. Tristeza parasitária bovina. I. Brito, Luciana Gatto.
II. Título. III. Série.

CDD 636.089696

© Embrapa – 2006

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Material e métodos	8
Material	8
Métodos	8
Resultados	9
Conclusão	12
Referências	12

Extração de DNA a partir de coágulos sanguíneos bovinos

Luciana Gatto Brito¹

Márcia Cristina de Sena Oliveira²

Maria Manuela da Fonseca Moura³

Francelino Goulart da Silva Netto⁴

Francisco Aloísio Cavalcante⁵

Adriana Denise Marim⁶

Gislaine Cristina Rodrigues de Souza⁷

Juliana Leite da Silva⁷

Resumo

Foi otimizada uma metodologia de extração de DNA genômico a partir de coágulo sanguíneo. Amostras de sangue com e sem anticoagulante EDTA para a obtenção dos coágulos sanguíneos foram coletadas em bovinos nos estados de Rondônia e Acre para pesquisa de *Anaplasma marginale*. Para a extração de DNA a partir do coágulo sanguíneo testaram-se dois tipos de tecido de nylon: no tratamento 1, o tecido utilizado apresentava diâmetro dos poros de 200 μm e no tratamento 2, tecido com poros de diâmetro de 1.200 μm . As amostras de sangue com anticoagulante representaram o tratamento 3, sendo este considerado como tratamento controle. Após a quebra mecânica, os coágulos sofreram centrifugação a 7.000 RPM por 15 minutos passando através das malhas dos tecidos utilizados nos tratamentos 1 e 2. A extração de DNA das amostras a partir do coágulo centrifugado e do sangue total se deu através da utilização de kit comercial para extração de DNA genômico. A quantificação do DNA obtido foi realizada através de espectrofotometria a 260 e 280 nm, sendo sua integridade verificada através de eletroforese em gel de agarose. As amostras de DNA obtidas a partir dos diferentes protocolos foram utilizadas como molde para amplificação, por PCR, do gen *msp5* de *A. marginale*. A quantidade de DNA obtida pelos tratamentos 1 e 2 foi semelhante a do sangue total ($33,39 \pm 1,17$; $31,76 \pm 0,663$; $32,35 \pm 0,676$, respectivamente). A pureza do DNA nas amostras obtidas a partir dos tratamentos 1 e 2 foram semelhantes a do sangue total ($A_{260/280} = 1,61 \pm 0,068$; $1,58 \pm 0,035$; $1,63 \pm 0,028$, respectivamente). A utilização de tecidos de organza ou tipo filó se mostrou como uma metodologia apta a ser incorporada como método de rotina para extração de DNA a partir de coágulo sanguíneo bovino por ser uma metodologia simples, rápida, barata e reproduzível para a obtenção de quantidades consideráveis de DNA de boa qualidade para utilização em estudos de epidemiologia molecular em patologias bovinas.

¹ Méd. Vet., D.Sc, Embrapa Rondônia, Caixa Postal 406, CEP 78900-970, Porto Velho-RO. e-mail: luciana@cpafro.embrapa.br.

² Méd. Vet., D.Sc, Embrapa Pecuária Sudeste, Caixa postal 339, CEP 13560-970, São Carlos-SP, e-mail: marcia@cnpse.embrapa.br.

³ Bióloga, D.Sc, Universidade Federal de Rondônia - UNIR, BR 364 km 9,6, Porto Velho, RO, CEP 78.900-000, e-mail: mmmoura@click21.com.br.

⁴ Méd. Vet. M.Sc, Embrapa Rondônia. e-mail: goulart@cpafro.embrapa.br.

⁵ Méd. Vet. M.Sc, Embrapa Acre. e-mail: aloisio@cpafac.embrapa.br

⁶ Bióloga, Mestranda PGBIOEXP, UNIR. e-mail: adriana.marim@hotmail.com.

⁷ Acadêmica de Ciências Biológicas da UNIR.

DNA extraction from bovines clotted bloods

Abstract

*A methodology for processing samples of blood clots for extraction of genomic DNA was standardized. Samples of blood with EDTA-anticoagulant and blood without anticoagulant for the attainment of the blood clots had been collected in bovines natural infested with *Anaplasma marginale* in Rondônia and Acre states. For extraction DNA, the blood clots were previously broken mechanical. Two types of nylon textile were tested: in the first treatment the pore size was 200 μm and in the second treatment the pore size was 1,200 μm . The blood samples with anticoagulant composed the treatment 3, which were considered control treatment. After the mechanical breaking, the blood clots were centrifuged at 7.000 RPM per 15 minutes, when the blood clots were passing through the meshes of textile used in the different treatments. The extraction DNA of samples of blood clots and total blood was carried out by commercial kit. Quantification and purity evaluation of DNA samples were determined by spectrophotometry at 260 and 280 nm. DNA integrity was verified by 1.0% agarose gel electrophoresis. DNA samples provided by different protocols were used by template for amplification, by PCR, the *msp5* gene of *A. marginale*. The amount of DNA recovered from treatments 1 and 2 was similar to that obtained from anticoagulated total blood (33.39 ± 1.17 ; 31.76 ± 0.663 and 32.35 ± 0.676 $\mu\text{g/mL}$, respectively). The DNA purity of blood clots assessed by $A_{260/280}$ ratio was similar to the total blood ($A_{260/280} = 1.61 \pm 0.068$; 1.58 ± 0.035 ; 1.63 ± 0.028 , respectively). The DNA extraction protocol optimized in our laboratory is simple, fast and reliable for obtaining high quantities of high-quality DNA from clotted blood bovine for molecular epidemiology studies of bovine's diseases.*

Index terms: DNA extraction, blood clot, molecular epidemiology, bovine diseases.

Introdução

Avanços recentes no campo da biologia molecular tornaram possível o uso de técnicas de amplificação do ácido dextroribonucleico (DNA) dos agentes causais das patologias parasitárias e infecciosas que acometem os animais. Esses testes baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são feitos de maneira relativamente rápida e apresentam alta sensibilidade e especificidade tornando possível a verificação da presença de agentes patogênicos, mesmo em animais assintomáticos.

Em estudos epidemiológicos das hemoparasitoses bovinas podem ser utilizadas técnicas de identificação direta desses parasitas através da PCR. Esses estudos necessitam de métodos de extração de DNA rápidos, baratos e eficientes, que possibilitem o processamento de grande número de amostras. Muitos métodos desenvolvidos para este fim consomem tempo, envolvem digestão com proteinase K (GRIMBERG et al., 1989; TAS, 1990), incubação com RNase para remoção do ácido ribonucleico (RNA) (GARG et al., 1996), requerem um grande volume de sangue (10 a 15 mL) ou utilizam solventes orgânicos como fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (GRUBER e ZINGALES, 1995; SAMBROOK et al., 1989), esses últimos, altamente tóxicos, geram resíduos que necessitam de descarte diferenciado em laboratórios de biologia molecular que utilizam tais reagentes em sua rotina. Embora estes métodos recuperem DNA de alto peso molecular de uma grande variedade de amostras, eles também utilizam muitos passos incluindo a transferência das soluções contendo o DNA para recipientes adicionais ou a utilização de procedimentos de purificação do DNA (GARG et al., 1996; GRIMBERG et al., 1989), que aumentam o risco de troca de amostras. Considerando-se estes aspectos, essas técnicas mostram-se pouco apropriadas para o uso na rotina de laboratórios que realizem estudos epidemiológicos em parasitologia veterinária.

A maioria dos testes de DNA para fins de diagnóstico de hemoparasitas envolve a extração de DNA genômico de todos os parasitas presentes nessa amostra (inclusive parasitas intraeritrocitários), obtidos geralmente através de sangue adicionado a anticoagulantes, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Porém, em estudos epidemiológicos deve ser considerada a necessidade da análise de um grande número de amostras, e quando se trabalha com doenças que ocorrem em populações de animais distribuídos em diversos rebanhos de uma região, o alto custo relativo à coleta das amostras pode muitas vezes inviabilizar o estudo. Com o objetivo de minimizar esses custos de diagnóstico dos agentes causais da Tristeza Parasitária Bovina (TPB), *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *B. bigemina*, buscou-se avaliar uma metodologia alternativa de obtenção de DNA genômico a partir de coágulo sanguíneo para utilização no estudo epidemiológico molecular destes parasitas conduzido na Amazônia Ocidental, nos Estados de Rondônia e Acre.

Um dos parâmetros utilizados para a escolha de uma metodologia de extração de DNA e a quantificação do DNA genômico obtido, que baseia-se na propriedade das bases aromáticas dos ácidos nucleicos em absorver radiação ultra-violeta ao comprimento de onda de 260 nm. A absorbância de 260 nm (A_{260}) é utilizada para a determinação da concentração de ácidos nucleicos. Outro parâmetro é a pureza do DNA obtido, que pode ser avaliada pela relação A_{260}/A_{280} , pois proteínas, importantes contaminantes de amostras de DNA, absorvem radiação ultravioleta ao comprimento de onda de 280 nm. Em amostras de DNA livres de contaminação por proteínas, o valor da relação A_{260}/A_{280} igual a 1,8, sendo que valores abaixo sugerem contaminação proteica e acima contaminação por RNA (BRITO et al., 2004; ZAHA, 1996).

O diagnóstico molecular utiliza seqüências genotípicas de baixa variabilidade entre diferentes linhagens e essenciais ao organismo que se busca identificar. O gene *msp5* de *A. marginale*, está representado no genoma em cópia simples, altamente conservado entre as diferentes cepas, sendo este gene essencial ao ciclo de vida do parasita e por isso, utilizado para o desenvolvimento de técnicas diagnósticas moleculares para anaplasmose bovina (VISSER et al., 1992).

Material e métodos

Material

Foram utilizadas 30 amostras de coágulo sanguíneo provenientes de bovinos infestados naturalmente por *A. marginale* e 15 amostras de sangue bovino total coletado com EDTA a 5% também infectados naturalmente por *A. marginale*. Todas as amostras sanguíneas foram coletadas por venopunção da jugular, utilizando sistema de coleta a vácuo, sendo coletados 10 mL de sangue em cada animal. As amostras de sangue sem anticoagulante foram centrifugadas em centrífuga clínica a 2500 rpm (1.050 g) durante 10 minutos para separação do soro a ser utilizado em análises sorológicas.

Métodos

Extração do DNA genômico

As amostras de sangue total coletadas com EDTA foram utilizadas como grupo controle no teste da metodologia de obtenção de DNA através de coágulo sanguíneo.

O primeiro passo para a extração de DNA a partir do coágulo sanguíneo foi a quebra mecânica do coágulo através do uso de lâminas de bisturi em pequenos pedaços, seguindo a metodologia proposta por Tas (1990). Após a quebra do coágulo, testaram-se dois tipos de tecido de nylon, um de malha bem fechada (tecido de organza, denominado de tratamento 1) e outro de malha mais larga (tecido tipo filó, denominado de tratamento 2) como adaptação da metodologia descrita por Garg et al. (1996). Cada um destes tratamentos foi composto por 15 amostras de coágulos sanguíneos. O tamanho dos poros foi medido com objetiva micrométrica em microscópio trinocular Leica DM1000, onde se obteve no tecido de organza um diâmetro dos poros de 200 μm e no tecido de filó um diâmetro de 1.200 μm . Os tecidos, cortados em círculos de 10 cm de diâmetro, foram fixados a tubos de vidro de 50 mL para centrífuga e moldados manualmente em forma de funil e fixados com liga de borracha. Os coágulos previamente quebrados eram então depositados no fundo deste funil formado com os diferentes tecidos e submetidos a uma centrifugação a 7.000 rpm por 15 minutos. A extração de DNA das amostras a partir do coágulo centrifugado e do sangue total se deu através da utilização do kit GFX™ Genomic Blood DNA Purification (Amershan Pharmacia Biotech, UK), seguindo as recomendações do fabricante.

Quantificação do DNA obtido

Para se comparar a quantidade e a pureza do DNA extraído a partir do sangue total e do coágulo sanguíneo utilizou-se um espectrofotômetro, onde a análise baseia-se na propriedade da molécula de DNA em absorver radiação ultravioleta ao comprimento de onda de 260 nm, e através da absorção aferida nas amostras foi possível determinar a concentração de DNA em solução após diluição das amostras (1:500) em água ultrapura.

Reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletrorese

As amostras de DNA extraídas a partir de coágulo sanguíneo e do sangue total foram submetidas à técnica de PCR para amplificação do gene msp5, correspondente a uma proteína altamente conservada entre diferentes isolados de *A. marginale*, bem como em *A. centrale* e *A. ovis* (Visser et al. 1992). A obtenção de *amplicons* de *A. marginale* se deu a partir da utilização dos *primers* msp5 R 5' - GCG CTG CAG TGG CGC AAA ATG CCC GAC ATA CC - 3' e msp5 F 5'- CGC AGA TCT AGC AAA ATC GGC GAG AGG TTT ACC ACT TC - 3', que amplificam um fragmento de 458 pb.

Adicionou-se 1,0 µl de cada *primer* e 2,5 µl do DNA obtido nos diferentes tratamentos a 6,5 µl do kit de amplificação PCR Master Mix (Promega, USA) para um volume de reação de 12,5 µl. As amostras a serem amplificadas foram submetidas a um pré-aquecimento de 94°C por três minutos antes da inicialização dos 35 ciclos, cada qual conduzido a 95°C, onde a fita molde de DNA é desnaturada, 65°C por 1 minuto para o anelamento dos *primers* e extensão, a 72°C por 1 minuto catalizada pela atividade da DNA polimerase, e então uma extensão final por cinco minutos a 72°C. Todas as PCR foram conduzidas utilizando-se uma amostra controle positiva, com DNA proveniente de bezerro infectado experimentalmente com *A. marginale* e uma amostra controle negativo, onde o DNA foi substituído por igual volume de água ultrapura.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,0%, a uma voltagem de 70 V, por aproximadamente 1:30 horas. O gel foi preparado com tampão TBE (1x), corado com brometo de etídio. Os marcadores de peso molecular utilizados foram 100 bp DNA Ladder (Amersham Pharmacia Biotech, UK), sendo sempre aplicados 3 µl do marcador de pares de bases misturado a 1 µl do tampão de corrida (*loading buffer*). Às amostras amplificadas nos microtubos, incluindo os controles negativos e positivos, foram adicionados 5 µl de "*loading buffer*", e visando a homogeneização das amostras, as mesmas foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 segundos.

Análise estatística

Foram estimadas a média aritmética, o desvio padrão e o coeficiente de variação intra-ensaio para os resultados de quantificação de DNA obtido. O teste "t" de Student ao nível de 1% de significância, a análise de variância e análise de regressão linear foram utilizadas para a comparação dos resultados obtidos pelos métodos avaliados.

Resultados

A tabela 1 apresenta as concentrações de DNA e as relações de absorvância em 260 e 280 nm obtida das amostras de sangue total e de coágulo sanguíneo após análise espectrofotométrica. Como se observa, as amostras de DNA obtidas apresentam elevada pureza em todas as metodologias testadas, com $A_{260/280} = 1,44$ a 1,90, sendo as concentrações obtidas semelhantes em todas as metodologias testadas.

Tabela 1. Concentração de DNA genômico e relação $A_{260/280}$ obtidas das amostras de sangue total e de coágulo sanguíneo bovino.

Amostras (45)*	Relação $A_{260/280}$	Concentração de DNA (µg/µL)
Coágulo sanguíneo (T1)		
Média ± DP	1,61 ^a ± 0,068	33,39 ^b ± 1,17
Faixa	1,23 – 1,90	24,61 – 38,0
Coágulo sanguíneo (T2)		
Média ± DP	1,58 ^a ± 0,035	31,76 ^b ± 0,663
Faixa	1,40 – 1,83	28,00 – 36,66
Sangue total (Controle)		
Média ± DP	1,63 ^a ± 0,028	32,35 ^b ± 0,676
Faixa	1,40 – 1,87	28,00 – 37,5

* Número de amostras.

** As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste "t" de Student, ao nível de 1% de significância.

Na tabela 2 são mostrados os valores de coeficiente de variação (CV) intra-ensaio dos métodos utilizados para extração de DNA genômico das amostras de sangue total, coágulo sanguíneo utilizando malha bem fechada (T1) e coágulo sanguíneo utilizando malha mais larga (T2).

Tabela 2. Valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação dos métodos utilizados para a extração de DNA genômico de sangue total e de coágulo sanguíneo bovino.

Amostras	Sangue total* (Controle) ($\mu\text{g/mL}$)	Coágulo sanguíneo (T1)* ($\mu\text{g/mL}$)	Coágulo sanguíneo (T2)* ($\mu\text{g/mL}$)
Média	32,35	33,39	31,76
Desvio Padrão	2,61	4,54	2,57
CV intra-ensaio (%)	8,1	13,6	8,0

* Número de amostras de cada tratamento igual a 15.

A Fig. 1 mostra o gráfico de regressão linear das concentrações de DNA genômico extraídas de sangue total e de coágulo sanguíneo centrifugado em tecido de organza (T1), demonstrando que o DNA obtido a partir desta metodologia apresenta-se quantitativamente próximo ao DNA obtido a partir de sangue total ($r = 0,541$).

O estudo comparativo entre concentrações de DNA obtidas do sangue total e dos coágulos centrifugados em tecido de organza e tecido tipo filó, demonstrou que a centrifugação com filó apresentou excelente correlação (Fig. 2, $r = 1,03$) e a análise de variância (teste f) e teste "t" de Student não demonstraram diferença significativa entre os resultados obtidos pelas três metodologias. Os coeficientes de variação intra-ensaio apresentados na Tabela 2 são considerados aceitáveis na rotina laboratorial, segundo as normas de controle de qualidade de ensaios laboratoriais (TIBURCIO, 1995).

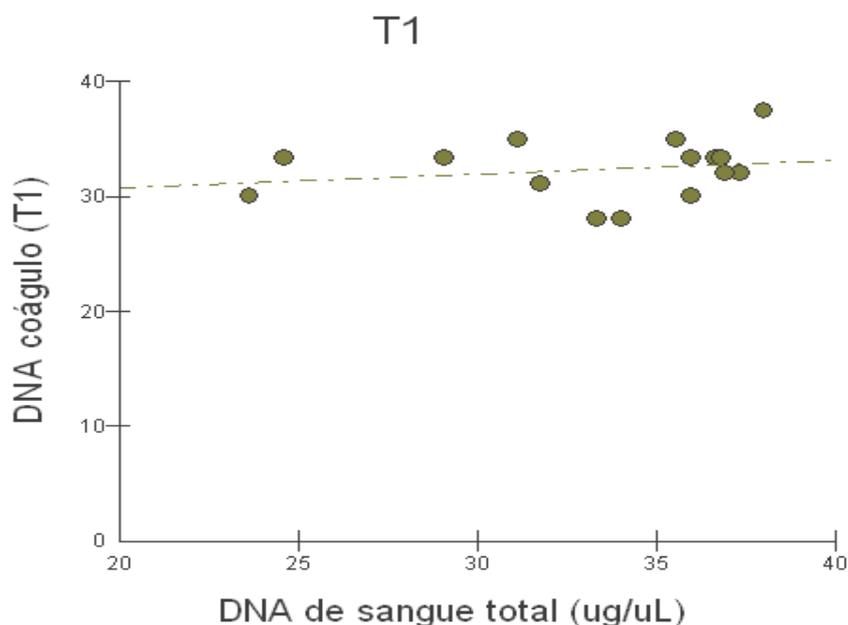


Fig. 1. Gráfico de regressão linear dos valores de concentração de DNA genômico extraído de sangue total e de coágulo sanguíneo centrifugado em tecido de organza. Valor de $r = 0,541$.

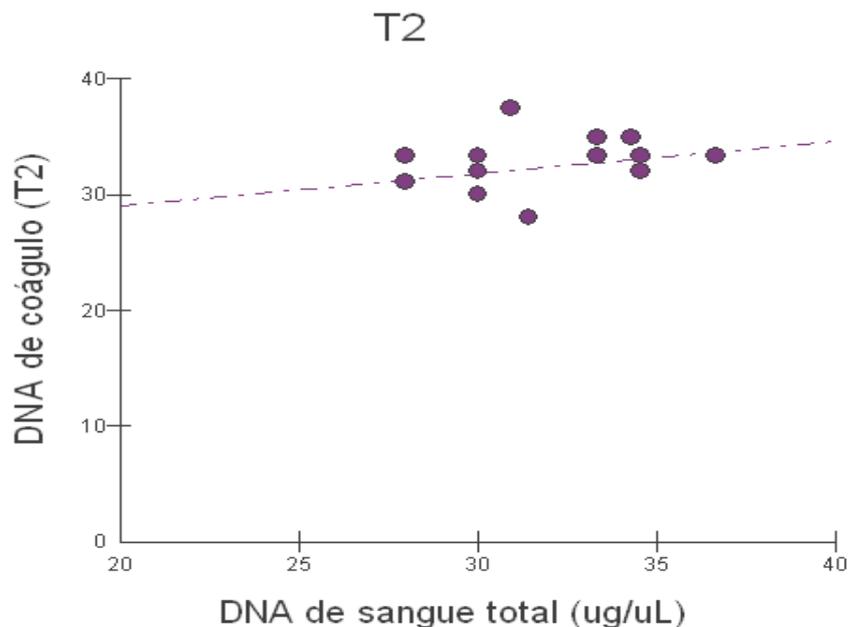


Fig. 2. Gráfico de regressão linear dos valores de concentração de DNA genômico extraído de sangue total e de coágulo sanguíneo centrifugado em tecido de filó. Valor de $r = 1,03$.

A avaliação eletroforética do DNA extraído mostrou que a obtenção de DNA genômico a partir de coágulos sanguíneos bovinos é uma alternativa viável, uma vez que apresentou a mesma qualidade que o extraído de sangue total com anti-coagulante (Fig. 3). As relações entre as $A_{260/280}$ confirmam que as amostras obtidas a partir do coágulo apresentaram alta pureza. Estas características revelaram que a extração de DNA genômico a partir de coágulo produz amostras de DNA padrão com qualidade compatível àquelas obtidas de sangue total e adequada para fins de amplificação de genes de hemoparasitas que ocorrem em bovinos do qual foi obtido o coágulo.

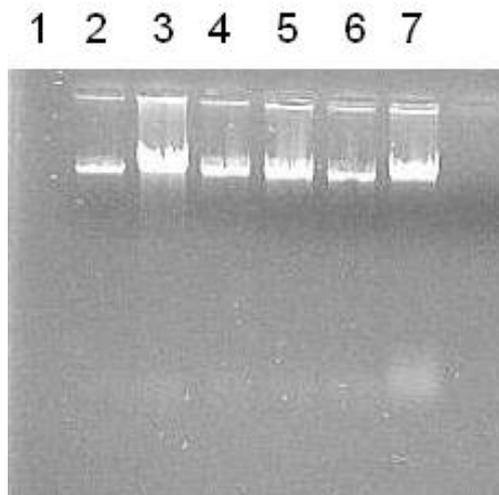


Fig. 3. Eletroforese em gel de agarose a 1% de DNA extraído de coágulo sanguíneo centrifugado em tecido de organza (linhas 2 e 3), tecido de filó (linhas 4 e 5) e de sangue total (6 e 7).

As amostras de DNA extraído de coágulo se mostraram adequadas para a amplificação do gene *msp5* de *A. marginale*, uma vez que mostraram a mesma eficiência de amplificação que as amostras de sangue total (Fig. 4).

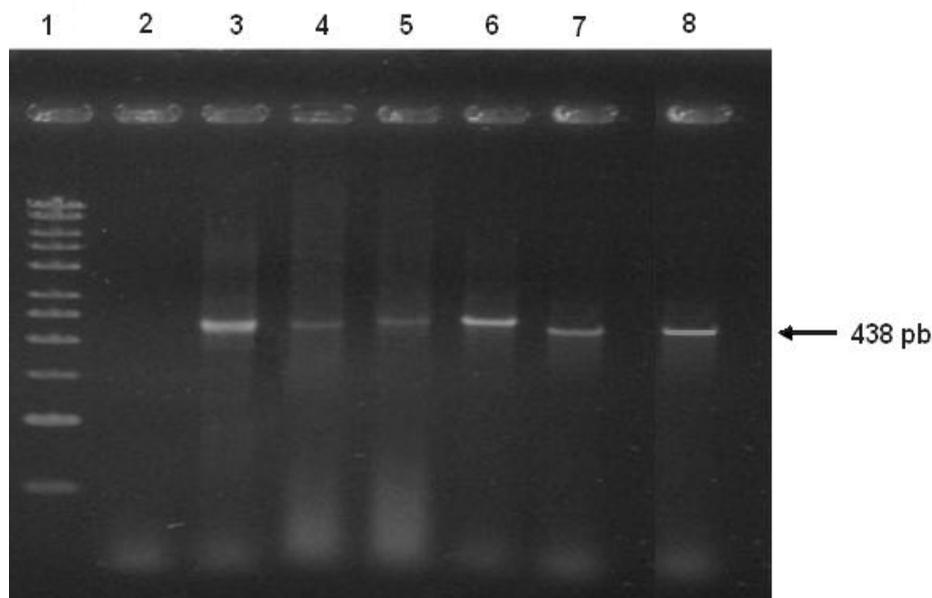


Fig. 4. Produto de amplificação de 458 pares de base (pb) do gene *msp5* para diagnóstico de *Anaplasma marginale* em amostras de coágulo sanguíneo centrifugado em tecido de organza (linhas 3 e 4), tecido de filó (linhas 5 e 6) e de sangue total (linhas 7 e 8), sendo linha 1 marcador de 100 bp e linha 2 controle negativo.

Conclusão

Os resultados obtidos permitem concluir que a extração de DNA de coágulo sanguíneo bovino é uma boa alternativa para obtenção de DNA molde a ser utilizado nos estudos das hemoparasitoses que acometem os bovinos, sendo, portanto, aplicável a estudos de epidemiologia molecular e também a estudos genéticos que envolvam um grande número de amostras. A utilização de tecido, tanto de organza ou do tipo filó para a liquefação do coágulo sanguíneo bovino se mostrou apta a ser incorporada como método de rotina para extração de DNA de sangue por ser uma metodologia simples, rápida, barata e reproduzível para a obtenção de quantidades consideráveis de DNA de boa qualidade.

Tal metodologia trás como vantagem a diminuição nos custos de estudos epidemiológicos que necessitem de sangue como fonte de pesquisa, uma vez que amostras utilizadas em levantamentos sorológicos podem ser reaproveitadas para a extração de DNA genômico que servirá como molde para diversas aplicações biomoleculares, potencializando os esforços e otimizando a aplicação dos recursos investidos na coleta das amostras.

Referências

BRITO, L. G.; HUACCA, M. E. F.; REGITANO, L. C. A.; MOYA BORJA, G. E. Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA celular a partir de adultos de *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 26, n. 4, p. 168-172, 2004.

GARG, U.; HANSON, N.; TSAI, M.; ECKFELDT, J. Simple and rapid method for extraction of DNA from fresh and cryopreserved clotted human blood. **Clinical Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 647-648, 1996.

GRIMBERG, J.; NOWOSCHIK, S.; BELLUSCIO, L.; McKEE, R.; TURCK, A.; EISENBERG, A. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 20, p. 8390, 1989.

GRUBER, A.; ZINGALES, B. Single-tube genomic DNA isolation from whole blood without pre-isolating white blood cells. **Bio Techniques**, v. 19, n.1, p. 30-33, 1995.

SAMBROOK, J.; FRISTCH, E.; MANIATIS, T. Commonly used techniques in molecular cloning. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

TAS, S. Purification of DNA from clotted blood. **Clinical Chemistry**, v. 36, n. 10, p. 1851, 1990.

TIBURCIO, H. M. **Controle interno da qualidade analítica**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, 1995.

VISSER, E. S.; McGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; DAVIS, W. C.; SHKAP V.; PIPANO, E.; KNOWLES, D. P. Jr. The *Anaplasma marginale* msp5 gene encodes a 19- kilodalton protein conserved in all recognized Anaplasma species. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 12, p. 5139-5144, 1992.

ZAHA, A. **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996. 56 p.

Embrapa

Rondônia

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO**