



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES MSP1a E MSP2 DE
Anaplasma marginale, ASSOCIADAS A OLIGONUCLEOTÍDEO CpG 2006
COMO ADJUVANTE, COMO IMUNÓGENOS CONTRA A ANAPLASMOSE
BOVINA**

FLÁBIO RIBEIRO DE ARAÚJO

ORIENTADOR: DR. CLAUDIO ROBERTO MADRUGA

SALVADOR, BA

2005



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



**AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES MSP1a E MSP2 DE
Anaplasma marginale, ASSOCIADAS A OLIGONUCLEOTÍDEO CpG 2006
COMO ADJUVANTE, COMO IMUNÓGENOS CONTRA A ANAPLASMOSE
BOVINA**

FLÁBIO RIBEIRO DE ARAÚJO

Tese apresentada como pré-requisito para
obtenção do grau de Doutor em
Imunologia, pelo Instituto de Ciências da
Saúde, UFBA, sob a orientação do Prof.
Dr. Cláudio Roberto Madruga.

SALVADOR, BA

2005

ATA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha esposa, Rejane, e aos meus filhos, Ana Clara e Lucas.

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. Cláudio Roberto Madruga, amigo de todas as horas e orientador.
- Aos meus amigos Carlos Alberto Ramos, Elaine de Pádua e Michelle Carmo de Almeida, sem os quais eu não teria conseguido realizar este trabalho.
- Ao Dr. Stênio Perdigão Fragoso, pelos ensinamentos, colaborações e disposição em ajudar sempre a mim e todos, sempre com um sorriso no rosto e simplicidade.
- À Dra. Maria Ângela Ornelas de Almeida, a quem devo a minha inserção e formação no mundo científico.
- Às Professoras Denise Lamaire e Maria de Fátima, pelo incentivo que sempre me deram.
- Ao Prof. Dr. Geraldo Gileno, pelas sempre oportunas ajudas, conselhos e orientações.
- À colega de doutorado Lenita Santos, por tudo que me ensinou.
- Ao Dr. Cleber Oliveira Soares, por toda ajuda profissional e pessoal que sempre me prestou.
- Ao Dr. Raul Kessler, pela valiosíssima ajuda na execução dos experimentos.
- À Dra Grácia Rosinha, pelas sugestões na elaboração deste trabalho.
- Ao Sr. Rubens Soares, que agüentou os coices e chifradas dos animais sempre de bom humor e disposição.
- Aos Doutores Roberto Torres Júnior e Valter Joost van Onselen, pela orientação na análise estatística.
- Às estagiárias do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Gado de Corte Gisele Bacanelli e Maristelli Oliveira.
- À Embrapa Gado de Corte, pela possibilidade da realização deste trabalho.
- À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), pelo financiamento deste trabalho.
- Ao CNPq, pela bolsa de doutorado.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	6
2.1. <i>Geral</i>	6
2.2. <i>Específicos</i>	6
3. REVISÃO DE LITERATURA	7
3.1. Taxonomia	7
3.2. Organização genômica geral	8
3.3. Metabolismo	8
3.4. Transmissão	10
3.5. Ciclo evolutivo	11
3.6. Patogenia e sinais clínicos	12
3.7. Imunidade contra <i>A. marginale</i>	14
3.8. Progressos na imunização contra <i>A. marginale</i>	17
3.8.1. Proteínas principais de superfície de <i>A. marginale</i> : caracterização e importância como imunógenos	17
3.8.2. Imunização utilizando <i>A. marginale</i> proveniente de cultura celular	34
3.9. CpG ODN: receptores e efeitos no sistema imune	37
3.9.1. Receptores <i>Toll-like</i>	37
3.9.2. CpG ODNs: estrutura e efeitos sobre o sistema imune	39
3.9.3. Utilização de CpG ODN como adjuvante em ruminantes	44
4. MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1. Extração de DNA genômico de <i>A. marginale</i>	47
4.2. Amplificação de fragmentos de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR)	47
4.3. Clonagem de genes a partir dos produtos de PCR	49
4.4. Seqüenciamento dos insertos	50
4.5. Expressão de <i>msp1a</i> e <i>msp2</i>	50
4.6. Purificação das proteínas recombinantes	51
4.7. Análise das proteínas recombinantes por eletroforese	52
4.8. <i>Western blot</i>	52
4.9. Determinação da concentração das proteínas recombinantes	54
4.10. Imunização dos bovinos experimentais	54

4.11. Monitoramento clínico e laboratorial dos bovinos imunizados	55
4.12. Detecção de IgG contra MSP1a e MSP2 recombinantes por ELISA indireto	56
4.13. Detecção de IgG ₂ contra MSP1a e MSP2 recombinantes por ELISA indireto	58
4.14. PCR para detecção de <i>A. marginale</i> , baseado no gene <i>msp5</i>	59
4.15. Avaliação da resposta proliferativa de células mononucleares de sangue periférico dos animais experimentais	60
4.16. Análise estatística	62
5. RESULTADOS	64
5.1. Clonagem e expressão de <i>msp1a</i> e <i>msp2</i>	64
5.2. Padronização e desempenho dos testes de diagnóstico (ELISAs indiretos para IgG total contra MSP1a e MSP2 recombinantes e PCR para <i>msp5</i>)	71
5.3. Avaliação bacteriológica, hematológica e imunológica dos bovinos experimentais	79
6. DISCUSSÃO	93
7. CONCLUSÕES	106
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
9. ANEXOS	127
9.1. Dados clínicos, bacteriológicos e sorológicos dos bovinos experimentais	127
9.2. Avaliação da imunidade celular dos bovinos experimentais	135
9.3. Trabalho submetido para publicação	137

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
Figura 1. Amplificação por reação da polimerase em cadeia (PCR) de <i>msp1a</i> e <i>msp2</i> de isolado brasileiro (Pernambuco-Zona da Mata) de <i>Anaplasma marginale</i>	65
Figura 2. Expressão de <i>msp1a</i> de isolado brasileiro (Pernambuco-Zona da Mata) de <i>Anaplasma marginale</i> .	66
Figura 3. Expressão de <i>msp2</i> de isolado brasileiro (Pernambuco-Zona da Mata) de <i>Anaplasma marginale</i> .	67
Figura 4. <i>Western blot</i> com MSP1a recombinante de isolado brasileiro (Pernambuco-Zona da Mata) de <i>Anaplasma marginale</i> e soros de bovinos soropositivos para a riquetsia de diferentes regiões do Brasil.	68
Figura 5. <i>Western blot</i> com MSP2 recombinante de isolado brasileiro (Pernambuco-Zona da Mata) de <i>Anaplasma marginale</i> e soros de bovinos soropositivos para a riquetsia de diferentes regiões do Brasil.	69
Figura 6. <i>Western blot</i> com MSP2 recombinante de isolado brasileiro (Pernambuco-Zona da Mata) de <i>Anaplasma marginale</i> e anticorpo monoclonal ANA70A2.	70
Figura 7. Reação da polimerase em cadeia para <i>msp5</i> de <i>Anaplasma marginale</i> em bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de <i>Anaplasma marginale</i> e controles, e posterior desafio com a riquetsia.	75
Figura 8. Percentual de bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de <i>Anaplasma marginale</i> e controles, e posteriormente desafiados com a riquetsia, positivos na reação da polimerase em cadeia (PCR) para gene <i>msp5</i> e exame de distensões sanguíneas coradas.	76
Figura 9. Percentual de bovinos infectados experimentalmente com <i>Anaplasma marginale</i> positivos na reação da polimerase em cadeia (PCR) para gene <i>msp5</i> e nos ELISAs com MSP1a e MSP2 recombinantes.	78
Figura 10. Médias e desvios-padrões dos volumes globulares dos bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de <i>Anaplasma marginale</i> e controles, posteriormente desafiados com essa riquetsia.	81
Figura 11. Médias e desvios-padrões das temperaturas retais dos bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de <i>Anaplasma marginale</i> e controles, posteriormente desafiados com essa riquetsia.	82
Figura 12. Médias e desvios-padrões das riquetsemias dos bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de <i>Anaplasma marginale</i> e controles, após o desafio com a riquetsia.	83
Figura 13. Produção de IgG total contra MSP1a em bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de <i>Anaplasma marginale</i> e controles, posteriormente desafiados com a riquetsia.	86
Figura 14. Produção de IgG total contra MSP2 em bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de <i>Anaplasma marginale</i> e controles, posteriormente desafiados com a riquetsia.	87

Figura 15. Produção de IgG ₂ contra MSP1a em bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de <i>Anaplasma marginale</i> e controles, posteriormente desafiados com a riquetsia.	90
Figura 16. Produção de IgG ₂ contra MSP2 em bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de <i>Anaplasma marginale</i> e controles, posteriormente desafiados com a riquetsia.	91
Figura 17. Respostas proliferativas de células mononucleares de sangue periférico de bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de <i>Anaplasma marginale</i> e posteriormente desafiados com a riquetsia, e controles (ELISA para incorporação de 5-bromo-2' desoxiuridina).	92
Tabela 1. Desempenhos dos testes de imunoadsorção enzimática indireta (ELISA) com MSP1a e MSP2 recombinantes na detecção de anticorpos contra <i>Anaplasma marginale</i> .	72
Tabela 2. Concordância entre os testes de imunoadsorção enzimática indireta (ELISA) com MSP1a e MSP2 recombinantes de isolado brasileiro (Pernambuco-Zona da Mata) de <i>Anaplasma marginale</i> , usando soros de três mesorregiões do Estado de Pernambuco.	73
Tabela 3. Parâmetros clínicos e hematológicos de bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de <i>Anaplasma marginale</i> e controles.	80
Quadro 1. Volumes globulares dos bovinos experimentais	127
Quadro 2. Temperaturas retais dos bovinos experimentais	128
Quadro 3. Riquetsemias dos animais experimentais	129
Quadro 4. Resultados das PCRs dos animais experimentais	130
Quadro 5. Resultados dos ELISA para IgG total anti-MSP1a	131
Quadro 6. Resultados dos ELISA para IgG total anti-MSP2	132
Quadro 7. Resultados dos ELISA para IgG ₂ anti-MSP1a	133
Quadro 8. Resultados dos ELISA para IgG ₂ anti-MSP2	134
Quadro 9. Resultados dos ensaios de proliferação celular dos animais experimentais	135

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Amp: ampicilina

BrdU: 5-bromo-2' desoxiuridina

CAA: célula apresentadora de antígeno

CCR7: *chemokine (C-C motif) receptor 7*

Células DM: células dendríticas mielóides

Células DP: células dendríticas plasmocitóides

CHP: complexo de histocompatibilidade principal

CMSP: células mononucleares de sangue periférico

ConA: concanavalina A

CpG: citosina-fosfato-guanosina

C-terminal: carboxi-terminal

CXCR3: *chemokine (C-X-C motif) receptor 3*

DH: domínio hidrofílico

DO: densidade óptica

DP: desvio-padrão

DPBS: salina fosfatada de Dullbelcco

DPD: dia pós-desafio

ELC: *Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine*

ELISA: ensaio de imunoadsorção enzimático

ERK: *extracellular signal-regulated kinase*

Fc: fração cristalizável

IE: índice de estimulação

IFI: imunofluorescência indireta

IFN: interferon

IL: interleucina

IP-10: *IFN-inducible protein-10*

IPTG: isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

Kd: Kilodaltons

LB: Luria-Bertani

LPS: lipopolissacarídeo

MSP: *Major Surface Proteins*

MyD88: *myeloid differentiation factor 88*
NF- κ B: *Nuclear Factor-Kappa B*
NO: óxido nítrico
N-terminal: amino-terminal
ODN: oligodinucleotídeos
OMP: outer membrane proteins
OpAGs - *operon associated genes*
Pb: pares de bases
PBS: salina fosfatada tamponada
PBST: salina fosfatada tamponada com tween
PCR: *polymerase chain reaction*
Pg: genes parciais
PLM: proteína de ligação à maltose
RCH: região central hipervariável
SDS: dodecil sulfato de sódio
SFB: soro fetal bovino
SLC: *secondary lymphoid tissue chemokine*
TCR: receptor de células T
TGF- β : *transforming growth factor- β*
TIR: domínio Toll-Interleucina-1
TLR: receptor *Toll-like*
TNF- α : fator de necrose tumoral- α
UV: ultra-violeta
VG: volume globular

RESUMO

A anaplasmosose é uma importante enfermidade de bovinos de áreas tropicais e subtropicais do mundo, causada pela riquetsia intra-eritrocítica *Anaplasma marginale*. A vacinação tem sido a forma mais econômica e eficiente de controlar a anaplasmosose bovina. No entanto, os métodos de imunização tradicionais, que utilizam organismos provenientes de eritrócitos infectados, apresentam limitações em seu uso, razão pela qual, estudos para o descobrimento de novos imunógenos são necessários. Nos últimos anos, esses estudos têm se concentrado nas proteínas de membrana da riquetsia, sobretudo MSP1a e MSP2, as quais mostraram-se promissoras em ensaios de proteção com as proteínas nativas, utilizadas isoladamente. Este trabalho teve como objetivo geral testar a imunoproteção induzida pelas proteínas de membrana MSP1a e MSP2 recombinantes de *A. marginale*, associadas com adjuvante CpG ODN 2006, frente a desafio heterólogo e avaliar a resposta imune gerada pela imunização. Para tanto, diversas etapas experimentais foram executadas, desde a clonagem e expressão dos genes que codificam as duas proteínas, padronização dos testes de diagnóstico usados no estudo, imunização e desafio dos animais experimentais e acompanhamento das respostas imunes humoral e celular. Os ELISAS indiretos baseados em MSP1a e MSP2 recombinantes apresentaram sensibilidades de 99,0% e especificidades de 100% (para ambos os testes). A PCR para o gene *msp5* da riquetsia detectou infecções ainda no período pré-patente, antes da conversão sorológica. Os bovinos da raça Aberdeen Angus foram imunizados três vezes com 200 µg de MSP2 e/ou MSP1a recombinantes (produzidas a partir do isolado Pernambuco – Zona da Mata), associadas com CpG ODN 2006 e alúmen. Posteriormente, foram desafiados com 3×10^7 eritrócitos infectados do isolado heterólogo de *A. marginale* (Mossoró - Rio Grande do Norte). Os animais experimentais apresentaram quadro clínico de anaplasmosose (redução do volume globular, febre e riquetsemias detectáveis por distensões sangüíneas coradas). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos imunizados e os controles (que receberam CpG ODN 2006 e alúmen ou alúmen isoladamente) quanto ao percentual de redução do volume globular, riquetsemias máximas e temperaturas retais máximas, indicando que as imunizações não foram protetoras. Apesar da significativa produção de IgG total contra MSP1a e MSP2, detectada no dia do desafio, os animais imunizados apresentaram produção significativa de

IgG₂ apenas contra MSP1a. Não foi possível detectar resposta proliferativa de células mononucleares de sangue periférico, tanto no momento do desafio quanto após o pico das riquetsemias. Possivelmente, a ausência de proteção deveu-se a uma deficiente ou ausente estimulação de imunidade celular nos bovinos imunizados.

Palavras-chave: *Anaplasma marginale*, proteínas recombinantes, imunização, bovino.

ABSTRACT

Anaplasmosis is an important disease of cattle of tropical and subtropical areas of the world, caused by the intra-erythrocytic rickettsia *Anaplasma marginale*. Vaccination has been the most economical and efficient method to control anaplasmosis. Nevertheless, the traditional methods of immunization, which use *A. marginale* from infected blood, show limitations. Thus, studies concerning the development of new immunogens are important. In the last years, such studies have focused on the membrane proteins of the rickettsia, specially MSP1a and MSP2, which were the most promising in protection assays as native proteins, used individually. The main objective of this study was to evaluate the protection afforded by recombinant MSP1a and MSP2 of *A. marginale*, associated with CpG ODN 2006, against heterologous challenge, and evaluate the immune response elicited. For this purpose, various experiments were conducted, involving cloning and expression of the genes that encode both proteins; the standardization of the diagnostic tests; immunization and challenge of cattle and evaluation of the humoral and cellular responses. The indirect ELISAs, based on recombinant MSP1a and MSP2, showed sensitivities of 99.0% and specificities of 100% (for both tests). The PCR for *msp5* was able to detect infections even in the prepatent period, before the serological conversion. Cattle (Aberdeen Angus breed) were immunized three times with 200 µg of recombinant MSP2 and/or MSP1a (from Pernambuco - Zona da Mata isolate), associated with CpG ODN 2006 and alum. Then, cattle were challenged with 3×10^7 infected erythrocytes with the heterologous isolate of *A. marginale* from Mossoró - Rio Grande do Norte. The animals showed typical signs of anaplasmosis (reduction of packed cell volume, fever and detectable rickettsemias). No differences were detected between immunized and control groups with regards to the percentual of reduction of packed cell volume, maximum rickettsemias, or maximum rectal temperatures, indicating that the immunizations were not protective. Despite the significant production of total IgG to MSP1a and MSP2 at the challenge, cattle produced significant levels of IgG₂ only against MSP1a. It was not possible to detect proliferative responses of periferical blood mononuclear cells, neither at the challenge nor after peak rickettsemias. Possibly, the lack of protection was due to a weak or absent stimulation of cellular immunity in immunized cattle.

Key words: *Anaplasma marginale*, recombinant proteins, immunization, cattle.

1. INTRODUÇÃO

A anaplasnose bovina é causada pela riquetsia intra-eritrocítica da família Anaplasmataceae *Anaplasma marginale* (KOCAN *et al.*, 2003). Esta espécie ocorre em áreas tropicais e subtropicais do mundo (RIDING *et al.*, 2003), sendo transmitida principalmente por carrapatos ixodídeos (KOCAN *et al.*, 2003; RIKIHISA, 2003). Mais de 20 espécies de carrapato foram citadas como vetores biológicos (DIKMANS, 1950), sendo que no Brasil, *Boophilus microplus* é o único vetor biológico identificado (KESSLER e SCHENK, 1998).

A fase aguda da anaplasnose bovina é caracterizada por altas riquetsemias ($>10^9$ eritrócitos infectados por mL de sangue) (FRENCH *et al.*, 1998). Os eritrócitos infectados são posteriormente fagocitados por macrófagos, especialmente no baço, resultando em anemia de branda a severa, e icterícia sem ocorrência de hemoglobinemia ou hemoglobinúria. Os sinais clínicos incluem febre, perda de peso, aborto, letargia e morte, principalmente em animais acima de dois anos (AJAYI *et al.*, 1978; KOCAN *et al.*, 2003). Os animais que sobrevivem a esta fase permanecem persistentemente infectados, com baixas riquetsemias cíclicas, não detectáveis microscopicamente (10^4 a 10^6 eritrócitos infectados/mL de sangue), servindo como reservatórios para transmissão por carrapatos (KIESER *et al.*, 1990; ERIKS *et al.*, 1993).

A anaplasnose bovina causa importantes prejuízos econômicos, principalmente devido à alta morbidade e mortalidade em rebanhos bovinos susceptíveis. Estas perdas são medidas por diversos parâmetros, como redução de peso e da produção de leite, abortos, custos com tratamentos e mortalidade. No entanto, poucos estudos controlados foram conduzidos para determinar os prejuízos com anaplasnose, destacando-se a estimativa de U\$ 875 milhões/ano

na América Latina (BROWN, 1997). No Brasil, as perdas econômicas com a Tristeza Parasitária Bovina (a qual inclui, além de *A. marginale*, os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*) são consideráveis, atingindo, segundo estimativas do Ministério da Agricultura, atualizadas por GRISI *et al.* (2002), 500 milhões de dólares anuais, na qual *A. marginale* teria uma das principais participações nesse valor. Em geral, estes estudos não contemplam um dos mais importantes impactos: a limitação do uso de raças européias (*Bos taurus*), sabidamente mais susceptíveis à anaplasnose, em programas de melhoramento genético nos países de clima tropical (KOCAN *et al.*, 2003). Dessa forma, os esforços na busca de programas mais eficazes de controle desta enfermidade são justificáveis.

O controle da anaplasnose é realizado pela redução das populações de vetores, utilizando acaricidas; pela aplicação de antibióticos e por vacinação. O controle de carrapatos não é prático em muitas áreas e protege apenas parcialmente contra *A. marginale*, já que essa riquetsia pode ser transmitida por outros mecanismos. A quimioprofilaxia, utilizando tetraciclina, é dispendiosa e seu uso intensivo pode levar à seleção de cepas de *A. marginale* resistentes (KOCAN *et al.*, 2003).

A vacinação tem sido uma forma econômica e eficiente de controlar a anaplasnose bovina. No entanto, os métodos de imunização tradicionais, que utilizam *A. marginale* ou *A. centrale* provenientes de eritrócitos infectados, também apresentam limitações em seu uso, como efeitos adversos em algumas categorias de animais (vacas prenhes, animais adultos), possibilidade de veiculação de agentes patogênicos (no caso da premunicação), sensibilização de vacas contra grupos sanguíneos e conseqüente isoeritrolise neonatal em bezerros (BRIZUELA

et al., 1998; KESSLER e SCHENK, 1998), razões pelas quais, estudos para o desenvolvimento de novos imunógenos são necessários.

Nos últimos anos, os estudos sobre imunização contra *Anaplasma* concentraram-se na obtenção de frações antigênicas. Bovinos imunizados com corpúsculos iniciais ou membrana destes apresentaram significativa redução da anemia e da riquetsemia (MONTENEGRO-JAMES *et al.*, 1991; TEBELE *et al.*, 1991; RODRIGUÉZ *et al.*, 2000). Na membrana, foram inicialmente identificadas seis proteínas principais de superfície (*Major Surface Proteins* - MSPs): MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5 (PALMER e McGUIRE, 1984; BARBET *et al.*, 1987; OBERLE *et al.*, 1988; TEBELE *et al.*, 1991; OBERLE *et al.*, 1993).

Recentemente, novas proteínas de membrana de *A. marginale* foram descobertas, por fracionamento protéico (RIDING *et al.*, 2003) ou por análise genômica (BRAYTON *et al.*, 2005).

A imunização de bovinos com MSP1 (heterodímero composto por MSP1a e MSP1b) nativa protegeu os animais contra desafio com isolados virulentos homólogo e heterólogo de *A. marginale* (PALMER *et al.*, 1986a; PALMER *et al.*, 1989). Da mesma forma, a imunização de bovinos com MSP2 nativa também induziu proteção contra desafio com isolados homólogo e heterólogo da riquetsia, com proteção variando de parcial a completa (PALMER *et al.*, 1988).

O mecanismo de resposta imune contra a infecção por *A. marginale* não foi completamente elucidado, mas existem evidências que a interação entre os elementos humorais e celulares é fundamental. O micro-ambiente criado por citocinas como Interferon-gama (IFN- γ), determina o equilíbrio entre as subpopulações de células T CD4⁺ tipo 1 (Th1) e T CD4⁺ tipo 2 (Th2), resultando num ambiente favorável para que antígenos de sub-unidade induzam resposta

imune predominantemente do tipo celular. GALE *et al.* (1997) e BROWN *et al.* (1998a e 1998b) confirmaram a participação de células T CD4⁺, INF- γ e IgG₂ na proteção contra *A. marginale* em animais imunizados. Em bovinos, o IFN- γ é responsável pelo incremento na produção de IgG₂ e ativação de macrófagos, a fim de que estes produzam moléculas como o óxido nítrico, substância inibidora de patógenos intracelulares como protozoários e riquetsias (BROWN *et al.*, 1998a, b).

A correta apresentação de proteínas de superfície ao sistema imune pode representar importante passo para o desenvolvimento de imunidade. Com base nessa afirmativa, MONTENEGRO-JAMES *et al.* (1991) e PALMER e McELWAIN (1995) propuseram a utilização de antígenos de superfície associados a adjuvantes apropriados, como forma de otimizar a estimulação imunológica específica, por meio da apresentação de antígenos aos linfócitos.

O DNA de bactérias é reconhecido por mamíferos, ativando células apresentadoras de antígeno (CAA) via receptor *Toll-like* 9 (TLR9), resultando em ativação de genes associados com resposta inflamatória. Seqüências de oligodinucleotídeo (ODN) citosina-fosfato-guanosina (CpG), flanqueadas por certas bases, ativam diferentes leucócitos em distintas espécies animais (ZHANG *et al.*, 2003).

O CpG ODN 2006 (TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT) possui efeito adjuvante em bovinos, tendo estimulado resposta Th1 contra MSP2 de *A. marginale* com alta produção de IFN- γ (ZHANG *et al.*, 2003). No entanto, não se sabe se esta combinação é protetora contra desafio com a riquetsia em bovinos, e a dosagem de CpG ODN empregada naquele estudo (1 mg por imunização) é onerosa, sendo necessários estudos para avaliar menor dose em bovinos.

As estratégias de imunização, até o momento, empregaram MSPs isoladamente. Não há estudos comparando a eficácia de combinações de MSPs. Desta forma, este trabalho teve como objetivos desenvolver e avaliar um sistema de imunização contra a anaplasose, baseado em MSP1a e MSP2 recombinantes, associadas a CpG ODN 2006 como adjuvante. A escolha destas duas proteínas deveu-se ao fato de apresentarem maior potencial, em sua forma nativa, como imunógenos para estimulação de respostas celulares contra *A. marginale*, além de serem proteínas imunodominantes da riquetsia, associadas a funções importantes, como a adesão a células dos hospedeiros e evasão da resposta imune, respectivamente.

2. OBJETIVOS

Geral

Desenvolver um método de imunização, baseado em antígenos de membrana externa MSP1a e MSP2 recombinantes, associados a CpG ODN 2006 como adjuvante, que induza proteção contra anaplasnose e seja mais seguro e eficaz do que os métodos tradicionais de vacinação (premunização e vacinas vivas atenuadas).

Específicos

- Clonar e expressar os genes *msh1a* e *msh2* de *Anaplasma marginale* em *Escherichia coli*;
- purificar as proteínas recombinantes e utilizá-las como imunógenos em bovinos, associadas com CpG ODN 2006 e alúmen;
- padronizar ensaios de imunoadsorção enzimática (ELISA) indiretos baseados em MSP1a e MSP2 recombinantes e PCR para o acompanhamento dos animais imunizados;
- avaliar o grau de proteção induzido pelo imunógeno frente a desafio com *A. marginale* virulento e a resposta imunológica gerada.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Taxonomia

Anaplasma marginale pertence ao Super-reino Bacteria, Filo Proteobacteria, Classe Alphaproteobacteria, Ordem Rickettsiales, Família Anaplasmataceae (THEILER, 1910; DUMLER *et al.*, 2001; YU *et al.*, 2001). Recentemente, DUMLER *et al.* (2001) propuseram a reorganização da Ordem Rickettsiales, baseando-se em análises de seqüências de ácidos nucléicos (16S rRNA e *groESL*), propriedades antigênicas, ecologia, distribuição geográfica e patogenia.

Nesta proposição, foram incluídos ao gênero *Anaplasma* os membros do grupo de *Ehrlichia phagocytophila*, incluindo *E. phagocytophila*, *Ehrlichia equi* e o agente da erliquiose granulocítica humana, assim como *Ehrlichia bovis* e *Ehrlichia platys*. Desse modo, o gênero *Anaplasma* inclui organismos Gram-negativos, pequenos, geralmente pleomórficos, cocóides a elipsoidais, que residem em vacúolos citoplasmáticos, isoladamente, ou mais freqüentemente, formando inclusões compactas (mórulas), presentes em células hematopoiéticas maduras ou imaturas, particularmente células mielóides e neutrófilos, e incluindo eritrócitos, em sangue periférico ou tecidos, usualmente em órgãos ricos em fagócitos mononucleares (baço, fígado e medula óssea) de hospedeiros mamíferos. Por ultra-estrutura, duas formas morfológicas são observadas: grandes células reticuladas e pequenas formas com protoplasma condensado (POPOV *et al.*, 1998). São imóveis e não cultiváveis em meio livre de células. São agentes etiológicos de doenças em canídeos, humanos e ruminantes, como bovinos, caprinos e ovinos. Seus vetores, quando conhecidos, são carrapatos (DUMLER *et al.*, 2001).

3.2. Organização genômica geral

O genoma do isolado norte-americano Saint Maries de *A. marginale* foi recentemente clonado em cromossomo artificial bacteriano, seqüenciado e anotado (BRAYTON *et al.*, 2005), apresentando 1.197.687 pares de bases (pb) e um conteúdo de C-G de 49,8%. O genoma possui uma alta densidade de genes codificantes (86,0%), típica de bactérias intracelulares que possuem um mínimo de genes necessários para manutenção da vida em nichos ambientais particulares. Foram encontradas 949 seqüências de DNA codificantes, com um tamanho médio de 1.077 pb, um único operon de genes de RNA ribossomais e 37 genes de RNA transportadores, representando todos os 20 aminoácidos.

Acredita-se que ocorreu evolução redutiva do genoma desta riquetsia, a partir de um precursor maior. Esta evolução seria resultante de mutações iniciais, levando à perda da função de genes não essenciais para sobrevivência intracelular, seguida de progressivo acúmulo de mutações e eventual deleção gênica (ANDERSON *et al.*, 1998; PALMER, 2002).

Nosso grupo de pesquisa na Embrapa Gado de Corte está em fase de anotação preliminar do genoma de um isolado brasileiro de *A. marginale* (Pernambuco-Zona da Mata), o que poderá contribuir para descoberta de novos imunógenos e alvos para controle da anaplasnose mais aplicados às condições brasileiras.

3.3. Metabolismo

Pela reconstrução metabólica de *A. marginale*, baseada na anotação de seu genoma, BRAYTON *et al.* (2005) constataram que a maioria das enzimas

glicolíticas estava presente, mas nenhuma glicoquinase ou sistema de transporte de açúcar foi detectado, sugerindo que esta riquétisia pode primariamente usar gliconeogênese. Além disso, não foram encontradas as principais enzimas da via Entner-Doudoroff. Poucos genes para enzimas envolvidas na biossíntese de aminoácidos foram detectados, não sendo possível identificar vias completas. A respiração aeróbica ocorre provavelmente pela via ciclo do ácido tricarboxílico, para o qual, um grupo completo de enzimas foi encontrado. As enzimas para a via não oxidativa das pentoses fosfatos estavam presentes, embora a transaldolase não pudesse ser definitivamente identificada. Todas as enzimas para síntese de ácidos graxos e as vias completas para a síntese *de novo* de purinas e pirimidinas foram detectadas.

Diversos genes para síntese de parede celular (lipopolissacarídeo-LPS, lipídeo A, peptidoglicano) não foram identificados (BRAYTON *et al.*, 2005). A ausência de uma parede celular tradicional parece ser uma característica da família Anaplasmataceae, já que *A. phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis* e *Neorickettsia sennetsu* não possuem genes para síntese de lipídeo A e nem a via completa de síntese de peptidoglicano (LIN e RIKIHISA, 2003). Isso parece ser uma adaptação desta família à sobrevivência intracelular, pois alguns de seus membros são fagocitados ou são parasitos de monócitos/macrófagos e neutrófilos, células que possuem receptores *Toll-like*, que se ligam a LPS e peptidoglicano, estimulando respostas imunes inatas nas células, que incluem fagocitose, fusão lisossomo-fagossomo, liberação de intermediários do oxigênio e secreção de mediadores pró-inflamatórios. A perda de genes para síntese de lipídeo A e de peptidoglicano pode aumentar as chances de sobrevivência intracelular (LIN e RIKIHISA, 2003).

3.4. Transmissão

A transmissão de *A. marginale* ocorre mecânica e biologicamente. A transmissão biológica de *A. marginale* é efetuada por carrapatos ixodídeos, e aproximadamente 20 espécies foram citadas como vetores (DIKMANS, 1950; EWING, 1981). A transmissão por carrapatos pode ocorrer estágio a estágio (transestadial) ou por um mesmo estágio (intra-estadial) (KOCAN *et al.*, 2003). A transmissão intra-estadial de *A. marginale* é efetuada por carrapatos machos. Estudos mostraram que o macho de *Dermacentor* desempenha um importante papel na transmissão biológica de *A. marginale*, pois tornam-se persistentemente infectados com a riquetsia, podendo transmiti-la repetitivamente quando se transferem entre bovinos (KOCAN *et al.*, 1992a, b), funcionando, desta forma, como reservatórios.

Os carrapatos adquirem *A. marginale* quando se alimentam em bovinos nas fases aguda da infecção (80%) ou crônica (27%) da infecção (ERIKS *et al.*, 1993).

A transmissão de genótipos de *A. marginale* por carrapatos parece ser estocástica. De 75 bovinos de área de instabilidade enzoótica (29% de bovinos soropositivos), 70 estavam infectados por um único genótipo, definido pelo seqüenciamento da região amino (N) terminal de *mSP1a*, porém cinco bovinos apresentavam superinfecção por dois genótipos distintos (PALMER *et al.*, 2004).

A transmissão transovariana (de uma geração de carrapato para outra) parece não ocorrer (STICH *et al.*, 1989), muito embora, recentemente, tenha sido relatada a detecção de larvas de *B. microplus* positivas para *A. marginale* por reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR) (gene *mSP5*), em amostras de larvas colhidas em pastagens de área endêmica para a riquetsia

(14%) e provenientes de teleóginas alimentadas em bezerros com baixa riquetsemia (11%) (SHIMADA *et al.*, 2004).

A transmissão mecânica freqüentemente ocorre via fômites contaminados com sangue, como agulhas, instrumentos de descorna e de tatuagem, aparatos de colocação de brincos, e instrumentos de castração (KOCAN *et al.*, 2003). Também é realizada por dípteros hematófagos dos gêneros *Tabanus* e *Stomoxys* e mosquitos (EWING, 1981; POTGIETER *et al.*, 1981; FOIL, 1989), sendo considerada a principal forma de disseminação de *A. marginale* nas áreas da Américas Central e do Sul e África onde carrapatos vetores não ocorrem (EWING, 1981; FOIL, 1989).

Em adição às formas de transmissão descritas, *A. marginale* pode ser transmitido *in utero*, a partir do segundo trimestre de gestação (ZAUGG e KUTLER, 1984; ZAUGG, 1985). Na África do Sul, esse tipo de transmissão ocorreu com prevalência de 15,6% (POTGIETER e RENSBURG, 1987).

3.5. Ciclo evolutivo

O ciclo evolutivo de *A. marginale* em carrapatos é complexo e é coordenado com o ciclo de alimentação dos artrópodes (KOCAN *et al.*, 1992 a, b). Os eritrócitos infectados ingeridos pelo carrapato no repasto sangüíneo são a fonte de infecção por *A. marginale*. Após o desenvolvimento da riquetsia nas células intestinais, outros tecidos do carrapato tornam-se infectados, como a glândula salivar, a partir da qual, as riquetsias são transmitidas para vertebrados durante a alimentação (KOCAN *et al.*, 1992 a, b; GE *et al.*, 1996). Por meio de PCR, evidenciou-se que a infecção das glândulas salivares dos carrapatos por *A. marginale* ocorre pouco tempo (dois dias) após a ingestão de sangue infectado,

não sendo, portanto, um evento tardio, como se supunha pela análise histológica (LÖHR *et al.*, 2002b). A riquetsia se desenvolve em vacúolos ligados à membrana ou colônias, sendo a primeira forma visualizada a reticulada (vegetativa), que se divide por fissão binária, formando grandes colônias que contém centenas de organismos. Essa forma então muda para a corpúsculos densos, que é o estágio infectante e pode sobreviver fora das células do hospedeiro. Os bovinos se tornam infectados quando as formas densas são transmitidas durante a alimentação dos carrapatos, via glândula salivar (KOCAN *et al.*, 2003). Após a penetração dos eritrócitos, formando um vacúolo parasitóforo a partir da membrana célula hospedeira (FRANCIS *et al.*, 1979), ocorre multiplicação de *A. marginale*, de forma que cada inclusão (com até 1 μm de diâmetro) pode conter quatro a 10 corpúsculos iniciais (RISTIC e WATRACH, 1963).

3.6. Patogenia e sinais clínicos

O período pré-patente da infecção por *A. marginale* varia com o número de organismos infectantes, estendendo-se de sete a 60 dias, com média de 28 dias (KOCAN *et al.*, 2003). Após a infecção, o número de eritrócitos infectados aumenta geometricamente. As células parasitadas são subseqüentemente fagocitadas por macrófagos, principalmente no baço, resultando em anemia branda a severa e icterícia, sem ocorrência de hemoglobinemia ou hemoglobinúria (KOCAN *et al.*, 2003). No curso da anemia induzida pela anaplasmose não ocorre depressão da medula óssea. Ao contrário, os bovinos apresentam hiperplasia eritróide, que constitui um mecanismo compensatório (JATKAR e KREIER, 1967).

Outros sinais clínicos são febre, perda de peso, aborto e letargia. A morte pode ocorrer principalmente em animais acima de dois anos de idade (AJAYI *et al.*,

1978; KOCAN *et al.*, 2003). Os animais que sobrevivem à fase aguda da anaplasmosose desenvolvem infecções persistentes, caracterizadas por baixas riquetsemias cíclicas (10^4 a 10^6 eritrócitos infectados por mL de sangue) e tornam-se reservatórios de *A. marginale* (KIESER *et al.*, 1990; ERIKS *et al.*, 1993). A remoção do baço de bovinos portadores crônicos resulta em recrudescência da riquetsemia e o aparecimento de sintomatologia (YOUNG *et al.*, 1977).

A severidade da anemia na anaplasmosose parece não estar relacionada diretamente ao número de organismos infectantes. GALE *et al.* (1996) inocularam bovinos Hereford, com 12 meses de idade, soronegativos para *A. marginale*, com 10^6 , 10^8 e 10^{10} eritrócitos infectados com a riquetsia, e todos os animais apresentaram redução de volume globular para 15%, quando foram tratados. A média da riquetsemia máxima do grupo inoculado com 10^{10} eritrócitos infectados foi significativamente superior à media do grupo inoculado com 10^6 células infectadas, porém não houve diferenças significativas entre as médias das riquetsemias máximas do grupo inoculado com 10^8 eritrócitos infectados com relação aos outros dois grupos.

As alterações necroscópicas na anaplasmosose bovina são emaciação, desidratação, fígado com aumento de volume e necrose centro-lobular; pulmões com edema, congestão, acúmulo de fluido seroso e infiltração celular. Os linfonodos apresentam edema, hiperplasia e deposição de hemossiderina. No coração são encontradas hemorragias. O baço apresenta-se aumentado de volume e com deposição de hemossiderina. Os rins apresentam-se congestos, e o sangue, com aspecto aquoso (GALHOTRA *et al.*, 1977).

Raças de taurinos (*B. taurus*), como Holandês, Pardo Suíço e Hereford, são mais propensos ao desenvolvimento de anaplasmose aguda do que zebuínos e seus cruzamentos (AGUIRRE *et al.*, 1988).

Em relação à faixa etária, bezerros são menos susceptíveis à anaplasmose, desenvolvendo infecções brandas e imunidade persistente por toda a vida. Este fenômeno é pouco compreendido, mas a remoção do baço torna os bezerros novamente sensíveis à infecção, que é freqüentemente mais severa do que em animais mais velhos (KOCAN *et al.*, 2003). A resistência de bezerros à anaplasmose está, pelo menos em parte, associada à ingestão de anticorpos colostrais. Em bezerros Ibagé, Nelore e seus cruzamentos, a proporção de animais negativos para anticorpos colostrais aumenta a partir dos 30 dias e atinge o máximo aos 60 dias de vida, enquanto as riquetsemias são detectadas a partir dos 30 dias e atingem um pico aos 90 dias (MADRUGA *et al.*, 1985).

3.7. Imunidade contra *A. marginale*

A imunidade contra *A. marginale* requer mecanismos humorais e celulares. Anticorpos direcionados contra corpúsculos iniciais bloqueiam a infectividade da riquetsia (PALMER e McGUIRE, 1984). Na membrana desses corpúsculos foram identificadas proteínas principais de superfície (MSPs) (PALMER e McGUIRE, 1984; BARBET *et al.*, 1987; OBERLE *et al.*, 1988; TEBELE *et al.*, 1991; OBERLE *et al.*, 1993), que induzem a produção de anticorpos, correlacionados com o controle da riquetsemia aguda e anemia (TEBELE *et al.*, 1991). Possivelmente, anticorpos contra MSPs funcionam como opsoninas, facilitando a fagocitose e a eliminação de *A. marginale* por macrófagos, como demonstrado em ensaios *in vitro* com anticorpos de bovinos imunizados com MSP1 (CANTOR *et al.*, 1993). Outra

possível função dos anticorpos é o bloqueio da invasão de eritrócitos pela riquetsia (McGAREY e ALLRED, 1994).

Apesar da importância dos anticorpos na imunidade contra *A. marginale*, é pouco provável que, isoladamente, os mesmos sejam capazes de proteger os bovinos contra a anaplasnose (BROWN *et al.*, 2001b), uma vez que a inoculação de soro de animais imunes em bovinos susceptíveis não protege contra desafio com *A. marginale* (GALE *et al.*, 1992). A importância das respostas celulares, as quais envolvem a participação de linfócitos T auxiliares (CD4⁺), produtores de IFN- γ , foi avaliada por BROWN *et al.* (1998a). Essa citocina ativa macrófagos, aumentando a produção de óxido nítrico (NO), substância que têm ação tóxica sobre riquetsias; estimulando a expressão de receptores de fração cristalizável (Fc) e a fusão de fagossomos e lisossomos (BROWN *et al.*, 1998a). Além disso, demonstrou-se que, em bovinos, o IFN- γ atua sobre linfócitos B, estimulando a produção de IgG₂ (ESTES *et al.*, 1994). Esse isotipo apresenta maior capacidade de promover fagocitose por meio de opsonização do que a IgG₁ (McGUIRE *et al.*, 1979), estando provavelmente envolvido no processo de neutralização da infectividade de corpúsculos iniciais de *A. marginale* mediada por anticorpos (TUO *et al.*, 2000).

VALDEZ *et al.* (2002) investigaram o papel *in vivo* de linfócitos T CD4⁺ durante a anaplasnose aguda, mediante a depleção parcial dessas células com anticorpo monoclonal anti-CD4 em bezerros timectomizados, os quais foram infectados posteriormente com isolado de *A. marginale* da Flórida, não verificando diferenças estatisticamente significativas quanto ao decréscimo do volume globular nem riquetsemia com relação ao grupo controle. Apesar dos animais tratados com anti-CD4 terem controlado a infecção, o papel dos linfócitos T CD4⁺ na resposta

imune contra a riquetsia não foi conclusivo, em função de não terem conseguido depleção completa destas células (VALDEZ *et al.*, 2002). Em um dos experimentos, estes autores demonstraram que os animais tratados com anti-CD4 tiveram níveis quatro a seis vezes inferiores de IgG₁ com relação ao grupo controle e ausência de IgG₂, ambas específicas para MSP2, o que sugere que não há necessidade de altos títulos destas subclasses de anticorpos para o controle da infecção por *A. marginale*.

Outro fator que merece atenção é o papel das células T $\gamma\delta$ no controle da infecção por *A. marginale*. No experimento conduzido por VALDEZ *et al.* (2002), verificou-se expansão progressiva destas células no sangue periférico e baço dos animais infectados. Sabe-se que estas células representam até 75% dos linfócitos T em bezerros (WYATT *et al.*, 1994), os quais, apesar de serem susceptíveis à infecção por *A. marginale*, são mais resistentes ao desenvolvimento de manifestações clínicas do que os animais adultos (JONES *et al.*, 1968). Ademais, os linfócitos $\gamma\delta$ são capazes de lisar células infectadas com *Theileria parva* de maneira não restrita a antígenos do complexo de histocompatibilidade principal (CHP) (DAUBENBERGER *et al.*, 1999). Em culturas de linfócitos de bovinos imunizados com MSP2, foram identificados sete clones de células T $\gamma\delta$ que responderam tanto a *A. marginale* quanto a MSP2, de maneira dependente de CAAs e do receptor de células T (TCR), porém não restrita às moléculas do complexo de histocompatibilidade. Fenotipicamente, estes clones foram TCR $\gamma\delta^+$, CD2⁻, CD3⁺, CD4⁻, CD8⁻, CD3.1⁺, CD3.5⁺ e CD3.8⁺. Dois destes clones produziram níveis significativos de IFN- γ em resposta a *A. marginale* e, em menor grau, a MSP2; enquanto outro clone produziu pequenas quantidades de IFN- γ apenas em resposta a *A. marginale* (LAHMERS *et al.*, 2005).

3.8. Progressos na imunização contra *A. marginale*

3.8.1. Proteínas principais de superfície de *A. marginale*: caracterização e importância como imunógenos

As pesquisas voltadas para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes e seguras estão focalizadas nas proteínas de membrana dos corpúsculos iniciais de *A. marginale*. Essas proteínas são expostas na superfície da riquetsia, sendo facilmente acessíveis ao sistema imunológico do hospedeiro, e também desempenham importantes funções para a sobrevivência do parasito (ARULKANTHAN *et al.*, 1999), tais como aderência e invasão dos eritrócitos do hospedeiro (McGAREY *et al.*, 1994; FUENTE *et al.*, 2001).

Evidências iniciais da importância das proteínas de superfície de *A. marginale* vieram de experimentos de neutralização da infectividade da riquetsia por soro gerado contra corpúsculos iniciais (PALMER e McGUIRE, 1984). Os corpúsculos iniciais ou a membrana desses induziram imunidade protetora em bovinos contra desafio homólogo, refletida por menores riquetsemias e severidade da anemia, quando comparado com controles não imunizados (MONTENEGRO-JAMES *et al.*, 1991; TEBELE *et al.*, 1991), e também contra desafio heterólogo (MONTENEGRO-JAMES *et al.*, 1991; PALMER *et al.*, 1994b).

Bovinos imunizados com membrana externa de *A. marginale* do isolado da Flórida, utilizando saponina como adjuvante, apresentaram proteção total após desafio com isolado homólogo (10^2 eritrócitos infectados) (BROWN *et al.*, 1998a), estando a proteção associada com a produção de IFN- γ por células T CD4⁺ e por IgG₂ (BROWN *et al.*, 1998b).

Na membrana dos corpúsculos iniciais de *A. marginale*, foram inicialmente identificadas seis proteínas principais de superfície: MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5 (PALMER e McGUIRE, 1984; BARBET *et al.*, 1987; OBERLE *et al.*, 1988; TEBELE *et al.*, 1991; OBERLE *et al.*, 1993). As técnicas de eletroforese bidimensional e de análise genômica têm permitido a descoberta de novas proteínas de membrana, ampliando as opções de potenciais imunógenos para o controle da anaplasiose (RIDING *et al.*, 2003; HOPE *et al.*, 2004; BRAYTON *et al.*, 2005).

MSP1

MSP1 é um complexo de duas proteínas, denominadas MSP1a e MSP1b (BARBET *et al.*, 1987; OBERLE *et al.*, 1988). Uma única proteína MSP1a está ligada covalentemente, por pontes dissulfeto, a proteínas MSP1b (VIDOTTO *et al.*, 1994).

A MSP1a é codificada por um único gene (*mSP1a*), porém possui marcante variação de tamanho entre os diferentes isolados de *A. marginale* (46 a 105 kDa), como verificado em isolados brasileiros desta riquetsia (KANO *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003), resultante da presença de um número variável de blocos repetitivos de 28 a 29 aminoácidos, ricos em serina, na região N terminal (OBERLE *et al.*, 1988; ALLRED *et al.*, 1990). Essa região contém um epítipo sensível à neutralização, conservado entre os isolados (PALMER *et al.*, 1987; ALLRED *et al.*, 1990), incluindo brasileiros (KANO *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003), o qual é reconhecido pelos anticorpos monoclonais ANA22B1 e ANA15D2 (McGUIRE *et al.*, 1984; ALLRED *et al.*, 1990).

No genoma de *A. marginale*, isolado Saint Maries, foram identificadas três seqüências de DNA codificantes imediatamente após *msp1a*, que apresentam similaridade com a porção central da região carboxi (C) terminal de MSP1a em termos de predição da estrutura de transmembrana, muito embora apenas duas delas apresentaram identidade, quanto à seqüência protéica, com a região C terminal de MSP1a (30 e 37%) (BRAYTON *et al.*, 2005).

A MSP1b (100 kDa) é codificada por uma pequena família de cinco genes, sendo dois completos e três parciais (BRAYTON *et al.*, 2005). Esta estrutura foi similar nos isolados Saint Maries e Florida, porém as seqüências dos genes não foram idênticas entre isolados, sendo de 95% para *msp1β-1*, 77% para *msp1β-2* (genes completos) e 99% para *msp1β pg1*, 28% para *msp1β pg2* e 3,91% para *msp1β pg3* (*pg* = genes parciais). Não se sabe até o momento se os genes parciais são pseudogenes funcionais, que permitiriam uma variação antigênica em MSP1b (BRAYTON *et al.*, 2005).

As funções da MSP1 são parcialmente conhecidas. Sabe-se que MSP1a e MSP1b atuam como adesinas (McGAREY *et al.*, 1994), estando envolvidas no processo de invasão dos corpúsculos iniciais de *A. marginale* à membrana dos eritrócitos do hospedeiro. Verificou-se também que MSP1a é uma adesina para células de carrapato (FUENTE *et al.*, 2001), influenciando na transmissão de *A. marginale* por esse artrópode.

A região N terminal de MSP1a contém o epitopo B EASTS(S/Q)ASTSS sensível à neutralização, o qual é reconhecido pelo anticorpo monoclonal ANA22B1 (ALLRED *et al.*, 1990). Anticorpos produzidos por coelhos imunizados com MSP1a reduziram a infectividade dos isolados Virginia e Oklahoma de *A. marginale* para células de carrapato (BLOUIN *et al.*, 2003).

Pela expressão de mutantes de *mSP1a* recombinantes em *E. coli*, comprovou-se que a adesão às células de carrapato e eritrócitos de bovino foi mediada pelos domínios repetitivos presentes na região N terminal dessa proteína. Domínios contendo aminoácidos D ou E na posição 20 se ligaram a extratos de células de carrapato, enquanto aqueles contendo um G nesta posição não foram adesivos (FUENTE *et al.*, 2003a).

Os domínios repetitivos de MSP1a são bastante heterogêneos entre diferentes isolados, inclusive em uma mesma região, não gerando, portanto, informações filogeográficas (PALMER *et al.*, 2001; FUENTE *et al.*, 2003b). Baseando-se nas seqüências de DNA destes domínios, isolados brasileiros de *A. marginale* apresentaram alguns genótipos distintos dos relatados na América do Norte (FUENTE *et al.*, 2004).

Motivos conservados ricos em serina também foram descritos em unidades protéicas repetitivas de alta massa molecular de *Ehrlichia canis* e *E. chaffeensis*. Inicialmente, suspeitou-se que esses motivos seriam sítios para uma forma distinta de glicosilação (*O-linked*) (McBRIDE *et al.*, 2000). No caso de MSP1a, a possível glicosilação da proteína explicaria o fato de que, para um determinado isolado, a massa molecular da MSP1, separada em géis de poliacrilamida, ser maior do que o esperado, por meio da análise preditiva de sua seqüência de aminoácidos (ALLRED *et al.*, 1990). Experimentos posteriores, envolvendo MSP1a nativa e recombinante (produzida em *E. coli*) e cromatografia gasosa, demonstraram que efetivamente esta proteína era glicosilada, principalmente nos resíduos de serina/treonina dos domínios repetitivos da região N terminal, mas também na região C terminal da proteína. A deglicosilação química desta proteína reduziu significativamente suas propriedades adesivas, sugerindo que a glicosilação era

importante para a aderência às células de carrapato (GARCIA-GARCIA *et al.*, 2004b).

A imunização de bovinos com a MSP1 nativa protegeu os animais contra desafio com isolado virulento homólogo de *A. marginale* (PALMER *et al.*, 1986a). Posteriormente, verificou-se que a imunização com MSP1 também protegeu bovinos contra desafio com 10^{10} eritrócitos infectados com isolado heterólogo virulento (PALMER *et al.*, 1989).

A imunidade protetora em bovinos imunizados com MSP1 nativa está associada a respostas humorais e celulares. Anticorpos contra MSP1, MSP1a ou MSP1b inibem a ligação de *A. marginale* aos eritrócitos, o que sugere que os mesmos desenvolvem uma atividade neutralizante da invasão da riquetsia às células do hospedeiro (McGAREY e ALLRED, 1994; McGAREY *et al.*, 1994).

Soros de bovinos imunizados com *A. marginale* proveniente de eritrócitos de bovinos reconheceram preferencialmente MSP1a, enquanto soros de bovinos imunizados com a riquetsia proveniente de cultura de células de carrapato reconheceram preferencialmente MSP1b (GARCIA-GARCIA *et al.*, 2004 a, c). Isto é explicado parcialmente pelos níveis de expressão das duas proteínas, já que MSP1a é expressa principalmente em *A. marginale* proveniente de eritrócitos de bovinos, enquanto MSP1b é expressa tanto em *A. marginale* proveniente de eritrócitos de bovinos quanto em células de carrapato (GARCIA-GARCIA *et al.*, 2004c). Em animais imunizados com MSP1a recombinante, *A. marginale* proveniente de eritrócitos de bovinos ou de cultura de células de carrapato, ou combinação de MSP1a recombinante e *A. marginale* proveniente de cultura de células de carrapato, a resposta humoral contra MSP1a foi dirigida principalmente contra a região N terminal que contém os domínios repetitivos, enquanto baixos

níveis de anticorpos foram dirigidos contra a região C terminal. Na região N terminal, o peptídeo SSAGGQQQESS foi reconhecido pela coleção de soros dos animais imunizados (GARCIA-GARCIA *et al.*, 2004a).

Em outro estudo, soros de bovinos imunizados com MSP1 nativa reconheceram MSP1a e MSP1b, não havendo diferenças significativas nos títulos de anticorpos contra as duas proteínas, sendo IgG a classe de anticorpo predominantemente direcionada contra a MSP1. Na MSP1a, epitopos foram reconhecidos nas regiões N e C terminais (BROWN *et al.*, 2001b).

A participação de células T CD4⁺ na imunidade contra MSP1 também foi avaliada. Células mononucleares de sangue periférico (CMSP) e células T CD4⁺ de bovinos imunizados com MSP1 proliferaram intensamente em resposta a isolado homólogo e heterólogo de *A. marginale*. Analisada a participação de MSP1a e MSP1b nessas respostas, verificou-se que os epitopos T conservados estavam localizados na região C terminal da MSP1a, a qual estimulou altos níveis de IFN- γ . Houve fraca ou nenhuma resposta celular contra MSP1b. Em contraste, houve uma forte resposta humoral contra MSP1a e MSP1b, esses fatos sugerindo que na resposta imune contra MSP1, linfócitos T específicos para MSP1a funcionam como células auxiliaadoras para linfócitos B específicos para MSP1b (BROWN *et al.*, 2001b).

Na MSP1a do isolado Virginia de *A. marginale*, a análise preditiva de proteínas transmembranares revelou um grande domínio hidrofílico (DH), estendendo-se dos aminoácidos 1 a 366, e um domínio hidrofóbico dos aminoácidos 367 a 593 (BROWN *et al.*, 2002). Em bovinos imunizados com MSP1, o DH recombinante estimulou respostas proliferativas comparáveis àquela contra MSP1a excluindo a região repetitiva (aminoácidos 68 a 593) (BROWN *et al.*, 2002).

O mapeamento dos peptídeos determinou um mínimo de cinco epitopos conservados nos aminoácidos 151 a 359, que estimularam células T CD4⁺ de bovinos expressando haplótipos DR-DQ comuns na raça Holandesa. Peptídeos representando três epitopos (aminoácidos 231 a 266, 270 a 279, e 290 a 319) estimularam células T CD4⁺ de maneira restrita a DR. Um epitopo T CD4 restrito a DQ, presente na região N terminal do domínio repetitivo VSSQSDQASTSSQLG também foi mapeado, usando clones de células T de um bovino imunizado. A presença de múltiplos epitopos T CD4 no DH de MSP1a indica que este domínio é um potencial imunógeno contra *A. marginale* (BROWN *et al.*, 2002).

Poucos estudos para determinar o grau de imunoproteção induzido pela MSP1b têm sido realizados. Testando MSP1b recombinante, isoladamente ou associada a MSP1a recombinante, em bovinos Holandeses de 12-24 meses, GARCIA-GARCIA *et al.* (2004a) não encontraram diferença significativa no percentual de redução do volume globular dos animais imunizados, comparado ao grupo controle (salina), após desafio com isolado Virgínia de *A. marginale*.

Na imunização de bovinos com vacina de DNA contendo gene *msp1b*, clonado no plasmídeo pcDNA3.1, via intramuscular, foi encontrado, após desafio com 10⁴ eritrócitos infectados, que os animais apresentaram proteção parcial, refletida por menor redução no volume globular, quando comparado com o grupo controle não imunizado (ANDRADE *et al.*, 2004).

MSP2

A MSP2 (36-44 kDa) é uma proteína imunodominante de superfície, codificada por uma família de genes polimórficos (PALMER *et al.*, 1994a). Ocorre como monômeros ou multímeros, ligados por pontes dissulfeto (VIDOTTO *et al.*, 1994).

A análise dos diversos transcritos que codificam a MSP2 mostraram uma região central hipervariável (RCH) única, de aproximadamente 246 nucleotídeos no isolado Flórida de *A. marginale*, flanqueada por regiões N e C terminais altamente conservadas. A variação na região central resultou de inserções, deleções e substituições de nucleotídeos. Estrutura semelhante também foi identificada em *Anaplasma phagocytophilum*, com homologia nas regiões N e C terminais de 96 e 87%, respectivamente (FRENCH *et al.*, 1999); e em *A. centrale*, com pelo menos quatro epitopos T CD4⁺ comuns entre esta espécie e *A. marginale* (SHKAP *et al.*, 2002). Isso sugere que as proteínas de ambos os microrganismos desempenham funções semelhantes e são importantes para a sobrevivência dos mesmos (BROWN *et al.*, 2001a). Pela análise da seqüência de MSP2, esta proteína pertence à família pfam01617 de antígenos de superfície (BRAYTON *et al.*, 2005).

Durante cada ciclo de riquetsemia, os quais ocorrem a cada seis a oito semanas, ocorre emergência de *A. marginale* expressando variantes distintas de MSP2, contendo epitopos imunogênicos que induzem anticorpos específicos durante a infecção persistente da riquetsia. Acredita-se que essa variação antigênica é um mecanismo de evasão da resposta imune (FRENCH *et al.*, 1999). A variação antigênica de MSP2 também ocorre em *A. marginale* na glândula salivar de carrapatos *Dermacentor* (RURANGIRWA *et al.*, 2000; FUENTE *et al.*,

2001), demonstrando que ocorre pressão de seleção para variação sobre MSP2 no hospedeiro invertebrado, independentemente do sistema imune do bovino.

Os mecanismos de variação genética em *msp2* estão sendo intensamente estudados. BRAYTON *et al.* (2001) demonstraram que ocorre recombinação de pseudogenes inteiros de *msp2* em um sítio de expressão único para gerar novas variantes antigênicas. Esta recombinação constitui um segundo nível de variação, no qual pequenos segmentos de pseudogenes se recombinaem no sítio de expressão por conversão gênica (BRAYTON *et al.*, 2002).

A despeito da semelhança estrutural entre *msp2* de *A. marginale* e de *A. phagocytophilum* (p44), o mecanismo de variação antigênica é distinto, uma vez que nessa última espécie apenas ocorre conversão de pseudogenes inteiros, incluindo regiões flanqueando a porção central hipervariável, no sítio único de expressão do gene (LIN *et al.*, 2003). O número de variantes de *msp2* necessário para garantir evasão do sistema imune por *A. phagocytophilum* parece advir do grande número de parálogos de *msp2* no genoma dessa riquetsia (mais de 80) (LIN *et al.*, 2003).

Os ortólogos de *msp2* nos membros do gênero *Ehrlichia*, *Ehrlichia ruminantium*, *E. canis* e *E. chaffeensis* (OHASHI *et al.*, 1998a, b; van HEERDEN *et al.*, 2004) são arrançados como genes completos em grupos repetitivos em um (*E. ruminantium*, *E. chaffeensis*) ou dois (*E. canis*) loci, contendo 16–25 parálogos. Ocorre sintonia entre o arranjo desses genes em *Ehrlichia* e o operon de *msp2*, tanto em *A. marginale* quanto em *A. phagocytophilum* (LÖHR *et al.*, 2004). No entanto, os mecanismos de geração de variação antigênica nestas proteínas de membrana são bem distintos, uma vez que as espécies de *Ehrlichia* utilizam múltiplos genes dos grupos repetitivos (OHASHI *et al.*, 1998a, b; van HEERDEN *et*

al., 2004), enquanto *A. marginale* e *A. phagocytophilum* usam mecanismos de recombinação. Uma possível explicação para a evolução destes diferentes mecanismos pode ser o gene *mutL*, que codifica para uma enzima envolvida no reparo de *mismatch*. Em *A. marginale*, um número variável de trechos de resíduos G pode resultar algumas vezes em alterações estruturais no gene que codifica a enzima. Dessa forma, podem ocorrer altas taxas de mutação e recombinação (BRAYTON *et al.*, 2005).

No genoma do isolado Saint Maries de *A. marginale*, foram detectados sete pseudogenes funcionais para *msp2*. Este gene é transcrito como parte de um operon de quatro genes, sendo os três outros denominados OpAGs (*Operon Associated Genes*) 1 a 3 (LÖHR *et al.*, 2002a). OpAG2 e OpAG3 também pertencem à família pfam01617 de antígenos de superfície (BRAYTON *et al.*, 2005). Os membros deste operon possuem um padrão diferenciado de expressão, já que *opag1* parece não ser traduzido; *opag2* e *msp2* são expressos por *A. marginale* em eritrócitos de bovinos e nas células intestinais e da glândula salivar do ixodídeo; e *opag3* é expresso apenas em eritrócitos (LÖHR *et al.*, 2002a). Nas proteínas codificadas por este operon, excetuando-se MSP2, há mínimo polimorfismo, sendo identificada pressão de seleção de conservação apenas para a seqüência de OpAG3 (alta conservação na seqüência protéica e moderada variação de nucleotídeos), ao contrário da pressão para variação que ocorre com MSP2 (LÖHR *et al.*, 2004).

A imunização de bovinos com MSP2 nativa induziu proteção, em quatro dos cinco bovinos imunizados, contra desafio com isolado homólogo de *A. marginale* da Flórida (10^8 eritrócitos infectados) e em todos os cinco bovinos vacinados, frente a desafio com isolado heterólogo de Washington (10^{10} eritrócitos infectados),

com grau de proteção variando de significativo atraso no início da riquetsemia até ausência completa da mesma (PALMER *et al.*, 1988).

Verificou-se que células T CD4⁺ específicas para MSP2 reconheceram epítopos comuns a vários isolados de *A. marginale*. Observou-se ainda que os epítopos conservados, localizados nas regiões N e C terminais, induziram a produção de altos níveis de IFN- γ (BROWN *et al.*, 2001a).

A pesquisa de epítopos T também foi realizada com linfócitos de bovinos imunizados com MSP2 e peptídeos mais freqüentemente encontrados em cinco diferentes RCH de MSP2. Vários epítopos estimularam potentes respostas T, com proliferação celular e produção de IFN- γ , incluindo aqueles localizados em três blocos discretos de seqüências envolvidas em conversão gênica de segmentos. Células T específicas para um determinado epítopo variável não responderam a outras variantes naturalmente encontradas (BROWN *et al.*, 2003).

Em bovinos imunizados com MSP2, a resposta imune celular é eqüitativamente direcionada para epítopos conservados das regiões N e C terminais e para epítopos da RCH da proteína. No entanto, a resposta humoral é direcionada predominantemente contra epítopos lineares na RCH, a qual é hidrofílica e exposta na superfície dos corpúsculos iniciais. A maioria das células T dos animais imunizados com MSP2 reconheceu dois grupos de epítopos nas regiões conservadas da proteína, sendo que um deles está presente também em MSP3 (ABBOTT *et al.*, 2004).

Devido à conservação de blocos de aminoácidos nas regiões N e C terminais entre MSP2 e MSP3, linfócitos T CD4⁺ específicos para MSP2 também reconhecem epítopos naturalmente processados a partir de MSP3, havendo pelo menos dois epítopos na região C terminal e um epítopo na região N terminal. Este

mecanismo pode contribuir para a dominância imunológica de MSP2 e MSP3 (BROWN *et al.*, 2004).

Em resumo, estes estudos demonstraram que fortes respostas Th são geradas contra epitopos nas regiões N e C terminais conservadas e na RCH em bovinos imunizados com MSP2. A magnitude das respostas contra peptídeos da RCH ou peptídeos conservados que induzem maior estímulo, presentes nas regiões N e C terminais, foi similar, indicando que após múltiplas imunizações, nenhuma região é imunodominante. Supõe-se que, na resposta imune contra *A. marginale*, células T específicas para epitopos na RCH parecem não responder contra novas variantes, o que facilita sua expansão. No entanto, células T específicas para determinantes conservados podem gerar respostas Th de memória para linfócitos B, específicos para variantes emergentes, resultando em rápida produção de anticorpos variante-específicos e controle da riquetsemia a níveis abaixo daqueles associados com doença clínica. Finalmente, respostas T primárias para variantes emergentes de MSP2 podem continuamente se desenvolver durante a infecção e contribuem para seu controle por anticorpos e outros mecanismos, como aqueles mediados por IFN- γ . A combinação de respostas T e B contra os múltiplos epitopos da MSP2 e outras proteínas de membrana que sofrem variação antigênica, como a MSP3, podem explicar a baixa riquetsemia cíclica observada durante a infecção persistente (BROWN *et al.*, 2003; ABBOTT *et al.*, 2004).

Estratégias de modulação da resposta imune contra MSP2 para o padrão Th1 têm sido tentadas. Nesse sentido, já se verificou que a Interleucina (IL)-12 recombinante humana, utilizada como adjuvante para a MSP2, co-adsorvida com alúmen, estimulou respostas proliferativas de linfócitos T de bovinos imunizados,

com aumento significativo da produção de IFN- γ e IL-2. Também estimulou níveis séricos elevados de IgG, principalmente IgG₁ (TUO *et al.*, 2000).

Da mesma forma, demonstrou-se que CpG ODN 2006 estimulou resposta Th1 contra MSP2 de *A. marginale*, com alta produção de IFN- γ (ZHANG *et al.*, 2003).

MSP3

A MSP3 (86 kDa) é uma proteína imunodominante em infecções naturais e experimentais (PALMER *et al.*, 1986b; McGUIRE *et al.*, 1991). Altos níveis de anticorpos contra esta proteína foram detectados em soros de bovinos, cerca de 30 dias após a infecção por *A. marginale*, e em animais portadores, por pelo menos cinco anos (PALMER *et al.*, 1986b; McGUIRE *et al.*, 1991).

A MSP3 nativa foi utilizada como antígeno para detecção de anticorpos em bovinos portadores de *A. marginale*, demonstrando alta sensibilidade (McGUIRE *et al.*, 1991). No entanto, estudos posteriores revelaram que soros de animais infectados com *Anaplasma ovis*, *Ehrlichia risticii* e *Ehrlichia ewingii* reagiram com esse antígeno (ALLEMAN e BARBET, 1996). Também demonstrou-se que soros de bovinos infectados com isolados geograficamente distintos de *A. marginale* apresentaram variações na reação com MSP3 purificada do isolado da Flórida, caracterizando polimorfismo antigênico (ALLEMAN e BARBET, 1996).

Os estudos que caracterizaram a MSP3 como polimórfica foram corroborados pela análise dos genes que a codificam. Essa proteína é codificada por uma família multigênica (ALLEMAN *et al.*, 1997). Possui uma RCH flanqueada por regiões N e C terminais conservadas (BRAYTON *et al.*, 2001). No genoma do isolado Saint Maries, foram detectados sete pseudogenes funcionais invariáveis, os quais se

recombinam no sítio de expressão único, de maneira semelhante a *mSP2* (BRAYTON *et al.*, 2005). No entanto, não há recombinação de pseudogenes de *mSP3* no sítio de expressão de *mSP2* (BRAYTON *et al.*, 2003). Em adição, há duas seqüências remanescentes de *mSP3*, uma correspondendo à extremidade 5' e a outra, à extremidade 3' de um pseudogene (BRAYTON *et al.*, 2005).

De fato, MSP2 e MSP3 são parálogos, originados de um ancestral comum, após evento de duplicação gênica, tendo divergido substancialmente entre si, porém mantendo um mecanismo similar de geração de diversidade. Além disso, estas proteínas sofrem variação simultânea durante o curso da infecção em bovinos, em eventos de recombinação aparentemente independentes (BRAYTON *et al.*, 2003).

Bovinos imunizados com MSP3 nativa apresentaram um retardo no surgimento da riquetsemia após o desafio (PALMER e McELWAIN, 1995). Devido ao seu potencial como imunógeno, o papel das respostas celulares contra MSP3 foi estudado. CMSPs de bovinos imunizados com *A. marginale* responderam a MSP3, demonstrando que esta proteína contém epitopos T imunogênicos (BROWN *et al.*, 1998b). Linfócitos T CD4⁺ de bovinos imunizados com *A. marginale*, obtidos antes do desafio, responderam a MSP3, MSP2 ou ambos, em diversos isolados, demonstrando-se que há epitopos T comuns nessas duas proteínas, os quais são conservados. Todos os clones de células T CD4⁺ produziram IFN- γ e fator de necrose tumoral (TNF)- α ; a maioria co-expressou IL-4 (BROWN *et al.*, 1998b).

MSP4

A MSP4 (31 kDa) é uma proteína conservada entre diferentes isolados geográficos de *A. marginale* (PALMER e McGUIRE, 1984; OBERLE *et al.*, 1993; LEAL *et al.*, 2000), incluindo os brasileiros (KANO *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003), presente na membrana dessa riquetsia (PALMER e McGUIRE, 1984). Também está presente em *A. centrale*, mas ausente em *Anaplasma ovis* (OBERLE *et al.*, 1993). A identidade de MSP4 entre *A. marginale* e *A. centrale* foi de 91,7% na seqüência protéica e de 83% na seqüência de nucleotídeos (MOLAD *et al.*, 2004).

A MSP4 é codificada por gene de cópia única (OBERLE *et al.*, 1993; MOLAD *et al.*, 2004), localizado entre dois pseudogenes de *msp3* no isolado Saint Maries de *A. marginale* (BRAYTON *et al.*, 2005).

O potencial da MSP4 como imunógeno foi parcialmente analisado. Soros de bovinos imunizados com membrana externa de *A. marginale* e protegidos contra desafio com isolado virulento reconheceram MSP4 (OBERLE *et al.*, 1993). A imunização de bovinos com MSP4 nativa induziu proteção contra desafio com isolado homólogo de *A. marginale* (PALMER e McELWAIN, 1995). No entanto, até o momento, não existem informações sobre os epitopos responsáveis pela indução de uma resposta imune protetora nessa proteína.

Apesar da conservação de MSP4 entre isolados, as variações na seqüência de nucleotídeos que a codifica são suficientes para gerar diferenças filogeográficas (FUENTE *et al.*, 2002b), o que sugere que esta proteína não está sob pressão de seleção positiva (FUENTE *et al.*, 2003b) e que pode não ser um bom candidato a imunógeno, especialmente para gerar imunidade contra desafios heterólogos.

MSP5

A MSP5 (19 kDa) é uma proteína altamente conservada entre diferentes isolados de *A. marginale*, bem como em *A. centrale* e *A. ovis* (VISSER *et al.*, 1992). A identidade de MSP5 entre *A. marginale* e *A. centrale* foi de 92,9% na seqüência protéica e de 86,8% na seqüência de nucleotídeos (MOLAD *et al.*, 2004).

Ocorre na forma monomérica, contendo pontes dissulfeto intramoleculares, e dimérica, apresentando pontes dissulfeto intermoleculares, na membrana de *A. marginale* (VIDOTTO *et al.*, 1994).

O anticorpo monoclonal ANAF16C1 reconhece um epítipo imunodominante nessa proteína, o qual requer regiões C e N terminais da MSP5, indicando sua natureza conformacional (MUNODZANA *et al.*, 1998). Devido às características de conservação do epítipo reconhecido por este anticorpo, entre diferentes espécies e isolados de *Anaplasma*, o mesmo foi utilizado para o desenvolvimento de um ensaio de imunoadsorção enzimático (ELISA) competitivo, capaz de detectar anticorpos contra *A. marginale* e *A. ovis* com alta sensibilidade e especificidade, inclusive em animais persistentemente infectados (NDUNG'U *et al.*, 1995; KNOWLES *et al.*, 1996). Além disso, em animais infectados com *A. marginale* e *A. ovis*, esse epítipo induz altos títulos de anticorpos (VISSER *et al.*, 1992; NDUNG'U *et al.*, 1995; KNOWLES *et al.*, 1996; TORIONI DE ECHAIDE *et al.*, 1998).

Em bovinos, sabe-se que a imunização com membrana externa de *A. marginale* induz proteção contra desafio com isolado homólogo e heterólogo dessa riquetsia, a qual está correlacionada com os títulos de anticorpos contra as proteínas de membrana, incluindo a MSP5 (TEBELE *et al.*, 1991; PALMER *et al.*,

1994b). No entanto, a imunização com MSP5 nativa não protegeu contra desafio com isolado homólogo de *A. marginale* (PALMER e McELWAIN, 1995).

Outras proteínas de membrana

Por meio de fracionamento dos antígenos brutos de *A. marginale*, novas proteínas de membrana foram identificadas, as quais apresentaram massas moleculares de 17 a 43 kDa e ponto isoelétrico acima de 7,8. Nessa faixa, não estão localizadas as MSPs previamente caracterizadas, o qual foi confirmado pelo seqüenciamento limitado da região N terminal. A imunização de bovinos com esse grupo de proteínas e posterior desafio homólogo com 10^8 eritrócitos infectados com a riquetsia resultou em decréscimo do volume globular de 39%, contra 52% de redução no grupo controle. Na fração estudada, foram identificadas proteínas de 29, 32, 37 e 43 kDa (RIDING *et al.*, 2003).

Usando oligonucleotídeos degenerados, foi possível clonar o gene que codifica a proteína Ana29, o qual demonstrou-se altamente conservado entre os isolados Australiano e Americano de *A. marginale* (99% de identidade) (HOPE *et al.*, 2004). A proteína recombinante foi usada para imunização de bovinos, associada com os adjuvantes Quil A ou Quil A/Montanide ISA/DEAE dextran. Após desafio homólogo com 10^8 eritrócitos infectados, o grupo de animais imunizados com Ana29 associada a QuilA apresentou agravamento da doença, com decréscimo do volume globular de 46%, enquanto o grupo controle teve redução de 41%. O grupo imunizado com Ana29 associada a Quil A/Montanide ISA/DEAE dextran teve redução de VG de 33%, significativamente menor que o grupo controle (42%) (HOPE *et al.*, 2004).

No genoma do isolado Saint Maries de *A. marginale*, foram identificados genes para 15 novas proteínas, semelhantes à superfamília *msp2*, que correspondem à família pfam01617, as quais foram designadas *Outer Membrane Proteins*-(OMP)1–15. Doze desses genes estavam arrançados em quatro operons, e três ocorreram isoladamente (BRAYTON *et al.*, 2005). Não há informações sobre a conservação destes genes, nem sobre o potencial das proteínas codificadas pelos mesmos como imunógenos. No entanto, nosso grupo de pesquisa na Embrapa Gado de Corte está avaliando tanto a conservação destes genes em isolados brasileiros de *A. marginale*, bem como a capacidade das proteínas codificadas pelos mesmos de estimular respostas proliferativas em CMSPs de bovinos imunes à riquetsia.

3.8.2. Imunização utilizando *Anaplasma marginale* proveniente de cultura celular

Uma das alternativas para a imunização contra *A. marginale* é o cultivo *in vitro* dessa riquetsia, o qual constituiria uma alternativa econômica, segura e eficaz de produção de antígenos (WAGHELA *et al.*, 2000).

Cultivos de *A. marginale* foram feitos em células de medula óssea de coelho (MARBLE e HANKS, 1972) e de linfonodos de bovinos (HIDALGO, 1975), mas não houve evidências conclusivas da sua multiplicação.

A cultura de *A. marginale* em eritrócitos de bovinos e ovinos foi descrita por KESSLER e RISTIC (1979). Nesse sistema, uma cepa atenuada da riquetsia foi cultivada por 42 dias, apresentando um pique inicial de crescimento, seguido de um decréscimo gradual do percentual de eritrócitos infectados, com pequenos piques cíclicos.

Avanços significativos no cultivo de *A. marginale* em eritrócitos de bovinos foram alcançados pela adição de células endoteliais de bovinos, o que permitiu a manutenção da cultura com riquetsemia variando de 5 a 13% por 16 semanas (WAGHELA *et al.*, 1997). A integridade da composição antigênica da riquetsia, cultivada nesse sistema, foi posteriormente avaliada por meio de dois anticorpos monoclonais, um contra MSP2 e outro contra uma proteína de 73 kDa, por imunofluorescência e *Western blot* (WAGHELA *et al.*, 2000).

Apesar da possibilidade de cultivo de *A. marginale* por períodos prolongados em eritrócitos de bovinos, a utilização de organismos provenientes dessas culturas como imunógeno apresentam ainda algumas limitações. As vacinas derivadas de sangue requerem a utilização de animais doadores de eritrócitos, livres de patógenos importantes, e purificação da riquetsia dos eritrócitos, a fim de evitar a indução de iso-anticorpos (CARSON *et al.*, 1976).

Um avanço considerável foi o cultivo de *A. marginale* em células de carrapato. Inicialmente, sangue de bovinos infectado com essa riquetsia foi inoculado em linhagem de célula proveniente de *Dermacentor variabilis*, resultando, no 20º dia de cultivo, em um número de organismos semelhantes a *Anaplasma* pelo menos 10 vezes superior ao observado no 10º dia (SAMISH *et al.*, 1988).

A inoculação de *A. marginale* proveniente de intestino de carrapatos *D. variabilis* infectados resultou em culturas contínuas de *A. marginale* que se mantiveram por até 22 passagens em 11 meses (HIDALGO *et al.*, 1989a). No entanto, tentativas de infecção de bovino com organismos cultivados dessa forma falharam (HIDALGO *et al.*, 1989b).

Anaplasma marginale foi também cultivado em linhagem celular IDE8, derivada de embriões do carrapato *Ixodes scapularis* (MUNDERLOH *et al.*, 1996). Os organismos cultivados foram infectantes para bovinos e carrapatos (MUNDERLOH *et al.*, 1996; BLOUIN *et al.*, 1998). As seis MSPs caracterizadas em *A. marginale* provenientes de eritrócitos de bovinos estavam conservadas nos organismos cultivados (isolado de Virgínia) (BARBET *et al.*, 1999). A variabilidade do sítio de expressão genômica da MSP2 do isolado de Oklahoma transmitido de cultura *in vitro* para bovinos foi também analisada, apresentando-se conservado, exceto a seqüência que codifica a região hipervariável de MSP2 (BARBET *et al.*, 2001).

Anaplasma marginale proveniente de cultivo em células IDE8, foi testado como imunógeno (KOCAN *et al.*, 2001), induzindo títulos máximos de anticorpos duas semanas após a última imunização, os quais foram significativamente superiores aos obtidos em animais inoculados com a riquetsia proveniente de eritrócitos de bovinos infectados. Quanto às respostas específicas contra o complexo MSP1, os animais imunizados com organismos de cultura celular produziram anticorpos predominantemente contra MSP1b, enquanto aqueles inoculados com *A. marginale* proveniente de eritrócitos de bovinos infectados direcionaram a resposta principalmente contra MSP1a. Com relação à proteção, os animais imunizados com organismos de cultura celular não tiveram diferenças significativas com relação ao período pré-patente nem quanto ao percentual de eritrócitos infectados com *A. marginale* quando comparado ao grupo controle não imunizado, porém apresentaram uma significativa diferença na redução do volume globular e não exacerbaram sinais clínicos de anaplasmose (KOCAN *et al.*, 2001).

Além da vantagem que a imunização com organismos provenientes de cultura de células de carrapato teria, em função da ausência de células e patógenos de bovinos (KOCAN *et al.*, 2001), diversos isolados de *A. marginale* poderiam ser propagados em cultura, ampliando o espectro de proteção contra a anaplasnose. No entanto, tais cultivos teriam que ser feitos em separado, uma vez que o cultivo de um genótipo de *A. marginale* exclui o crescimento de outro (FUENTE *et al.*, 2002a).

3.9. CpG ODN: receptores e efeitos no sistema imune

3.9.1. Receptores *Toll-like*

As respostas imunes consistem em dois principais tipos: inata e adaptativa. A imunidade adaptativa, mediada por linfócitos B e T, pode reconhecer patógenos com alta afinidade, por meio de receptores específicos. No entanto, o estabelecimento deste tipo de resposta não é rápido suficiente para erradicar os microrganismos. A imunidade inata é rápida e, portanto, desempenha um papel relevante na defesa durante os estágios iniciais da infecção (KAISHO e AKIRA, 2002).

O reconhecimento de patógenos pelos componentes da resposta inata é mediado por uma série de receptores especializados na ligação com moléculas comuns a grandes grupos de organismos. Estes receptores são principalmente do grupo *Toll-like receptors* (TLR), os quais recebem este nome por se assemelharem à proteína transmembranar *Toll* de *Drosophila* (LEMAITRE *et al.*, 1996).

Os TLR são caracterizados pela presença de um domínio extracelular com domínios repetitivos, ricos em leucina, e uma região intra-citoplasmática, contendo um domínio *Toll-Interleucina-1* (TIR) (ROCK *et al.*, 1998).

Por meio de estudos com *knockout* em camundongos, diversos TLRs e seus ligantes foram caracterizados. Baseando-se nas similaridades das seqüências de aminoácidos, os membros da família TLR podem ser divididos em cinco subfamílias. Os membros da subfamília TLR2 (TLR1, TLR2 e TLR6) formam heterodímeros, criando novas especificidades para o reconhecimento de componentes de bactérias Gram-positivas (SCHWANDNER *et al.*, 1999; WAGNER, 2004). TLR3 reconhece RNA de dupla fita (ALEXOPOULOU *et al.*, 2001), enquanto TLR4 reconhece lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas (KIRSCHNING *et al.*, 1998). TLR5 reconhece flagelina de bacilos (HAYASHI *et al.*, 2001) e os membros da subfamília TLR9 (TLR7, TLR8 e TLR9) reconhecem motivos de DNA de patógenos, gerados principalmente durante a infecção (HEMMI *et al.*, 2000).

O padrão de expressão de TLRs nos diferentes tipos celulares pode variar de acordo com a espécie. Por exemplo, em humanos e camundongos, o padrão de expressão de TLRs difere entre células dendríticas plasmocitóides (DP) (CD4⁺, HLA-DR⁺ e CD11⁻) e células dendríticas mielóides (DM) (CD4⁺, HLA-DR⁺ e CD11⁺). As células DP humanas predominantemente expressam TLR7 e TLR9, enquanto células DM humanas expressam TLR1-8.

Poucos estudos têm sido publicados com TLRs de bovinos. O genes para TLR2 e TLR4 bovinos estão localizados, respectivamente, nos cromossomos 17 e 8 (WHITE *et al.*, 2003). O cDNA de TLR2 bovino apresenta similaridades de 77 e 67% com TLR2 de humano e de camundongo, respectivamente, enquanto para o cDNA de TLR4 bovino, as similaridades são de 72 e 65%, respectivamente (WERLING e JUNGI, 2003).

Recentemente, o cDNA e a estrutura gênica do TLR9 bovino foram caracterizados. O cDNA apresenta 83,5 e 76,9% de similaridade com os genes homólogos em humanos e camundongos. Em nível protéico, a similaridade é de 79,5 e 73,5%, respectivamente. O gene está localizado no cromossomo 22 bovino (GOLDAMMER *et al.*, 2004).

Além destas publicações, seqüências parciais ou totais dos cDNAs de TLR-1, 3, 5, 6, 7, 8 e 10 de bovinos estão disponíveis no Genebank, base de dados *nr*.

3.9.2. CpG ODNs: estrutura e efeitos sobre o sistema imune

As primeiras evidências de que o DNA bacteriano estimula respostas imunológicas foram demonstradas por TOKUNAGA *et al.* (1984) e YAMAMOTO *et al.* (1992). Posteriormente, diversos estudos apontaram que ODN de fita simples poderiam apresentar propriedades estimuladoras do sistema imunológico (TANAKA *et al.*, 1992; BRANDA *et al.*, 1993; HARTMANN *et al.*, 1996).

Os estudos iniciais mostrando que determinadas seqüências de DNA não metiladas de DNA bacteriano, contendo dinucleotídeos CG, denominadas motivos CpG, eram responsáveis pelas propriedades estimuladoras do sistema imune, foram feitos por KRIEG *et al.* (1995) e KRIEG (2002).

Estes motivos estão presentes, em maior freqüência (1:16), no DNA bacteriano, enquanto em vertebrados, estão suprimidas (1:60) e seletivamente metiladas (KRIEG e WAGNER, 2000).

A evidência de que motivos CpG estimulavam respostas imunes em mamíferos foi corroborada por estudos *in vivo* e *in vitro* com CpG ODN sintéticos em camundongos (LIPFORD *et al.*, 1997 a,b; SPARWASSER *et al.*, 1997 a,b; DAVIS *et al.*, 1998; KRIEG e WAGNER, 2000).

A ativação celular por CpG requer a atividade de quinases de estresse ERK 1/2, JNK e P38, bem como de NF- κ B. A ativação é precedida por endocitose não específica de CpG ODN e requer maturação do endossomo (HACKER *et al.*, 1998; HACKER *et al.*, 2000), o que é condizente com a localização intracelular de TLR9 (AHMAD-NEJAD *et al.*, 2002). A ativação também é dependente de MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), molécula adaptadora essencial nas vias de sinalização que envolvem TLR–IL-1 (TAKEDA *et al.*, 2003).

O DNA de CpG estimula diretamente apenas um pequeno grupo de células competentes do sistema imune, incluindo linfócitos B, células dendríticas, macrófagos e monócitos (STACEY *et al.*, 1996; SPARWASSER *et al.*, 1997 a,b; HARTMANN e KRIEG, 1999), porém ocorrem diferenças entre espécies nos tipos celulares passíveis de ativação e nos efeitos induzidos.

Em humanos, CpG ODN estimula células DP, linfócitos B e células NK, mas não células DM (BAUER *et al.*, 2001; KADOWAKI *et al.*, 2001; HORNUNG *et al.*, 2002; WAGNER, 2004).

A estimulação de células DP por CpG ODN aumenta a expressão de moléculas co-estimuladoras, HLA-DR, e do marcador de maturação CD83, resultando em aumento da habilidade de estimular células T alogênicas (KRUG *et al.*, 2001).

Células DP humanas ativadas por CpG ODN produzem citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-6 (BAUER *et al.*, 2001; KRUG *et al.*, 2001). Estas células aumentam a expressão de CCR7 e IP-10, mas a expressão constitutiva do receptor de quimiocinas CXCR3 não é afetada. A quimiocina inflamatória IP-10 recruta células expressando CXCR3, como linfócitos T ativados (LOETSCHER *et al.*, 1998, CELLA *et al.*, 1999). Devido à expressão de CCR7, as células DP podem se localizar em áreas ricas em linfócitos T virgens e de memória, em tecidos

linfóides secundários. Sabe-se que CCR7 media o endereçamento de células imunes em linfonodos, pela ligação às quimiocinas SLC e ELC expressas em vênulas do endotélio alto e endotélio linfático (SALLUSTO *et al.*, 1999; SALLUSTO e LANZAVECCHIA, 2000).

Os motivos CpG que estimulam respostas mais intensas em diferentes espécies são distintos (HARTMANN *et al.*, 2000; HARTMANN e KRIEG, 2000). Motivos AACGTT e GACGTT são ótimos para estimulação de leucócitos murinos, enquanto o motivo GTCGTT, presente nos CpG ODNs 2059/2006 estimula leucócitos de humanos e primatas não humanos (KLINMAN *et al.* 2002).

Em uma mesma espécie, ocorrem padrões de estimulação distintos, variando de acordo com as seqüências de CpG ODN. Esses podem ser classificados como CpG-A ODN, quando induzem a produção de grandes quantidades de IFN- α e β por células DP humanas, porém pequena estimulação de linfócitos B (protótipo CpG ODN 2216 - GGGGGACGATCGTCGGGGG); ou CpG-B ODN, quando são fracos estimuladores da produção de IFN- α e β , mas ativam a maturação de células DP e estimulam fortemente linfócitos B (protótipo CpG ODN 2006). Posteriormente, foram definidos tipos similares, baseado na capacidade de CpG ODN em estimular células NK ou a produção de IFN- γ , respectivamente, os grupos D e K, que correspondem aos tipos A e B (revisado por ROTHENFUSSER *et al.*, 2002).

Em bovinos, CpG ODN 2216 (classe A) é um potente indutor da secreção de IFN- α por CMSP. Esse CpG também estimula, de maneira dose-dependente, a secreção de IFN- γ , o que não é observado com CpG 2007 (TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTT) (classe B) (MENA *et al.*, 2003).

CpG ODN também induz a produção de IL-12 por células DP, agindo sinergicamente com CD40L. Além disso, células DP estimuladas por CpG ODN e CD40L são capazes de direcionar células T CD4⁺ virgens alogênicas para o fenótipo Th1, de maneira dependente de IL-12 (KRUG *et al.*, 2001). A produção preferencial de IL-12 (em detrimento de IFN- α) ocorre, sobretudo, quando as células DP são estimuladas por CpG ODN e CD40L mais tardiamente em sua maturação em cultura com IL-3. As consequências biológicas deste padrão são a produção preferencial de IFN- α no início de uma resposta imune, estimulando a proliferação de células T CD8⁺ de memória (TOUGH *et al.*, 1996; BELARDELLI *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 1998) e promovendo mecanismos efetores inatos, como a ativação de células NK (BIRON, 1998), que representa uma barreira inicial ao patógeno. A produção mais tardia de IL-12 estimula a respostas T antígeno-específicas, as quais são aumentadas pela estimulação de mais células DP produtoras de IL-12, via produção de IL-3 e de CD40L pelos linfócitos T ativados (GUBA *et al.*, 1989; MANGI e NEWLAND, 1999).

Em células NK humanas, CpG associado a IL-12, induz a expressão de CD69 e CD25, secreção de citocinas, tais como IFN- γ e TNF- α e aumento da atividade citotóxica anti-tumoral (SIVORI *et al.*, 2004).

Os efeitos do CpG sobre o sistema imunológico em humanos podem então ser sintetizados da seguinte forma: células DP, linfócitos B e células NK são diretamente estimuladas por CpG ODN, enquanto que monócitos, células DM e linfócitos T são estimulados por citocinas produzidas por células DP. CpG-A ODN induzem fortemente IFN- α por células DP. Esta citocina estimula células NK e células $\gamma\delta$ a produzirem IFN- γ . Esta última citocina, juntamente com IFN- α , ativa monócitos e células DM. Além disso, o IFN- α aumenta o potencial citotóxico de

células CD8⁺. CpG-B ODN atua sinergicamente com CD40L para estimular a produção de IL-12 por células DP, levando à ativação de células T virgens e direcionamento para o fenótipo Th1. Estas células Th1, em combinação com a ativação direta de linfócitos B por CpG-B ODN, levam a uma forte ativação de respostas humorais (ROTHENFUSSER *et al.*, 2002).

Em camundongos, um padrão semelhante de estimulação por CpG é observado, porém células DM, macrófagos, além de DP e linfócitos B, também respondem a CpG ODN (WAGNER, 2004).

Células DM de camundongos podem internalizar antígenos e apresentá-los, de maneira cruzada, no contexto do CHP de classe I, ativando células T citotóxicas (CD8⁺). Embora o TLR9 não seja necessário para esta internalização, este receptor é requerido para maturação das células DM (com expressão de CD40 e CD80; e produção de IL-12 p40 e TNF- α), as quais adquirem capacidade de ativação de células T citotóxicas (HEIT *et al.*, 2003).

Em macrófagos murinos de linha (J774), CpG ODN SAK2 aumenta a expressão de óxido nítrico sintetase 2 e cicloxigenase 2, bem como das citocinas IL-12, IL-6 e TNF- α (GHOSH *et al.*, 2001).

Células DM bovinas respondem a CpG ODN, produzindo IL-12 e TNF- α . Macrófagos bovinos produzem pequenas quantidades de IL-12 e TNF- α , as quais aumentam quando há co-estimulação com IFN- γ . Apesar de não ocorrer expressão de TLR9 nas referidas células, a estimulação por CpG ODN pode ocorrer indiretamente em função da presença de CMSPs ou células DP, via citocinas produzidas por estas células (WERLING *et al.*, 2004).

As células DP detectam patógenos via TLR9, e ativam células T virgens. Para tanto, estas células deixam os tecidos periféricos e migram para linfonodos. Este

tráfego é mediado por receptores de quimiocinas, os quais são expressos na superfície das células DP, após a estimulação de TLRs (DIEU *et al.*, 1998; SOZZANI *et al.*, 1998; RESCIGNO *et al.*, 2000).

A indução de respostas imunes adaptativas é dependente das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80/86, expressas por CAAs profissionais (WAGNER, 2004), e da produção de citocinas IL-12 e Interferons tipo I (WAGNER, 1999). Estes efeitos adjuvantes são induzidos por CpG ODN, de uma maneira dependente de MyD88 (WAGNER, 2004).

3.9.3. Utilização de CpG ODN como adjuvante em ruminantes

Em bovinos, uma vacina de subunidade contra herpes vírus tipo 1, constituída por 50 µg de glicoproteína D truncada recombinante, CpG ODN 2007 (nas dosagens de 25 mg, 2,5 mg ou 0,25 mg) e Emulsigen, inoculada duas vezes por via subcutânea, induziu proteção em bovinos contra desafio com o vírus, a qual se manifestou por níveis significativamente menores de febre, perda de peso e carga viral em secreções nasais que o placebo (IOANNOU *et al.*, 2002). Os títulos de anticorpos neutralizantes aumentaram após a segunda imunização, sendo significativamente superiores aos do placebo, porém não foram dose-dependentes, nas dosagens de CpG testadas. Independentemente da dose de CpG, os animais imunizados produziram altos títulos de IgG₁ e IgG₂ (razão IgG₁/IgG₂:~5), após a primeira e segunda imunizações, os quais foram, significativamente superiores ao grupo placebo. A ativação celular nos animais imunizados foi caracterizada por produção significativamente superior de IFN-γ e de células produtoras de IFN-γ. Mediante depleção seletiva de fenótipos celulares, comprovou-se que a produção de IFN-γ foi basicamente por linfócitos T CD4⁺ (IOANNOU *et al.*, 2002).

Bovinos imunizados com MSP2 de *A. marginale* associada com CpG ODN 2006 (TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT), emulsificados em alúmen, desenvolveram altos títulos de IgG₁, bem como apresentaram aumento significativo das respostas linfoproliferativas e da frequência de células secretoras de IFN- γ , quando comparados aos animais imunizados com MSP2 emulsificada em alúmen apenas. CMSPs dos animais imunizados expressaram altos níveis de transcritos de IFN- γ e baixos níveis de transcritos de IL-4. Não houve diferenças na expressão de mRNA de IL-10 quando comparado ao grupo controle (ZHANG *et al.*, 2003).

Os efeitos *in vivo* do CpG ODN 2007 foram avaliados em bovinos e ovinos, e a inoculação de 100 μ g/kg de CpG induziu resposta de fase aguda, caracterizada por febre transitória, pequeno acréscimo de neutrófilos circulantes e elevados níveis de haptoglobina. Apenas em ovinos, detectou-se também aumento de 2'5'-adenilato sintetase (NICHANI *et al.*, 2004).

Recentemente, em estudos com diferentes antígenos de *Mycobacterium bovis*, associados com CpG ODN, foram avaliados o tipo de resposta imune gerada e/ou o grau de proteção induzido contra a tuberculose em bovinos. O peptídeo sintético Rv3019c de *M. bovis*, associado a CpG ODN 2007 e Emulsigen, estimulou forte resposta celular, caracterizada por alta produção de IFN- γ e significativa linfoproliferação (VORDERMEIER *et al.*, 2005).

A imunoproteção contra *M. bovis* foi comparada em bovinos vacinados com proteínas de filtrado de cultura da micobactéria formuladas com adjuvantes Emulsigen ou Polygen, isoladamente ou em combinação com CpG ODN 2007 (WEDLOCK *et al.*, 2005). Os grupos controle constituíram de animais vacinados com BCG ou não vacinados. Os animais vacinados com BCG apresentaram forte resposta celular, caracterizada pela produção de IFN- γ , ao contrário dos

imunizados apenas com proteínas de filtrado de cultura, que apresentaram forte resposta humoral. As respostas celulares e humorais foram incrementadas pela adição de CpG ODN 2007 ao filtrado. Os animais imunizados com filtrado associado a CpG e Emulsigen ou Polygen foram desafiados, via traqueal, com *M. bovis* virulento. Os melhores resultados de proteção foram obtidos em animais imunizados com BCG, embora aqueles imunizados com filtrado/Emulsigen/CpG 2007 tenham apresentado proteção significativa (WEDLOCK *et al.*, 2005a).

Em outro estudo semelhante, o tipo de resposta imune e o grau de imunoproteção contra a tuberculose bovina foram testados em animais imunizados com: 1) filtrado de cultura, formulado com Emulsigen e CpG ODN 2007; 2) filtrado de cultura, formulado com Emulsigen e CpG ODN 2007 e BCG; e 3) BCG apenas, tendo como controle negativo animais não imunizados. Houve maior produção de IFN- γ e IL-2 em cultura de sangue total dos animais do grupo imunizado com filtrado mais BCG do que daqueles imunizados com BCG apenas. A vacinação com filtrado levou a uma resposta tardia, antígeno-específica, com produção IFN- γ e IL-2. Frente ao desafio com *M. bovis* virulento, o maior nível de proteção geral foi obtido com filtrado associado a BCG, enquanto que apenas o filtrado não induziu proteção (WEDLOCK *et al.*, 2005b).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Extração de DNA genômico de *A. marginale*

A extração de DNA genômico de *A. marginale* foi realizada a partir do sangue de um bezerro Nelore, esplenectomizado, infectado experimentalmente com isolado Zona da Mata-PE da riquetsia, e mantido em área de isolamento da Embrapa Gado de Corte. O sangue deste animal foi colhido em frascos contendo heparina como anticoagulante, quando a riquetsemia (percentual de eritrócitos infectados) atingiu 87,0%.

O DNA foi purificado a partir de 350 µL de sangue, utilizando-se o *kit Easy DNA* (Invitrogen), conforme metodologia descrita pelo fabricante.

A qualidade e concentração do DNA extraído foram avaliados por espectrofotometria, em aparelho GeneQuant Pro (Pharmacia); e por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualização em transiluminador ultra-violeta (UV). O gel foi fotografado em câmera digital Kodak (modelo BC290) e analisado pelo programa Alpha-DigiDoc (Alpha Innotec).

4.2. Amplificação de fragmentos de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos fragmentos de DNA foram delineados baseando-se nas seqüências de *mSP1a* e *mSP2* disponíveis no Genbank (números de acesso - *mSP1a*: AY010247 e *mSP2*: AF317726), usando-se o programa Primer Select (DNASar). No caso de *mSP1a*, os oligonucleotídeos *mSP1aF* (5' GGGTACGCCACCTATCTCGC 3') e *mSP1aR* (5' AACAAAGCTGTGTAGTAGTGTCCGAAGG 3') foram desenhados para amplificar um fragmento que codifica para a porção hidrofílica da região C terminal da

proteína MSP1a. Não foi inserido códon de terminação ao oligonucleotídeo iniciador reverso.

No caso de *msp2*, os oligonucleotídeos iniciadores *msp2F* (5' GCAGGCGGCGAGGGTCTATTTTCA 3') e *msp2R* (5' AGAATCCCCCTAAGCGTTGCCGAACCTCAA 3') foram desenhados para amplificar um fragmento que codifica para parte da região N terminal conservada, toda a RCH e toda a região C terminal da proteína MSP2. Neste caso, o oligonucleotídeo iniciador reverso compreende o códon de terminação do gene.

As reações de PCR foram preparadas em volume de 50 μ L, contendo 10 mM de tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 100 η g de cada oligonucleotídeo iniciador, 100 η g de DNA, e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (CenBiot). A amplificação foi realizada em termociclador PTC-200 (MJ Research), no seguinte esquema: 35 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto; anelamento a 61°C por um minuto para *msp1a* e a 60°C por um minuto para *msp2*, e extensão a 72°C por um minuto para *msp1a* e um minuto e meio para *msp2*. Adicionalmente, foi realizada extensão final a 72°C por sete minutos para ambos os genes.

Os produtos das reações de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL), e visualizados em transiluminador UV. Os géis foram fotografados em câmera digital Kodak (modelo BC290) e analisados pelo programa Alpha-DigiDoc (Alpha Innotec).

4.3. Clonagem de genes a partir dos produtos de PCR

Os produtos das reações de amplificação de ambos os genes de *A. marginale* foram utilizados para ligação ao plasmídeo de expressão *pTrcHis-TOPO* (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Foram utilizados 10 ng de plasmídeo e cerca de 100 ng de cada produto de PCR. A enzima *Taq* DNA polimerase, utilizada na PCR, possui atividade transferase terminal que adiciona uma desoxi-adenosina (A) à extremidade 3' do fragmento amplificado e o plasmídeo tem um único resíduo desoxi-timina (T) livre em cada extremidade 3'. A ligação do tipo T/A foi realizada por 5 minutos, em temperatura ambiente, tendo sido mediada pela enzima topoisomerase I do vírus Vaccinia, ligada covalentemente às duas extremidades do vetor linearizado.

Células *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) (250 µL), quimicamente competentes, foram transformadas com todo produto da ligação dos dois genes e posteriormente semeadas em meio Luria-Bertani (LB) ágar com 100 µg/mL de ampicilina (LB-amp), as quais foram incubadas por 12 horas a 37°C.

A presença e orientação dos insertos foram verificadas por PCR de colônia, com os oligonucleotídeos iniciadores *msp1aF* (inserto) e *pTrcHis reverse*, para *msp1a* e *msp2F* (inserto) e *pTrcHis reverse* (vetor), no caso de *msp2*. As reações de PCR foram preparadas conforme descrito anteriormente, porém em volume de 20 µL. Para cada gene, sete colônias foram suspensas individualmente na reação de PCR, incubadas em banho-maria a 94°C por 10 minutos para lise das células e inativação das nucleases. Em seguida, as reações foram submetidas à amplificação por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 55°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto. Para extensão final, foram incubadas por 10 minutos a 72°C. Após amplificação, os fragmentos resultantes da

PCR de colônia foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), e visualizados em transiluminador UV. Os géis foram fotografados em câmera digital Kodak (BC290) e analisados pelo programa Alpha-DigiDoc (Alpha Innotec).

4.4. Seqüenciamento dos insertos

Os clones selecionados foram cultivados em 2 mL de caldo LB-amp a 37°C, por 12 horas, sob agitação (250 rpm). Em seguida, foi realizada extração de DNA plasmidial, com o *kit Wizard Plus SV* (Promega), segundo instruções do fabricante. Os fragmentos clonados foram seqüenciados em ambas as direções, pela técnica de Sanger, em seqüenciador automático capilar ABI 3100 (Applied Biosystems), no Instituto de Biologia Molecular do Paraná. Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores *Xpress* e *pTrcHis reverse* (Invitrogen), que anelam no plasmídeo em regiões adjacentes ao sítio de clonagem.

Os fragmentos clonados foram identificados (*base-calling*) usando o programa PHRED e montados com o programa PHRAP. As seqüências resultantes da montagem foram submetidas à busca de homologia, usando o programa BLASTx (base de dados *nr*).

4.5. Expressão de *mSP1a* e *mSP2*

Para cada gene, um clone selecionado foi cultivado em 5 mL de caldo LB-amp a 37°C, por 12 horas, sob agitação (250 rpm). Em seguida, os pré-inóculos foram cultivados em 500 mL de caldo LB-amp por uma hora, a 37°C, sob agitação. Posteriormente, adicionou-se 1 mM de isopropil-tio-β-D-galactopiranosídeo - IPTG (ref. 15529-019, Invitrogen) e os tubos foram incubados por seis horas a 37°C, sob

agitação (250 rpm). Antes da indução da expressão e a cada duas horas após a adição do IPTG, alíquotas de 2 mL das culturas bacterianas foram retiradas, centrifugadas a 18.000 x g por um minuto, e o sedimento mantido a -20°C . Após seis horas, as culturas foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos, a 4°C , os sobrenadantes descartados, sendo os sedimentos suspensos em 20 mL de tampão fosfato 50 mM e congelados em nitrogênio líquido. Após descongelamento a 4°C , as suspensões foram sonicadas (*output* 40) (Branson Sonifier 250) seis vezes, por 20 segundos, em gelo. Amostras de 2 mL dos sedimentos lisados foram centrifugadas a 18.000 x g por 10 minutos, a 4°C , para obtenção das frações solúvel e insolúvel.

4.6. Purificação das proteínas recombinantes

A purificação das proteínas recombinantes foi realizada por cromatografia de afinidade usando resina de agarose-níquel (*ProBond Purification Kit*, Invitrogen), segundo instruções do fabricante. Foram centrifugados 250 mL de cultura a 5.000 rpm por cinco minutos. O sedimento foi suspenso em 8 mL de tampão de lise (6 M de Guanidina HCl, 20 mM $\text{NaPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, pH 7,8 e 500 mM NaCl). Após homogeneização da suspensão por 10 minutos, em temperatura ambiente, o lisado foi sonificado em gelo com pulsos de 30 segundos e centrifugado a $3.000 \times \text{g}$ por 15 minutos para sedimentar os debris celulares. Adicionou-se 8 mL do lisado à coluna com a resina ProBond (agarose/níquel), previamente equilibrada com de tampão de ligação em condições desnaturantes (8 M de uréia, 20 mM de $\text{NaPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, pH 7,8 e 500 mM NaCl), efetuando a ligação sob agitação por 30 minutos em temperatura ambiente. A resina foi sedimentada e o sobrenadante removido. Após lavagem da coluna com 4 mL de tampão de ligação em condições desnaturantes

sob agitação por dois minutos, a resina foi sedimentada e aspirou-se o sobrenadante. Repetiu-se o passo anterior mais uma vez e lavou-se a coluna com 4 mL de tampão de lavagem em condições desnaturantes (8 M uréia, 20 mM NaPO₄.12 H₂O, pH 6,0 e 500 mM NaCl) sob agitação. Sedimentou-se a resina e aspirou-se o sobrenadante, repetindo-se esta etapa mais uma vez. Lavou-se a coluna quatro vezes com 8 mL de tampão de lavagem em condição não desnaturante (50 mM NaPO₄.12 H₂O, 0,5 M NaCl e 20 mM de imidazole) sob agitação, sedimentou-se a resina e aspirou-se o sobrenadante. As proteínas foram eluídas com 12 mL de tampão de eluição em condições nativas (50 mM NaPO₄.12 H₂O, 0,5 M de NaCl e 250 mM de imidazole), sendo coletadas frações de 1 mL para análise por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio (SDS)-poliacrilamida a 12%.

4.7. Análise das proteínas recombinantes por eletroforese

Amostras das culturas para as proteínas MSP1a e MSP2 recombinantes, bem como das frações protéicas purificadas, foram suspensas em 200 µL de tampão da amostra 1x, fervidas por cinco minutos, e submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 12%, seguido de coloração com azul de Coomassie.

4.8. Western blot

A avaliação da antigenicidade das proteínas recombinantes foi feita por meio de *Western blot*. Os extratos brutos de *E. coli* TOP10, contendo plasmídeos recombinantes para *msp1a* ou *msp2*, com ou sem indução com IPTG, bem como MSP1a e MSP2 recombinantes purificadas, foram separados eletroforicamente em gel de SDS-poliacrilamida a 12% e transferidos para membrana de

nitrocelulose a 50 mA por três horas, em sistema semi-seco (Labconco). O marcador de massa molecular pré-corado (BenchMark, Invitrogen) foi cortado e guardado ao abrigo da luz e umidade. As membranas foram coradas com Ponceau S por cinco minutos e descoradas com salina fosfatada tamponada (PBS), pH 7,2 para visualização e corte das bandas. Depois, as membranas foram bloqueadas por 12 horas com leite em pó desnatado a 5%, diluído em PBS (pH 7,2) com Tween-20 0,1% (PBST). Em seguida, foram lavadas por cinco minutos com PBST e incubadas com os respectivos anticorpos primários. Empregou-se soros de bovinos positivos para anticorpos contra *A. marginale*, de acordo com os resultados da imunofluorescência indireta (IFI) (ARAÚJO *et al.*, 1998), de diferentes regiões do Brasil (Paraná, Pernambuco e Mato Grosso do Sul), diluídos a 1:50 em PBST, pH 7,2, os quais foram incubados com a membrana por 12 horas, em temperatura ambiente. Como controle negativo, empregou-se soro de bovino de Mato Grosso do Sul, negativo para anticorpos contra *A. marginale*, na IFI. Ainda para MSP2 recombinante, utilizou-se também o anticorpo monoclonal ANAO70A2 (anti-MSP2) (McGUIRE *et al.*, 1984), diluído a 1:500 em PBS, pH 7,2, por duas horas em temperatura ambiente. As membranas foram lavadas por cinco minutos e incubadas com IgG de coelho anti-IgG total de bovino, marcada com peroxidase (ref. 7414 Sigma), diluída a 1:2.000, em PBST, quando o anticorpo primário era de bovino; e IgG de coelho anti-IgG total de camundongo, marcada com peroxidase (ref. A-9044, Sigma), diluída a 1:2.000, em PBST, quando o anticorpo primário era monoclonal. As membranas foram então lavadas por cinco minutos com PBST e adicionou-se o substrato ácido diamino benzidínico (Sigma)/H₂O₂, parando-se a revelação com água destilada. As membranas foram guardadas em papel cartão, protegidas da luz e umidade.

4.9. Determinação da concentração das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes foram dialisadas frente a tampão fosfato 50 mM por 12 horas, a 4°C. Em seguida, foram concentradas em membrana de diálise coberta por sílica, a 4°C. Para determinação da concentração protéica, amostras de albumina sérica humana, com concentrações definidas, e de MSP1a e MSP2 recombinantes, foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 12%. Após coloração com azul de Coomassie, os géis foram fotografados e as imagens digitalizadas, sendo as concentrações de MSP1a e MSP2 recombinantes determinadas em sistema Alpha-DigiDoc (Alpha Innotec), por interpolação com os dados obtidos com albumina sérica humana.

4.10. Imunização dos bovinos experimentais

Treze bovinos Aberdeen-Angus, de ambos os sexos, com idades ao início do experimento variando entre 11 meses e 1 ano, negativos para anticorpos contra *A. marginale* por ELISA indireto com MSP1a e MSP2 recombinantes, e negativos na PCR para *msp5*, foram alocados em baias individuais em área de isolamento telada da Embrapa Gado de Corte. A alimentação dos animais durante o experimento consistiu de feno de *Brachiaria decumbens*, concentrado (milho, calcário e farelo de soja), sal mineral de água *ad libitum*. Os animais foram inicialmente adaptados às baias por três meses, para diminuir o estresse durante o manejo.

As proteínas MSP1a e MSP2 recombinantes, juntamente com o adjuvante oligonucleotídeo imunoestimulador contendo CpG dinucleotídeos não metilados (CpG ODN 2006) (TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT) (Alpha DNA), foram

emulsificadas em alúmen estéril (40%, v/v) (Serva). Em cada inoculação, as proteínas recombinantes foram empregadas na dosagem de 200 µg e o CpG ODN 2006, a 250 µg, por via subcutânea.

Os bovinos foram alocados nos seguintes grupos de tratamento: **Grupo 1** - MSP2 + MSP1a + CpG ODN 2006 + alúmen (quatro animais); **Grupo 2** - MSP2 + CpG ODN 2006 + alúmen (três animais); **Grupo 3** - CpG ODN 2006 + alúmen (três animais); **Grupo 4** - alúmen + salina estéril (três animais).

Os tratamentos acima descritos foram feitos três vezes, com intervalo de um mês.

Três semanas após a última imunização, os animais foram desafiados, por via subcutânea, com cerca de $3,2 \times 10^7$ eritrócitos infectados com *A. marginale*, isolado heterólogo de Mossoró, RN.

4.11. Monitoramento clínico e laboratorial dos bovinos imunizados

Os animais foram monitorados clinicamente para aferição da temperatura retal, e laboratorialmente para determinação do volume globular (VG), presença de anticorpos IgG e IgG₂ contra MSP1a e MSP2 por ELISA indireto, PCR para amplificação do gene *msh5* de *A. marginale*, e determinação da riquetsemia, por meio da análise de distensões sangüíneas coradas com panótico rápido. Também foi avaliada a resposta proliferativa das células mononucleares de sangue periférico (CMSP) dos animais, frente a MSP1a e MSP2 recombinantes de *A. marginale*.

Os ELISAs para anticorpos contra MSP1a e MSP2 e as determinações de VGs e riquetsemias foram realizados antes da primeira imunização, no dia de cada

imunização, no dia do desafio e, posteriormente, três vezes por semana até o 37º dia pós-desafio. As aferições de temperatura e ELISAs para IgG₂ foram realizados antes da primeira imunização, no dia de cada imunização, no dia do desafio e, posteriormente, uma vez por semana até o 37º dia pós-desafio. Os ensaios de proliferação de CMSPs foram feitos antes da primeira imunização, no dia do desafio e no 28º dia pós-desafio.

4.12. Detecção de IgG contra MSP1a e MSP2 recombinantes por ELISA indireto

Para padronização dos ELISAs com MSP1a e MSP2 recombinantes, diluições ótimas das proteínas, soros e conjugado foram determinadas pela avaliação de seis amostras de soros de bovinos negativos e seis positivas para anticorpos contra *A. marginale*, pela IFI. O procedimento a seguir foi selecionado por apresentar as maiores diferenças nas densidades ópticas (DOs) entre os soros positivos e negativos.

Placas de 96 poços (ref. 655001, Greiner Bio One) foram adsorvidas com 10 ng/poço de MSP1a recombinante ou 5,7 ng/poço de MSP2 recombinante, diluídas em salina fosfatada de Dulbecco (DPBS), pH 7,2, por quatro horas, a 4°C. As placas foram bloqueadas com 100 µL/poço de soro eqüino livre de γ -globulinas a 5%, diluído em PBST, pH 7,2, por 60 minutos, a 37°C. Após três lavagens com PBST, 100 µL/poço dos soros controle e teste, diluídos em PBST a 1:600, foram incubados por 60 minutos a 37°C. As placas foram então lavadas cinco vezes com PBST, e 100 µL/poço do conjugado anti-IgG de bovino/peroxidase (ref. A-7414, Sigma), diluído em PBST a 1:10.000, foram adicionados aos poços. As placas foram incubadas por 30 minutos a 37°C e, após cinco lavagens com PBST, 50

μL /poço do cromógeno/substrato o-fenildiamino (P-1526, Sigma/ H_2O_2 foi adicionado. A reação foi parada após 10 minutos, pela adição de H_2SO_4 (2,5 N) e os resultados obtidos em leitor EL-800 (Bio-Tek), com filtro de 490 nm.

Os pontos de corte para os dois ensaios foram determinados segundo metodologia descrita por FREY *et al.* (1998). O cálculo do ponto de corte (*cutoff*) utilizou a distribuição *t*-Student, sendo a fórmula matemática expressa como o desvio-padrão multiplicado por um fator que é baseado no número de controles negativos e no intervalo de confiança:

$$\text{Cutoff} = \bar{X} + \text{SD} \cdot t \sqrt{1 + (1/n)}$$

Em que:

\bar{X} : Média das leituras dos soros controles negativos

SD : Desvio-padrão

t : valor para a distribuição *t*, baseado em *n* e no percentual de nível de confiança desejado.

n : número de controles negativos,

Para cada placa, o ponto de corte foi calculado com 12 soros controle negativos, sendo o nível de confiança de 99,0% e valor de *t* igual a 2,829, segundo tabela com valores para *t*-distribuição para cálculo de ponto de corte (FREY *et al.*, 1998).

Para corrigir o efeito da variação de DOs entre ensaios, os resultados foram expressos como o índice da DO de cada soro teste sobre a linha de corte (*cutoff*) da respectiva placa (DO soro teste/*cutoff* x 100).

Para determinação dos parâmetros de qualidade dos ELISAs, foram utilizados soros negativos para anticorpos contra *A. marginale* pela IFI de bovinos oriundos do município de Bagé, RS, e de bezerros mantidos no isolamento da Embrapa Gado de Corte. Também utilizou-se soros positivos para anticorpos contra a riquetsia pela IFI de bovinos naturalmente infectados dos Estados de Mato Grosso do Sul e Goiás, bem como de bezerros experimentalmente infectados com *A. marginale* (isolado Zona da Mata-PE), mantidos em área de isolamento da Embrapa Gado de Corte. Foram determinados os seguintes parâmetros, expressos em percentuais: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e precisão.

A concordância entre os dois testes ELISA foi avaliada pela análise de 583 soros de bovinos, provenientes de três mesorregiões do Estado de Pernambuco: Metropolitana do Recife, Agreste Pernambucano e Mata Pernambucana.

4.13. Detecção de IgG₂ contra MSP1a e MSP2 recombinantes por ELISA indireto

A sensibilização das placas com MSP1a ou MSP2 recombinantes, o bloqueio dos poços e incubação dos soros controles e testes foram feitos conforme descrito anteriormente. O anticorpo monoclonal anti-IgG₂ bovina (ref. MCA626, Serotec), diluído a 1:5.000 em PBST (100 µL/poço), foi incubado por 60 minutos a 37°C. Após cinco lavagens com PBST, a IgG de coelho anti-IgG total de camundongo, marcada com peroxidase (ref. A-9044, Sigma), diluída a 1:10.000 em PBST (100 µL/poço), foi incubada por 30 minutos a 37°C. Após cinco lavagens com PBST, a reação foi revelada pela adição de 50 µL/poço do cromógeno/substrato o-fenildiamino (P-1526, Sigma)/ H₂O₂. A reação foi parada após 10 minutos, pela

adição de H₂SO₄ (2,5 N) e os resultados obtidos em leitor EL-800 (Bio-Tek), com filtro de 490 nm. O ponto de corte foi calculado como descrito anteriormente.

4.14. PCR para detecção de *A. marginale*, baseado no gene *msp5*

Os oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de *msp5* foram desenhados baseando-se em seqüência deste gene disponível no Genbank (número de acesso: M93392), usando-se o programa Primer Select (DNASStar). Os oligonucleotídeos iniciadores *msp5F* (5' ATGAGAATTTTCAAGATTGTGTCTAACCTT 3') e *msp5R* (5' AGGAAAGCCCCCAAAGCCCCATACTT 3') foram desenhados para amplificar um fragmento de 714 pb, que compreende todo o gene *msp5* (633 pb) e um fragmento não codificante na extremidade 3' (81 pb).

As reações de PCR foram preparadas em volume de 25 µL, contendo 200 µM de cada dNTP, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase e tampão com fórmula do fabricante (PCR Master Mix, Promega), e 100 ng de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 a 1 ng de DNA de *A. marginale*. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-200 (MJ Research), no seguinte esquema: 35 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto; anelamento a 60°C por um minuto, e extensão a 72°C por 30 segundos. Adicionalmente, foi realizada extensão final a 72°C por sete minutos.

Em experimento de padronização da PCR, realizado anteriormente, foi possível detectar até 4,7 pg de DNA de *A. marginale*. A PCR amplificou o gene *msp5* em amostras de DNA de quatro isolados geográficos brasileiros da riquetsia (Pernambuco-Zona da Mata; Pernambuco-Agreste, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Norte), porém foi negativa quando se utilizou DNA de *B. bovis* ou *B. bigemina* (ARAÚJO *et al.*, 2002).

Para avaliação da especificidade da PCR, foram analisadas 48 amostras de sangue de bovinos da região de Santa Vitória do Palmar, RS, a qual é livre de carrapatos. Estes animais eram negativos para anticorpos contra *A. marginale* nos ELISAs com MSP1a e MSP2 recombinantes.

Os produtos das reações de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), e visualizados em transiluminador UV. Os géis foram fotografados em câmera digital Kodak (modelo BC290) e analisados pelo programa Alpha-DigiDoc (Alpha Innotec).

4.15. Avaliação da resposta proliferativa de células mononucleares de sangue periférico dos animais experimentais

Para obtenção de CMSPs, de cada animal experimental, foram colhidos 20 mL de sangue em tubos à vácuo estéreis com heparina como anticoagulante. Os tubos foram centrifugados a 2.000 x g por 15 minutos, a 18°C, em rotor de ângulo móvel. Em tubos de polipropileno cônico de 15 mL, a camada de plasma e leucócitos dos dois tubos foi dispensada lentamente sobre 6 mL de Ficoll-Paque (Amersham Biosciences). Os tubos foram centrifugados a 2.000 x g por 30 minutos, a 18°C, rotor de ângulo móvel. O anel de células mononucleares de cada tubo foi colhido com pipeta Pasteur e transferido para outro tubo cônico de 15 mL. As células foram lavadas duas vezes com 6 mL de RPMI 1640 estéril, a 150 x g por 10 minutos, a 18°C, rotor de ângulo móvel. As células foram então suspensas em 1 mL de RPMI completo (suplementado com 2 g/L de bicarbonato de sódio, 2 mM de L-glutamina, 25 mM de HEPES, 50 µg/mL de gentamicina, 50 µM de 2-mercaptoetanol, e 10% de soro fetal bovino-SFB inativado). A concentração de células viáveis foi determinada em hemocitômetro de Neubauer, com nigrosina a

0,02%, e ajustada para 10^7 células por mL. Retirou-se o meio sobrenadante após breve centrifugação e adicionou-se lentamente 2 mL de solução de congelamento (SFB com 10% de DMSO), homogeneizando gentilmente. As células foram armazenadas em criotubos, os quais foram colocados em caixa de resfriamento (ref. 5100-0001, Nalgene) (com isopropanol) e mantidos a -70°C por 24 horas. Em seguida, foram resfriados em nitrogênio líquido até sua utilização nos ensaios de proliferação.

Para os ensaios de proliferação, os criotubos foram transferidos para banho-maria a 37°C e as células colocadas em tubos cônicos de polipropileno de 15 mL, contendo 10 mL de meio RPMI completo. Os tubos foram centrifugados a $200 \times g$ por 10 minutos, a 18°C . O sobrenadante de cada tubo foi removido cuidadosamente, sendo adicionados 10 mL de PBS. Os tubos foram então centrifugados, como na etapa anterior, e as células suspensas em RPMI completo e ajustadas para 10^6 células por mililitro.

As células mononucleares (5×10^4 por poço) foram cultivadas em meio RPMI 1640 completo, em placas de 96 poços de fundo chato (ref. 3595, Costar). O mitógeno Concanavalina A (ConA) (Sigma) foi adicionado aos ensaios nas concentrações finais de $3,5 \mu\text{g/mL}$, enquanto MSP1a ou MSP2 recombinantes, na concentração de $7,5 \mu\text{g/mL}$ em meio completo. Essas concentrações foram determinadas em experimento de padronização com CMSPs de bovino imune contra *A. marginale*. Para cada placa, foram incluídos controles de proliferação espontânea (meio sem mitógeno ou antígeno). Os tratamentos foram realizados em triplicata, em volumes de $100 \mu\text{L}$. As placas foram incubadas por 3 dias para conA ou por 5 dias para MSP1a e MSP2 recombinantes, a 37°C , em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO_2 .

A proliferação celular foi avaliada utilizando-se o *kit Cell Proliferation Biotrak ELISA System*, versão 2 (RPN 250, Amersham Biosciences), o qual quantifica a incorporação celular de 5-bromo-2' desoxiuridina (BrdU), análogo da timidina, durante a síntese de DNA na proliferação.

Após o cultivo, adicionou-se 10 μM de BrdU/poço e as placas foram incubadas a 37°C por 18 horas, sendo posteriormente centrifugadas a 300 x g por 10 minutos e o meio de cultivo removido. Depois de secas com secador de cabelo por 15 minutos, adicionou-se a solução de fixação (200 μL /poço) e, após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, a solução foi removida e adicionada solução de bloqueio (200 μL /poço). Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, a solução foi descartada, e o anticorpo anti-BrdU conjugado com peroxidase (100 μL /poço) adicionado. Após incubação por 90 minutos em temperatura ambiente, as placas foram lavadas por três vezes com PBS (300 μL /poço) e adicionado substrato/cromógeno (Tetrametil benzidina/ H_2O_2) adicionado (100 μL /poço). A reação foi parada após 10 minutos com H_2SO_4 1M (25 μL) e os resultados obtidos em leitor EL-800 (Bio-Tek), com filtro de 450 nm.

O índice de estimulação (IE) foi calculado dividindo-se a média das DOs dos tratamentos pela média das DOs dos controles de proliferação espontânea. O IE foi considerado positivo se igual ou superior a 2.0.

4.16. Análise estatística

Na avaliação quantitativa da concordância entre os testes ELISA com MSP1a e MSP2, determinou-se o índice *kappa* (KRAMER e FEINSTEIN, 1981). Às amostras com resultados discordantes entre os dois ELISAs, foi aplicado o teste exato de Fischer. Para comparações dos percentuais de redução de VG e de

aumento de temperatura, bem como percentuais de riquetsemia e níveis de anticorpos entre grupos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey. Para comparação dos níveis de anticorpos, VG, temperatura e riquetsemia em momentos de observação diferentes, utilizou-se o teste T pareado. O nível de significância dos testes foi de 95%.

5. RESULTADOS

5.1. Clonagem e expressão de *msp1a* e *msp2*

As ampliações de *msp1a* e *msp2* por PCR, como esperado, resultaram em fragmentos de cerca de 626 e 1211 pb, respectivamente (Figura 1).

As seqüências consenso de *msp1a* e *msp2*, resultantes da montagem com o programa PHRAP, apresentaram alinhamentos significativos, usando o BLASTx (base de dados *nr*), com seqüências de MSP1a (Nº de acesso AAP49429, e-value 5×10^{-78}) de *A. marginale* e MSP2 (Nº de acesso: AAL26275, e-value 10^{-178}), disponíveis no Genbank.

A indução de *msp1a* e *msp2* com IPTG resultou em bandas protéicas de aproximadamente 33,0 e 42,2 kDa, respectivamente (Figuras 2 e 3). A MSP1a recombinante foi parcialmente solúvel, enquanto que MSP2 recombinante foi completamente insolúvel. A expressão máxima ocorreu com 4-6 horas de indução.

As proteínas MSP1a e MSP2, transferidas para membrana de nitrocelulose, reagiram com soros de bovinos positivos para anticorpos contra *A. marginale*, de diferentes regiões do Brasil (Figuras 4 e 5). A MSP2 recombinante também reagiu com anticorpo monoclonal anti-MSP2 ANAO70A2 (Figura 6).

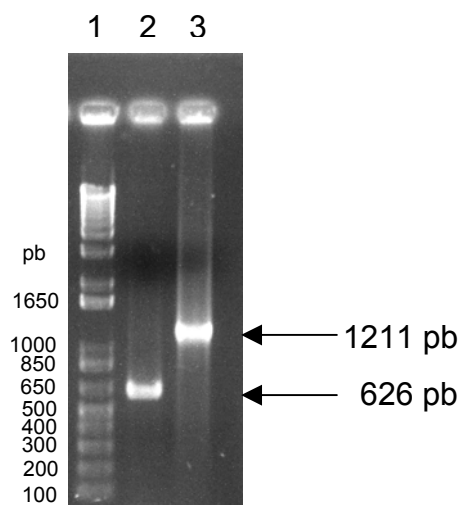


Figura. 1. Amplificação por reação da polimerase em cadeia (PCR) de *msp1a* e *msp2* de isolado brasileiro (Pernambuco-Zona da Mata) de *Anaplasma marginale*.
Linhas - 1: marcador 1 kb plus (Invitrogen); 2: fragmento de *msp1a* ; 3: fragmento de *msp2*.

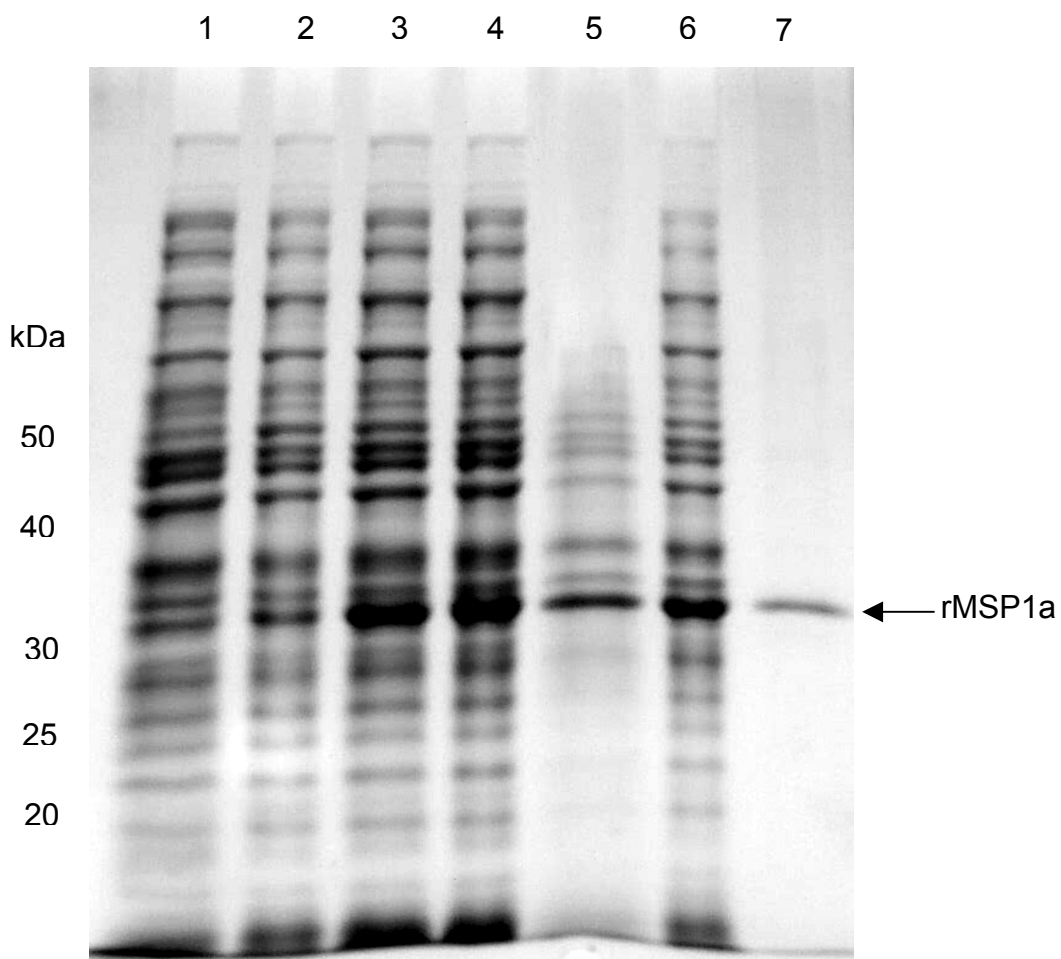


Figura 2. Expressão de *msp1a* de isolado brasileiro (Pernambuco-Zona da Mata) de *Anaplasma marginale*. Linhas – 1: *Escherichia coli* TOP10 transformada com *pTrcHis-TOPO/msp1a* sem indução com IPTG; 2: indução por 2 h com IPTG; 3: indução por 4 h com IPTG; 4: indução por 6 h com IPTG; 5: fração solúvel; 6: fração insolúvel; 7: MSP1a recombinante purificada.

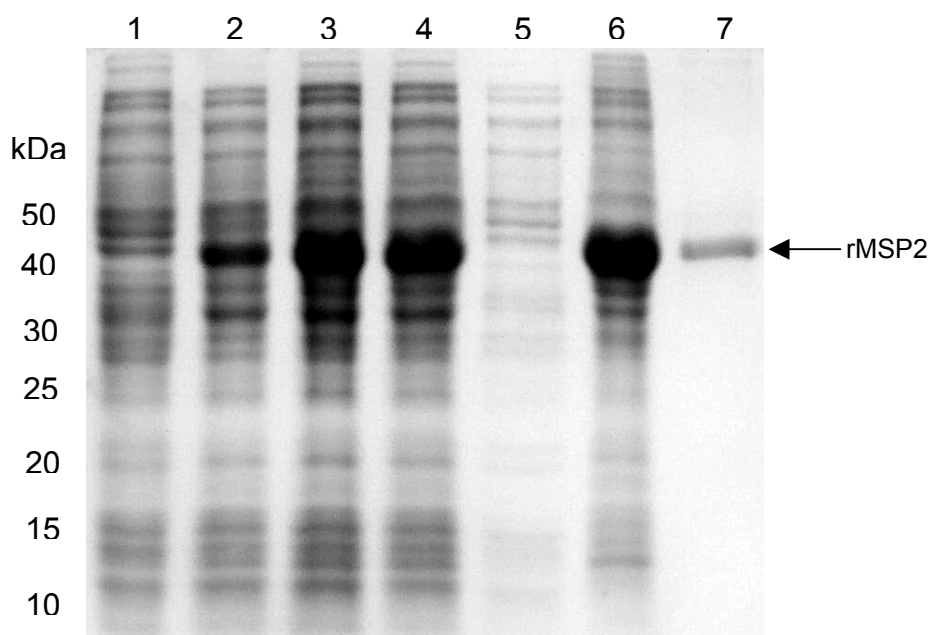


Figura 3. Expressão de *msp2* de isolado brasileiro (Pernambuco-Zona da Mata) de *Anaplasma marginale*. Linhas – 1: *Escherichia coli* TOP10 transformada com *pTrcHis-TOPO/msp2* sem indução com IPTG; 2: indução por 2 h com IPTG; 3: indução por 4 h com IPTG; 4: indução por 6 h com IPTG; 5: fração solúvel; 6: fração insolúvel; 7: MSP2 recombinante purificada.

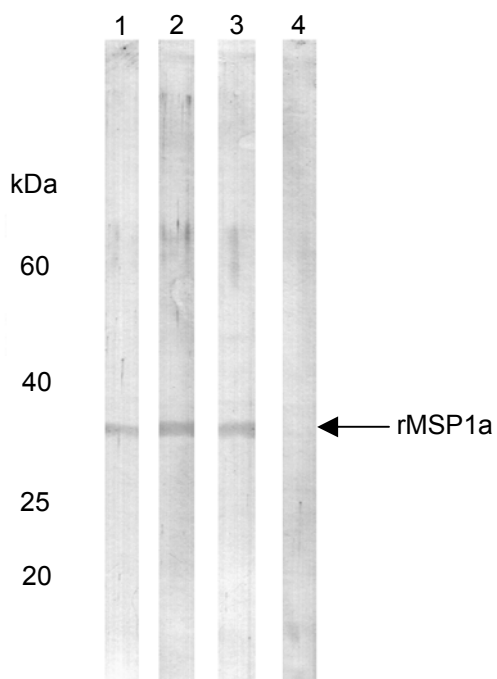


Figura 4. *Western blot* com MSP1a recombinante de isolado brasileiro (Pernambuco-Zona da Mata) de *Anaplasma marginale* e soros de bovinos positivos para anticorpos contra a riquetsia de diferentes regiões do Brasil. Linhas – 1: Paraná; 2: Pernambuco; 3: Mato Grosso do Sul; 4: controle negativo (soro de bovino de Mato Grosso do Sul, negativo para anticorpos contra *A. marginale*).

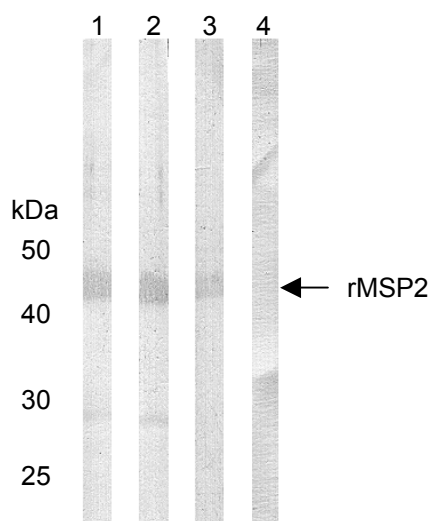


Figura 5. *Western blot* com MSP2 recombinante de isolado brasileiro (Pernambuco-Zona da Mata) de *Anaplasma marginale* e soros de bovinos positivos para anticorpos contra a riquetsia de diferentes regiões do Brasil. Linhas – 1: Pernambuco; 2: Mato Grosso do Sul; 3: Paraná; 4: controle negativo (soro de bovino de Mato Grosso do Sul, negativo para anticorpos contra *A. marginale*).

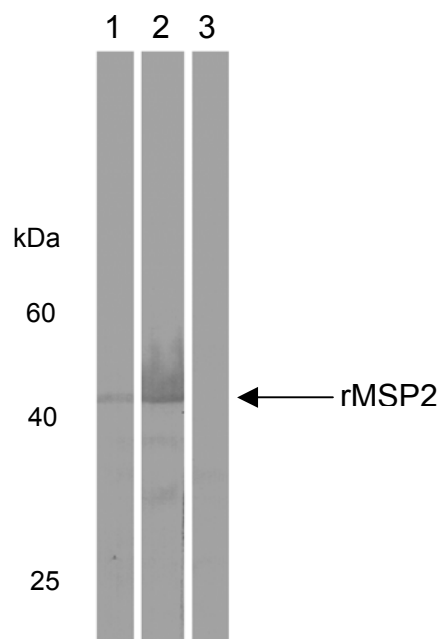


Figura 6. *Western blot* com MSP2 recombinante de isolado brasileiro (Pernambuco-Zona da Mata) de *Anaplasma marginale* e anticorpo monoclonal ANAO70A2. Linhas – 1: MSP2 recombinante purificada; 2: lisado de *Escherichia coli* após 6 h de indução com IPTG; 3: lisado de *E. coli* sem indução com IPTG.

5.2. Padronização e desempenho dos testes de diagnóstico (ELISAs indiretos para IgG total contra MSP1a e MSP2 recombinantes e PCR para *msp5*).

Os desempenhos dos ELISAs indiretos para IgG total contra MSP1a e MSP2 recombinantes estão demonstrados na Tabela 1. Os testes apresentaram desempenhos idênticos, com sensibilidade de 99,0%, especificidade de 100%, valor preditivo positivo de 100%, valor preditivo negativo de 98,9% e precisão de 99,5%.

A concordância de resultados entre os ELISAs com MSP1a e MSP2 recombinantes está demonstrada na Tabela 2.

Dos 583 soros analisados, 571 apresentaram resultados idênticos em ambos os testes (MSP1a+/MSP2+ ou MSP1a-/MSP2-), correspondendo a uma concordância de 97,9%, com índice *kappa* de 0,89. No entanto, com relação aos resultados discordantes, pôde-se verificar que no ELISA com MSP1a recombinante, houve uma ocorrência significativamente maior de resultados negativos ($P=0,039$).

Na avaliação da especificidade da PCR para *msp5*, as 48 amostras de sangue de bovinos de Santa Vitória do Palmar, RS, região livre de carrapatos, foram negativas.

Tabela 1. Desempenhos dos testes de imunoadsorção enzimática indireta (ELISA) com MSP1a e MSP2 recombinantes na detecção de anticorpos contra *Anaplasma marginale*.

ELISA	Estado de infecção dos bezerros*		
	Positivo	Negativo	Total
MSP1a recombinante			
Positivo	106 (a)	0 (b)	106 (a+b)
Negativo	1 (c)	89 (d)	90 (c+d)
Total	107 (a+c)	89 (b+d)	196 (a+b+c+d)
MSP2 recombinante			
Positivo	106 (a)	0 (b)	106 (a+b)
Negativo	1 (c)	89 (d)	90 (c+d)
Total	107 (a+c)	89 (b+d)	196 (a+b+c+d)

*Determinado por imunofluorescência indireta

Tabela 2. Concordância entre os testes de imunoadsorção enzimática indireta (ELISA) com MSP1a e MSP2 recombinantes de isolado brasileiro (Pernambuco-Zona da Mata) de *Anaplasma marginale*, usando soros de bovinos de três mesorregiões do Estado de Pernambuco.

ELISA	MSP1a+	MSP1a -	Total
MSP2+	516	10	526
MSP2-	2	55	57
Total	518	65	583

No início do experimento, todos os 13 bovinos do experimento estavam negativos na PCR para *msp5* (Figura 7a) e ao exame de distensões sangüíneas coradas. Pela PCR, no 7º dia pós-desafio (DPD), três animais foram positivos e a partir do 9º DPD, todos foram positivos, permanecendo até o final das observações (37º DPD) (Figura 7b). No exame de distensões sangüíneas coradas, apenas no 19º DPD a totalidade dos animais foi positiva para *A. marginale*, havendo detecção intermitente em alguns animais. Ao final das observações, 76,9% dos animais estavam positivos nas distensões sangüíneas coradas (Figura 8).

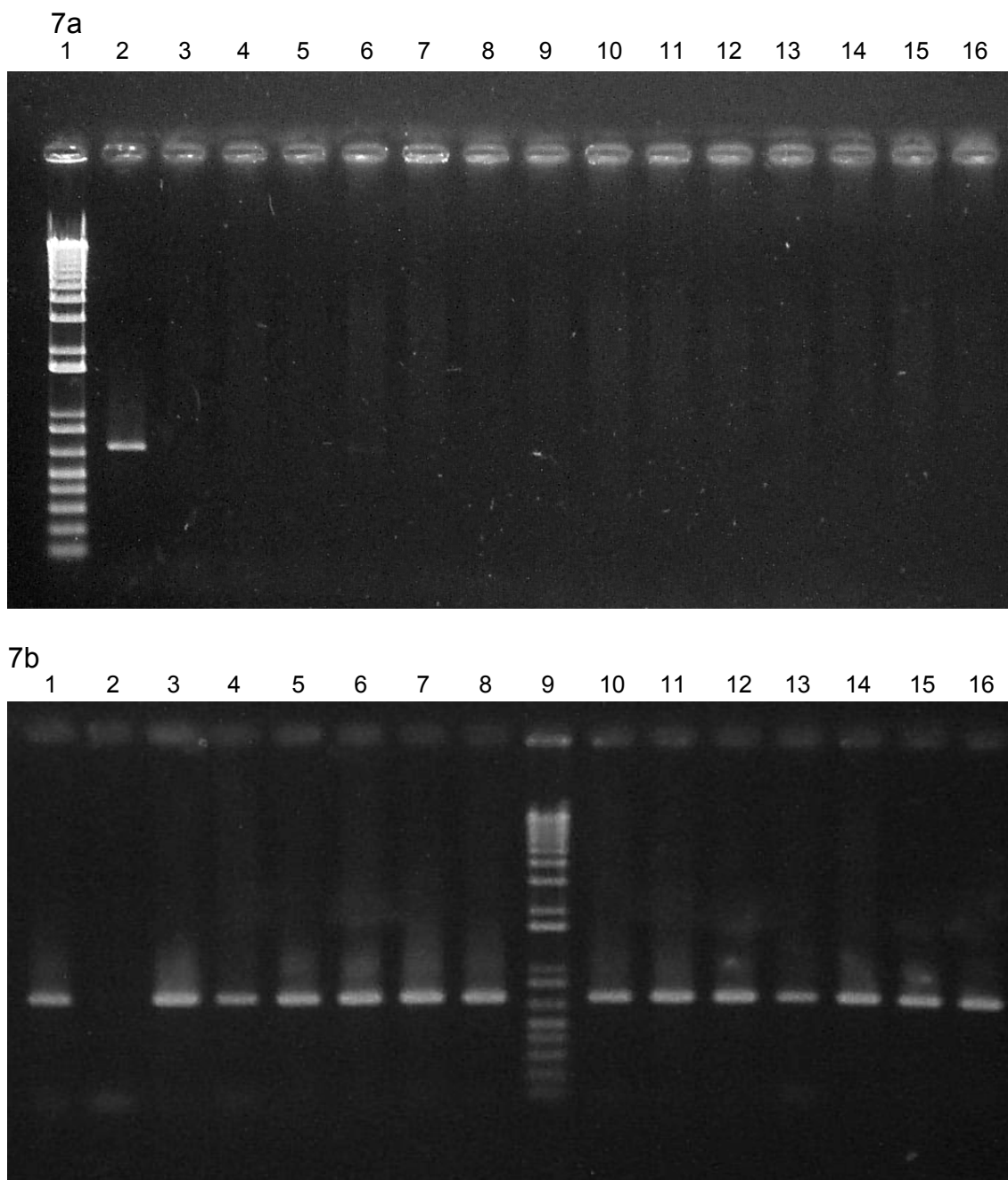


Figura 7. Reação da polimerase em cadeia para *msp5* de *Anaplasma marginale* em bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de *Anaplasma marginale* e controles, e posteriormente desafiados com a riquêtsia.

7a (antes da imunização) = Linhas: 1 - Marcador *1 kb plus* (Invitrogen); 2 - Controle positivo; 3 - Controle negativo; 4 a 16 - animais 001, 002, 966, 967, 968, 970, 974, 975, 977, 978, 982, 983, 6160, respectivamente.

7b (37° dia pós-desafio) = Linhas: 1 - Controle positivo; 2 - Controle negativo; 3 a 8 - animais 001, 002, 966, 967, 968, 970; 9 - Marcador *1 kb plus* (Invitrogen); 10 a 16 - 974, 975, 977, 978, 982, 983, 6160, respectivamente.

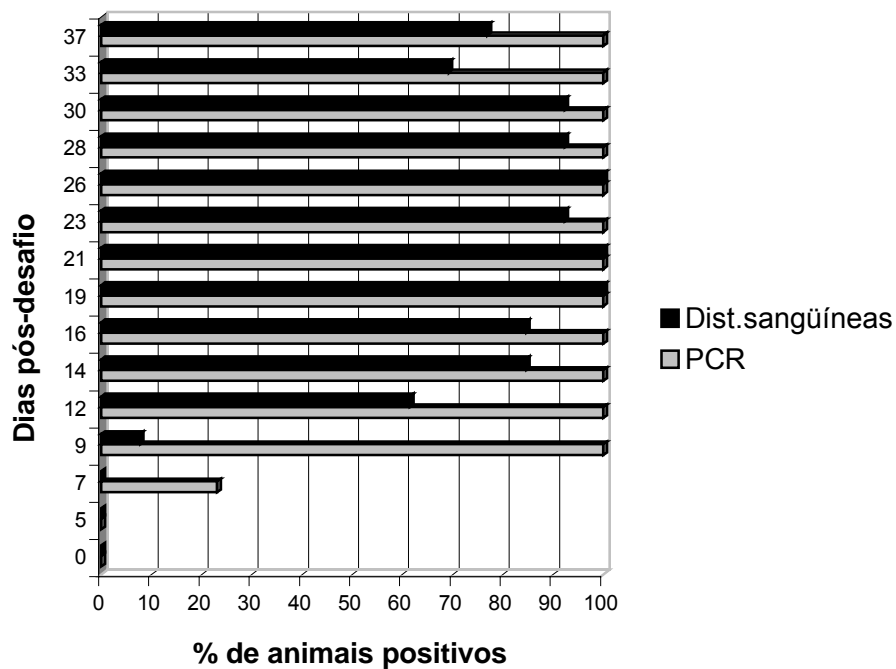


Figura 8. Percentual de bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de *Anaplasma marginale* e controles, e desafiados com a riquétisia, positivos na reação da polimerase em cadeia (PCR) para gene *msp5* e exame de distensões sangüíneas coradas.

A comparação entre as sensibilidades dos ELISAs e a PCR na detecção de bovinos infectados experimentalmente com *A. marginale* está demonstrada na Figura 9. Foram considerados apenas os animais dos grupos 3 e 4, uma vez que os bovinos dos grupos 1 e 2 produziram anticorpos em resposta às imunizações com MSP1a e MSP2 recombinantes, e o objetivo, neste caso, era comparar a sensibilidade da PCR e dos ELISAs na detecção de animais experimentalmente infectados. No 7º DPD, a PCR detectou 16,7% de animais positivos e a partir do 9º DPD, todos os bovinos estavam positivos, permanecendo assim até o final do experimento. Nos ELISAs com MSP1a e MSP2 recombinantes, a conversão sorológica ocorreu no 12º DP em 66,7% dos bovinos e a totalidades destes passou a ser soropositiva no 14º DPD, permanecendo assim até o final do experimento, exceto um animal do grupo 3, cuja sorologia foi negativa na última observação, no ELISA para MSP1a.

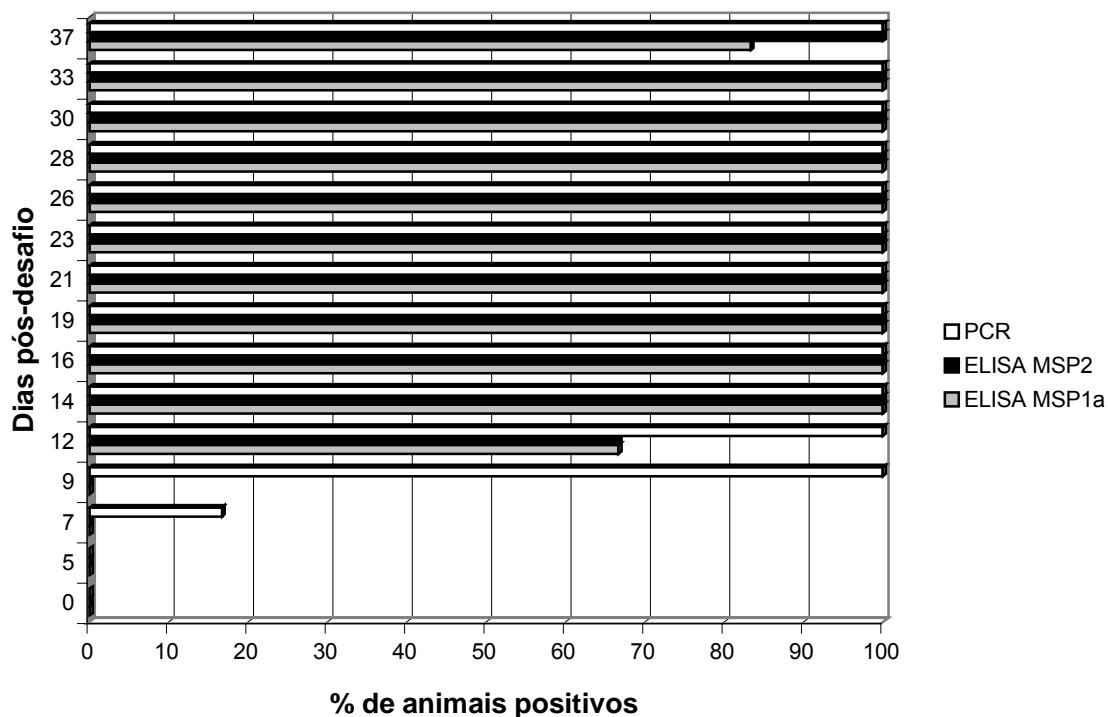


Figura 9. Percentual de bovinos infectados experimentalmente com *Anaplasma marginale* positivos na reação da polimerase em cadeia (PCR) para gene *msp5* e nos testes de imunoadsorção enzimática indireta (ELISA) com MSP1a e MSP2 recombinantes.

Obs: foram analisados apenas os animais dos grupos 3 (CpG ODN 2006 + alúmen; n= 3) e 4 (alúmen; n=3).

5.3. Avaliação bacteriológica, hematológica e imunológica dos bovinos experimentais

A avaliação dos parâmetros clínicos e hematológicos dos animais experimentais está demonstrada na Tabela 3 e nas Figuras 10, 11 e 12.

Os parâmetros hematológicos e clínicos dos animais experimentais estavam dentro da normalidade e homogêneos entre as quatro primeiras observações, as quais correspondem às três imunizações e ao dia do desafio, uma vez que, pela análise de variância, as médias de VG e temperatura não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$).

Para comparação dos parâmetros de VG e temperatura entre grupos, foram obtidos o percentual de redução do volume globular e de aumento de temperatura, a partir da média quatro primeiras observações - período de imunização e dia do desafio.

Após o desafio, houve diminuição significativa nos níveis de VG em todos os grupos ($P < 0,01$) e aumento significativo da temperatura retal ($P < 0,05$) nos animais de todos os grupos, confirmando a virulência do isolado utilizado para desafio.

Os VGs atingiram níveis mais baixos na maioria dos animais entre 23-26 DPD. As temperaturas retais máximas ocorreram, na maioria dos animais, no 21º DPD, enquanto os picos de ricketsemias, entre 19 e 26 DPD.

Não houve diferenças significativas entre grupos, com relação aos percentuais de redução do VG e de aumento de temperatura, ou ricketsemias máximas ($P > 0,05$).

Tabela 3. Parâmetros clínicos e hematológicos de bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de *Anaplasma marginale* e controles, posteriormente desafiados com a riquetsia.

Grupo	Animal	Amplitude de variação do VG (a) (%)	% redução de VG (b)	Amplitude de variação da temperatura (°C)	% de aumento de temperatura (c)	Riquetsemia máxima (%)
1	974	10-39	72,4	35,5-41,0	5,8	8,5
	977	10-44	75,3	38,3-40,2	3,9	11,0
	6160	14-37	61,1	38,5-40,5	4,1	1,3
	968	12-35	63,6	38,0-40,4	4,8	9,0
	Média (d.p.)(d)		68,1 (6,8)		4,65 (0,87)	7,45 (4,24)
2	978	9-37	75,0	38,2-40,9	6,1	13,0
	983	8-37	77,5	38,3-40,4	4,7	8,8
	966	14-34	54,8	38,3-39,6	2,5	7,0
	Média (d.p.)		69,1 (12,4)		4,45 (1,8)	9,6 (3,1)
3	001	11-37	66,4	38,0-40,0	3,5	5,0
	975	11-39	68,6	38,2-39,8	3,2	7,0
	967	9-36	72,9	38,1-40,7	5,4	5,3
	Média (d.p.)		69,3 (3,3)		4,06 (1,2)	5,8 (1,1)
4	002	10-45	75,6	38,4-40,5	4,4	7,0
	970	12-36	65,7	38,2-40,0	3,6	11,2
	982	12-37	65,7	38,3-40,0	3,4	8,0
	Média (d.p.)		69,0 (5,7)		3,81 (0,5)	8,7 (2,2)

Grupo 1: MSP1a e MSP2 recombinantes + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 2: MSP2 recombinante + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 3: CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 4: Alúmen

a: Volume globular

b: percentual de redução do volume globular (VG) calculado a partir da média quatro primeiras observações (período de imunização e dia do desafio) e o VG mais baixo detectado em cada animal na fase aguda da infecção.

c: percentual de aumento da temperatura calculado a partir da média quatro primeiras observações (período de imunização e dia do desafio) e a temperatura mais alta detectada em cada animal na fase aguda da infecção.

d: desvio-padrão

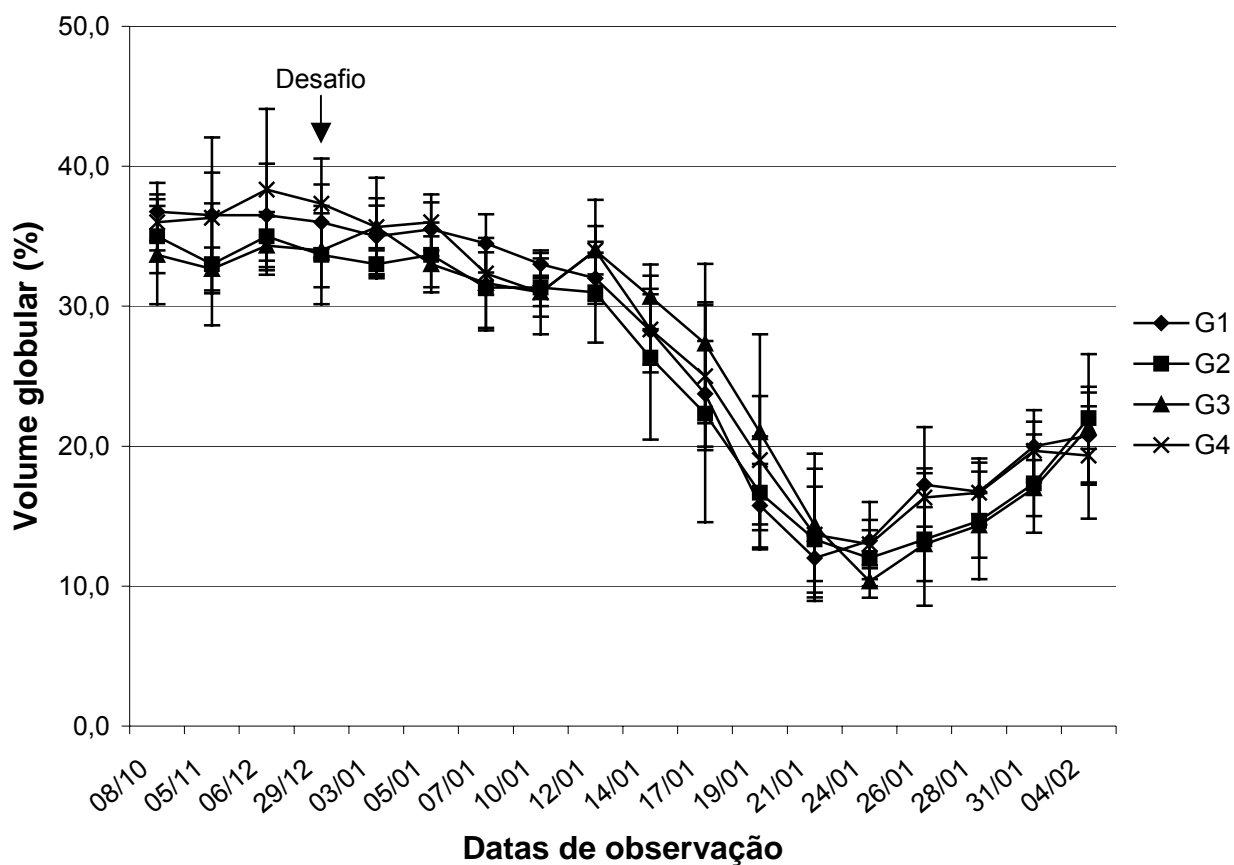


Figura 10. Médias e desvios-padrões dos volumes globulares dos bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de *Anaplasma marginale* e controles, posteriormente desafiados com essa riquétisia.

Grupo 1: MSP1a e MSP2 recombinantes + CpG ODN 2006 + alúmen
 Grupo 2: MSP2 recombinante + CpG ODN 2006 + alúmen
 Grupo 3: CpG ODN 2006 + alúmen
 Grupo 4: Alúmen

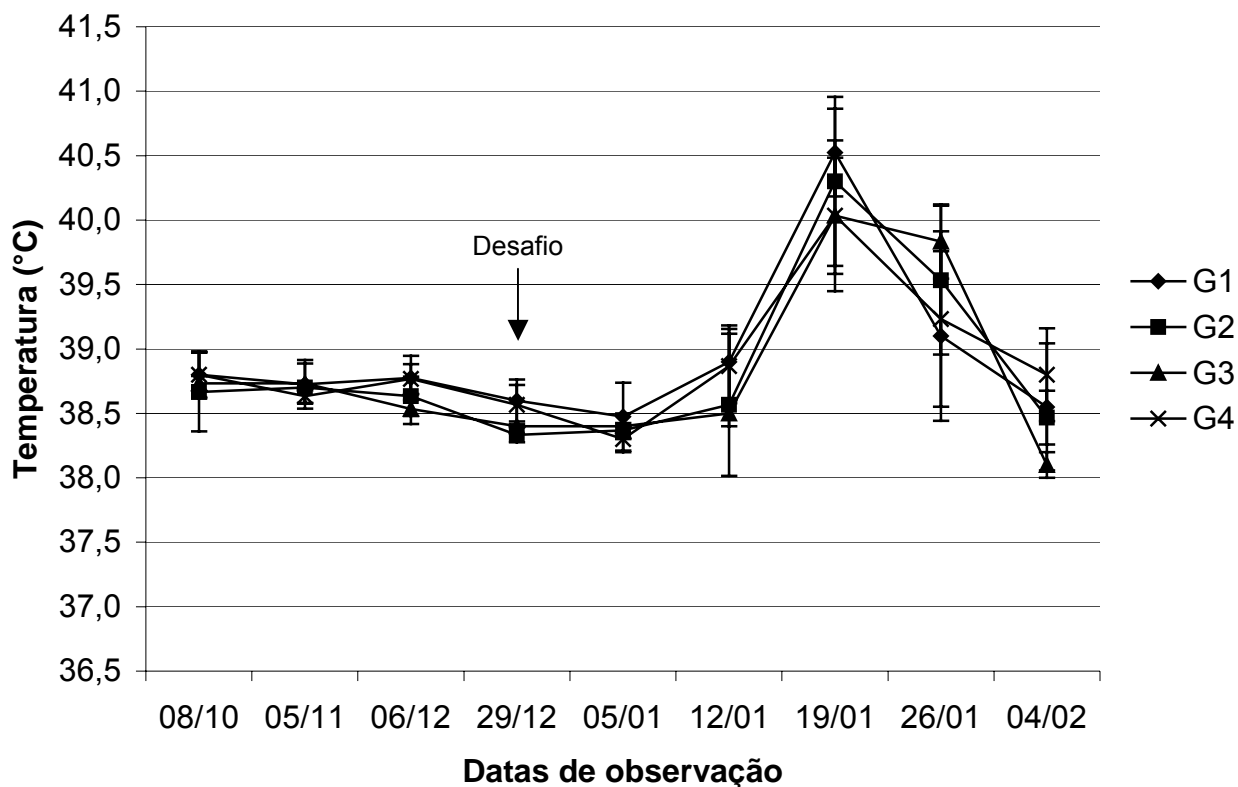


Figura 11. Médias e desvios-padrões das temperaturas retais dos bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de *Anaplasma marginale* e controles, posteriormente desafiados com essa riquétisia.

Grupo 1: MSP1a e MSP2 recombinantes + CpG ODN 2006 + alúmen
 Grupo 2: MSP2 recombinante + CpG ODN 2006 + alúmen
 Grupo 3: CpG ODN 2006 + alúmen
 Grupo 4: Alúmen

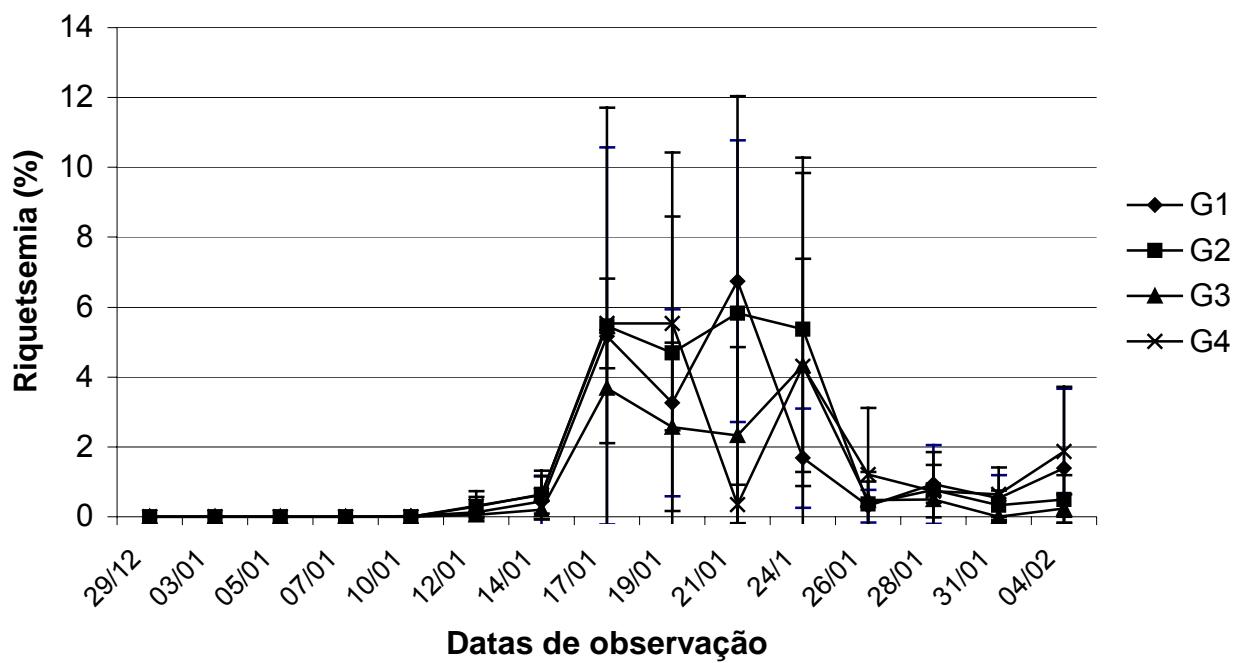


Figura 12. Médias e desvios-padrões das riquetsemias dos bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de *Anaplasma marginale* e controles, após o desafio com a riquétisia.

Grupo 1: MSP1a e MSP2 recombinantes + CpG ODN 2006 + alúmen
 Grupo 2: MSP2 recombinante + CpG ODN 2006 + alúmen
 Grupo 3: CpG ODN 2006 + alúmen
 Grupo 4: Alúmen

As produções de IgG total anti-MSP1a e anti-MSP2 estão demonstradas nas Figuras 13 e 14. Em ambos os ELISAs, todos os animais dos quatro grupos estavam soronegativos no dia da primeira imunização. A partir da terceira imunização, todos os animais dos grupos 1 e 2 apresentavam conversão sorológica, permanecendo assim até o final do experimento. Nos grupos 3 e 4, na totalidade dos animais, observou-se conversão sorológica a partir do 14° DPD, permanecendo até o final do experimento, exceto um animal do grupo 3, cuja sorologia foi negativa na última observação, no ELISA para MSP1a.

Os níveis de IgG contra MSP1a, no dia do desafio, foram significativamente superiores no grupo 1 (MSP1a/MSP2/CpG/alúmen), com relação aos grupos controle 3 (CpG/alúmen) ($P < 0,0001$) e 4 (alúmen) ($P < 0,0001$). Após o desafio, os níveis de IgG anti-MSP1a, para todos os grupos, aumentaram significativamente. No entanto, na comparação entre grupos, os níveis máximos de IgG total diferiram apenas entre os grupos 1 e 4 ($P = 0,0074$).

O pico dos níveis de IgG contra MSP1a foi observado no momento em que ocorreram as maiores riquetsemias. Em seguida, os níveis de anticorpos permaneceram a níveis superiores (grupo 1, $P = 0,0150$), semelhantes (grupo 3, $P = 0,1113$) ou inferiores (grupo 4, $P = 0,0224$) aos níveis detectados no momento do desafio.

Os níveis de IgG contra MSP2, no dia do desafio, foram significativamente superiores no grupo 1 (MSP1a/MSP2/CpG/alúmen) com relação aos grupos controle 3 (CpG/alúmen) ($P < 0,0001$) e 4 (alúmen) ($P < 0,0001$). Também foram significativamente superiores no grupo 2 (MSP2/CpG/alúmen), com relação aos controles 3 (CpG/alúmen) ($P = 0,0018$) e 4 (alúmen) ($P = 0,0002$). Após o desafio, em todos os grupos, os níveis de IgG anti-MSP2 aumentaram significativamente.

No entanto, na comparação entre grupos, os níveis máximos de IgG total anti-MSP2 nos grupos imunizados (1 e 2) foram significativamente superiores apenas com relação ao grupo 4 ($P = 0,0221$ e $0,0416$, respectivamente).

O pico dos níveis de IgG contra MSP2 também ocorreu no momento em que ocorreram as maiores ricketsemias. Em seguida, os níveis de anticorpos diminuíram a níveis semelhantes (grupos 1, 2 e 3, $P = 0,5828$, $0,1018$ e $0,0637$, respectivamente) ou inferiores (grupo 4, $P = 0,0192$) aos níveis detectados no momento do desafio.

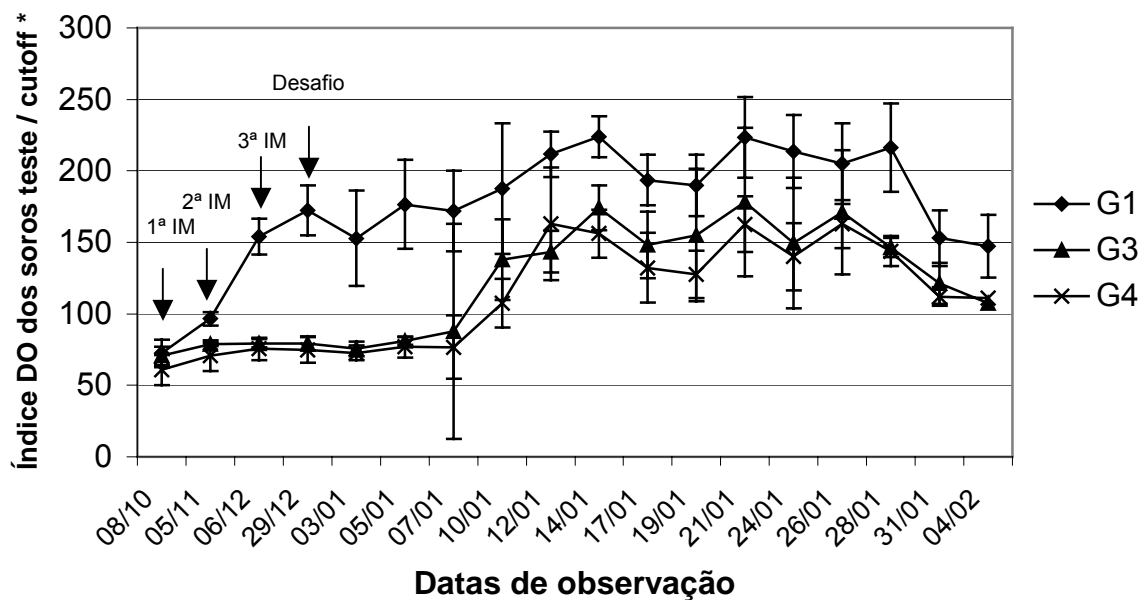


Figura 13. Produção de IgG total contra MSP1a em bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de *Anaplasma marginale* e controles, posteriormente desafiados com a riquétisia.

Grupo 1: MSP1a e MSP2 recombinantes + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 3: CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 4: Alúmen

*Resultados expressos como índice da densidade óptica (DO) dos soros teste e a linha de corte (*cutoff*) da respectiva placa de ELISA.

IM = imunização

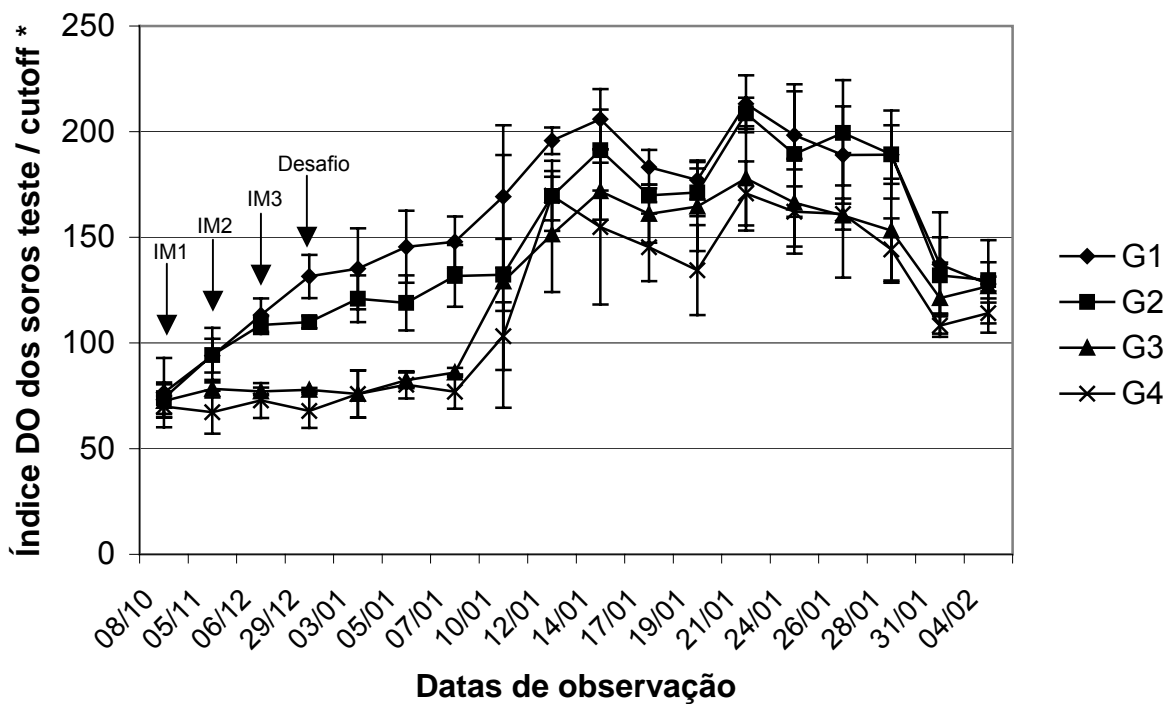


Figura 14. Produção de IgG total contra MSP2 em bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de *Anaplasma marginale* e controles, posteriormente desafiados com a riquetsia.

Grupo 1: MSP1a e MSP2 recombinantes + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 2: MSP2 recombinante + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 3: CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 4: Alúmen

*Resultados expressos como índice da densidade óptica (DO) dos soros teste e a linha de corte (*cutoff*) da respectiva placa de ELISA.

IM = imunização

As produções de IgG₂ contra MSP1a e anti-MSP2 estão demonstradas nas Figuras 13 e 14. Antes da primeira imunização, todos os animais estavam negativos para IgG₂ contra MSP1a e MSP2. No dia do desafio, todos os animais dos grupos imunizados apresentaram anticorpos IgG₂ contra MSP2 e/ou MSP1a, permanecendo assim até o final do experimento. Nos grupos 3 e 4, a quase totalidade dos animais apresentou conversão sorológica a partir do 14° DPD. No entanto, ao final do experimento, um animal do grupo 3 e todos os bovinos do grupo 4 estavam negativos para IgG₂ contra MSP1a e MSP2.

Os níveis de IgG₂ contra MSP1a, no dia do desafio, foram significativamente superiores no grupo 1, com relação aos grupos controle 3 ($P = 0,0298$) e 4 ($P < 0,0250$). Após o desafio, houve um aumento significativo nos níveis de IgG₂ anti-MSP1a nos grupos 1 e 4 ($P = 0,0151$ e $0,0097$, respectivamente). Na comparação entre grupos, os níveis máximos de IgG₂ anti-MSP1a foram significativamente superiores no grupo 1, com relação aos grupos 3 ($P = 0,0308$) e 4 ($P = 0,0289$).

Ao final do experimento, os níveis de IgG₂ anti-MSP1a no grupo 1 permaneceram superiores aos níveis detectados no momento do desafio ($P = 0,0075$); no grupo 3, os níveis foram semelhantes ao desafio ($P = 0,3217$), e no grupo 4, inferiores a esses ($P = 0,0130$).

Os níveis de IgG₂ contra MSP2, no dia do desafio, não diferiram estatisticamente entre os quatro grupos experimentais ($P > 0,05$). Após o desafio, houve um aumento significativo nos níveis de IgG₂ anti-MSP2 nos grupos 1 e 4 ($P = 0,0028$ e $0,0241$, respectivamente). Na comparação entre grupos, os níveis máximos de IgG₂ anti-MSP2 foram significativamente superiores no grupo 1, com relação aos grupos 3 ($P = 0,0337$) e 4 ($P = 0,0481$). No entanto, os níveis máximos de IgG₂ anti-MSP2 não diferiram entre os grupos 2, 3 e 4 ($P > 0,05$).

Ao final do experimento, os níveis de IgG₂ anti-MSP2 nos grupos 1, 2, 3 e 4 permaneceram semelhantes aos níveis do desafio ($P > 0,05$).

Considerando-se como significativas apenas os índices de proliferação celular acima de 2,0, não foi constatada resposta celular de CMSPs frente ao estímulo com MSP1a ou MSP2 em nenhum dos momentos avaliados (pré-imunização, no desafio e quatro semanas após o desafio) pelo método empregado (ELISA para incorporação de 5-bromo-2' desoxiuridina), a despeito das consistentes respostas verificadas frente à estimulação celular com conA (Figura 17).

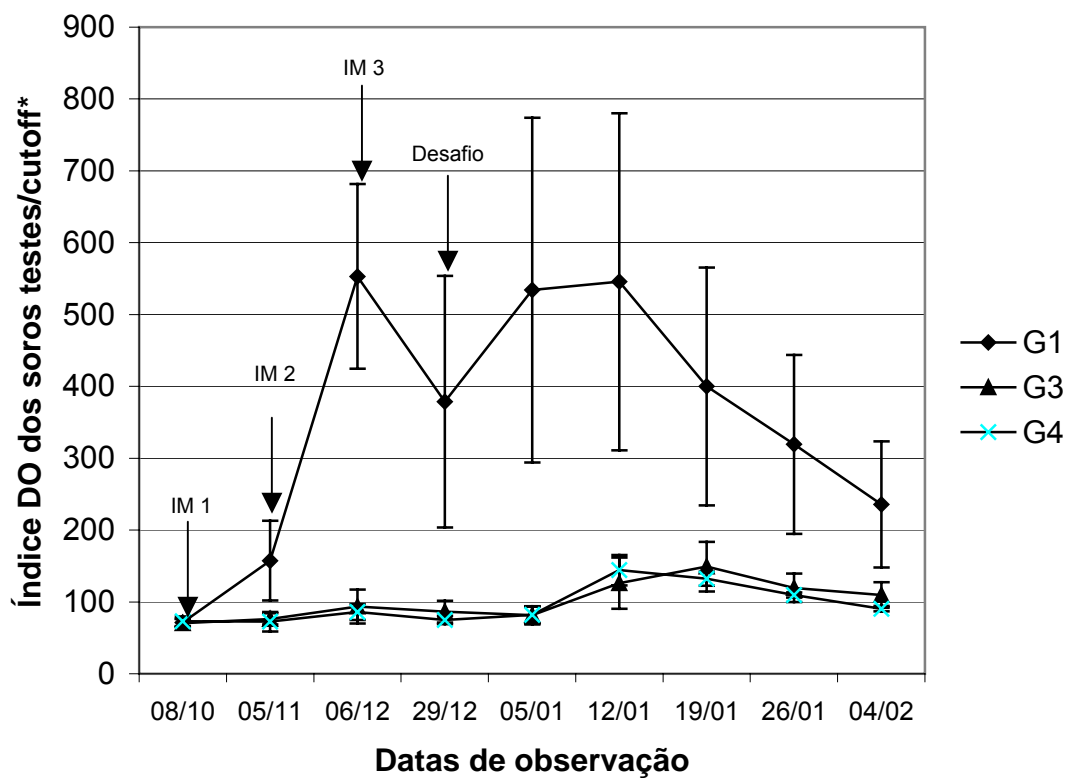


Figura 15. Produção de IgG₂ contra MSP1a em bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de *Anaplasma marginale* e controles, e desafiados com a riquetsia.

Grupo 1: MSP1a e MSP2 recombinantes + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 3: CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 4: Alúmen

*Resultados expressos como índice da densidade óptica (DO) dos soros teste e a linha de corte (*cutoff*) da respectiva placa de ELISA.

IM = imunização

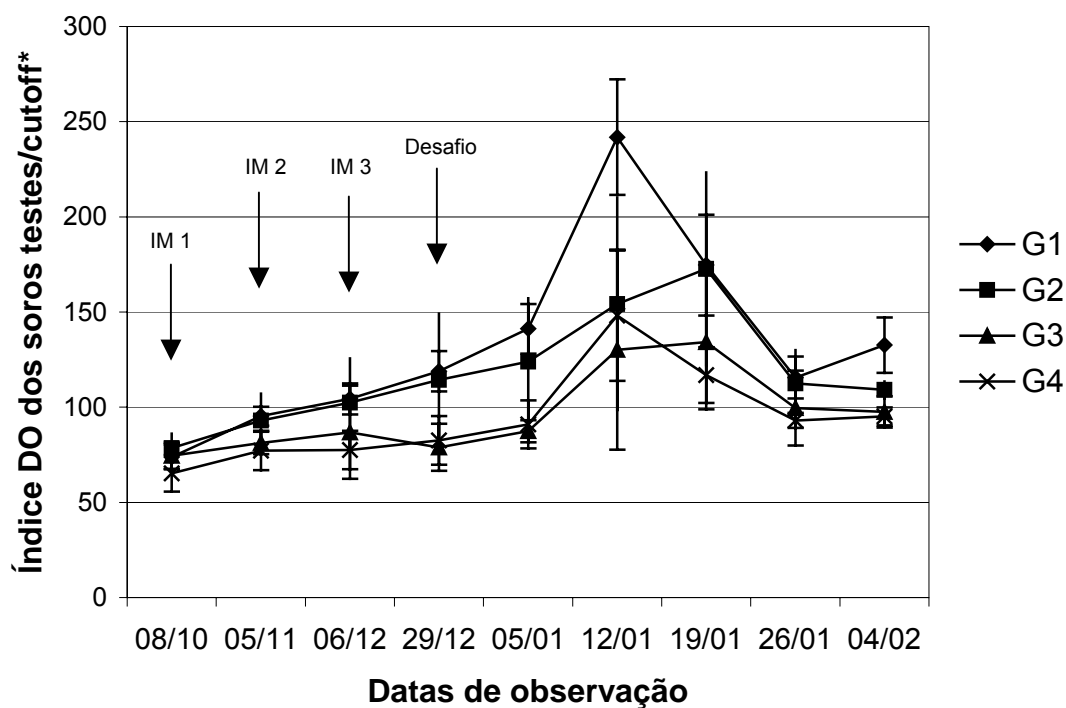


Figura 16. Produção de IgG₂ contra MSP2 em bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de *Anaplasma marginale* e controles, posteriormente desafiados com a riquetsia.

Grupo 1: MSP1a e MSP2 recombinantes + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 2: MSP2 recombinante + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 3: CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 4: Alúmen

*Resultados expressos como índice da densidade óptica (DO) dos soros teste e a linha de corte (*cutoff*) da respectiva placa de ELISA.

IM = imunização

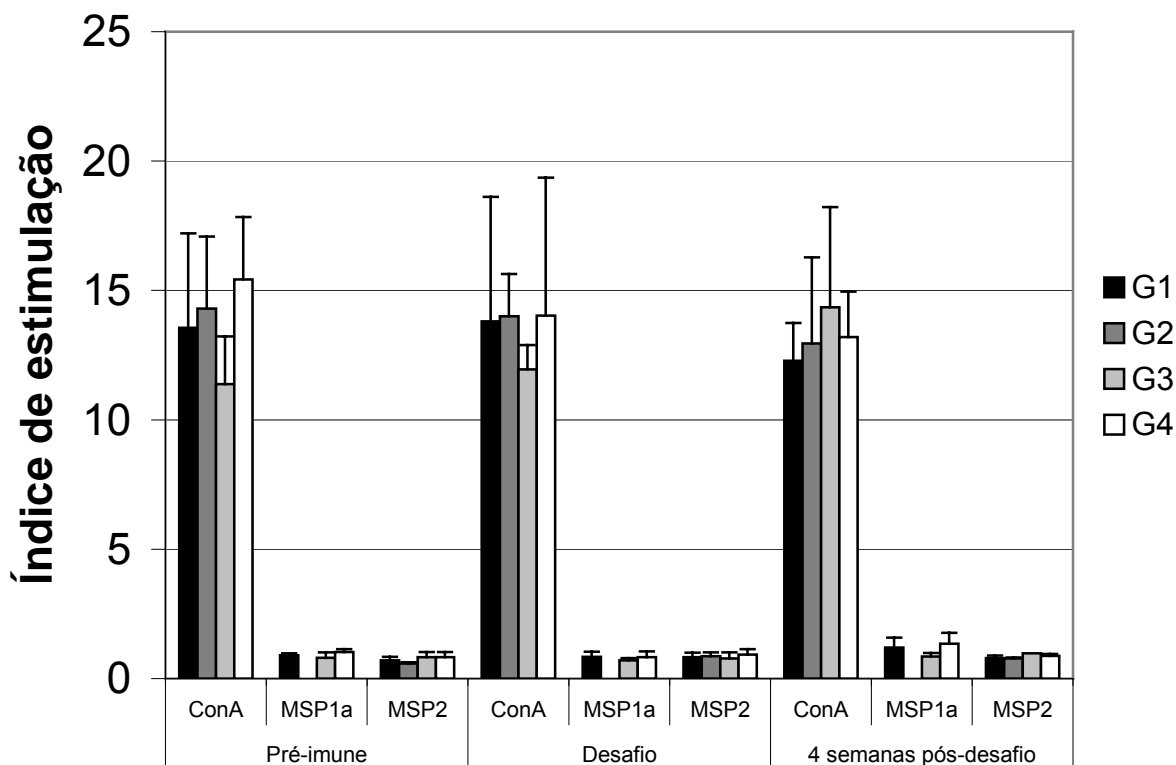


Figura 17. Respostas proliferativas de células mononucleares de sangue periférico de bovinos imunizados com MSP1a e MSP2 recombinantes de *Anaplasma marginale* e posteriormente desafiados com a riquétisia, e controles (ELISA para incorporação de 5-bromo-2' desoxiuridina).

Grupo 1: MSP1a e MSP2 recombinantes + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 2: MSP2 recombinante + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 3: CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 4: Alúmen

Resultados expressos como índice de estimulação (densidades ópticas obtidas nas proliferações celulares frente aos antígenos (Concanavalina A, MSP1a ou MSP2) sobre densidades ópticas obtidas nas proliferação na ausência de antígeno x 100).

IM = imunização

6. DISCUSSÃO

A vacinação é o método mais eficiente e econômico de controle da anaplasnose, um dos importantes objetivos da indústria mundial da bovinocultura (PALMER, 1989). No entanto, as vacinas convencionais, que utilizam organismos provenientes de eritrócitos de bovinos infectados, apresentam limitações em seu uso.

A infecção deliberada de bovinos com *A. marginale* promove proteção contra a doença após desafio subsequente com isolado virulento. Este tipo de imunização e seus derivados, como a infecção e tratamento (premunização) e o uso da espécie menos patogênica *A. centrale*, tem sido usados extensivamente para proteger bovinos de áreas de risco para anaplasnose (PALMER *et al.*, 1999). Embora menos eficientes que as vacinas vivas, os imunógenos baseados em organismos mortos também induzem proteção, manifestada por menores riquetsemias (PALMER, 1989). Esses fatos demonstram claramente que uma imunidade protetora pode ser induzida contra a anaplasnose e fornecem uma base para futuro desenvolvimento de vacinas (PALMER *et al.*, 1999).

As vacinas disponíveis atualmente contra a anaplasnose são derivadas de sangue de animais infectados, resultando em custos elevados para sua produção, problemas de padronização, risco de transmissão de patógenos desconhecidos ou emergentes (PALMER *et al.*, 1999).

Conseqüentemente, as pesquisas atualmente estão focadas na identificação dos mecanismos envolvidos na imunidade protetora e dos epitópos alvo para esses mecanismos.

Este trabalho teve como objetivo testar a imunoproteção induzida pelas proteínas de membrana MSP1a e MSP2 recombinantes de *A. marginale*, associadas com adjuvante CpG ODN 2006, frente a desafio heterólogo e avaliar a resposta imune gerada pela imunização. Diversas etapas experimentais foram executadas, desde a clonagem e expressão dos genes que codificam as duas proteínas, padronização dos testes de diagnóstico usados no estudo, imunização e desafio dos animais experimentais e acompanhamento das respostas imunes humoral e celular.

Inicialmente, os genes que codificam para MSP1a e MSP2 foram clonados em vetor plasmidial e expressos em *E. coli*. Tomando como base as seqüências de nucleotídeos usadas como modelo para desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação e posterior clonagem de *mSP1a* e *mSP2* (números de acesso no Genbank - *mSP1a*: AY010247 e *mSP2*: AF317726), as massas moleculares de MSP1a e MSP2 recombinantes, assim como das seqüências peptídicas codificadas pelo vetor nas regiões N e C terminais de MSP1a e na região N terminal de MSP2; foram preditas usando o programa *Protein Molecular Weight* (disponível em http://bioinformatics.org/sms/prot_mw.html). A massa molecular da MSP1a recombinante detectada neste estudo (33 kDa) estava acima do esperado (27,5 kDa). Uma vez que a região C terminal de MSP1a é altamente conservada, esta diferença na massa molecular pode ser devido à glicosilação desta proteína, que ocorre nas suas formas nativa e recombinante em *E. coli* (GARCIA-GARCIA *et al.*, 2004). Embora os sítios de glicosilação (*O-linked*) sejam mais freqüentes nos domínios repetitivos da região N terminal de MSP1a, a região C terminal recombinante de MSP1a também se mostrou glicosilada (GARCIA-GARCIA *et al.*, 2004).

A massa molecular da MSP2 recombinante detectada neste estudo (44,5 kDa) estava dentro do esperado (42,9 kDa), uma vez que esta proteína pode variar em sua massa molecular (36-44 kDa), devido à região central hipervariável (BROWN *et al.*, 2004).

A despeito da existência de uma região central em MSP2, que compreende epitopos variáveis, incluindo em isolados brasileiros (OLIVEIRA *et al.*, 2003), esta proteína apresenta extremidades N e C terminais conservadas (FRENCH *et al.*, 1999). MSP1a apresenta, em sua extremidade N terminal, domínios repetitivos em número variável, e uma região C terminal conservada (ALLRED *et al.*, 1990). As proteínas recombinantes utilizadas neste trabalho incluem domínios conservados, o que se reflete no reconhecimento das mesmas por soros de bovinos positivos para anticorpos contra *A. marginale* de diferentes regiões do Brasil. Da mesma forma, o epitopo reconhecido pelo AcMo anti-MSP2 ANAO70A2 estava conservado na proteína recombinante, confirmando a identidade da proteína. Este epitopo também é conservado em outros isolados brasileiros de *A. marginale* (Pernambuco Agreste, Pernambuco Sertão e Mato Grosso do Sul) (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Com relação à padronização dos testes de diagnóstico empregados na avaliação dos animais imunizados, as sensibilidades dos ELISAs com MSP1a e MSP2 recombinantes foram elevadas (99,0% para ambos os testes), situando-se entre o ELISA indireto com antígeno bruto (100%) (MADRUGA *et al.*, 2000) e o ELISA competitivo com MSP5 recombinante e anticorpo monoclonal ANAF16C1 (96,0%) (TORIONI DE ECHAIDE *et al.*, 1998) para detecção de anticorpos contra *A. marginale*. As sensibilidades ligeiramente inferiores dos ELISAs com MSP1a e MSP2 recombinantes frente ao ELISA com antígeno bruto provavelmente se deveu à maior diversidade de epitopos encontrados neste último.

Nos ELISAs houve também reconhecimento de MSP1a e MSP2 recombinantes por soros de bovinos de diferentes regiões do Brasil (Goiás e Mato Grosso do Sul, isolados heterólogos; Pernambuco Zona da Mata, isolado homólogo) com alta sensibilidade, refletindo a conservação de domínios em ambas as proteínas.

Com relação à especificidade (100% em ambos os testes), os ELISAs com MSP1a e MSP2 recombinantes apresentaram resultados superiores aos encontrados no ELISA indireto com antígeno bruto (94,0%) (MADRUGA *et al.*, 2000) e no ELISA competitivo (95,0%) (TORIONI DE ECHAIDE *et al.*, 1998).

A superioridade na especificidade dos ELISAs com MSP1a e MSP2 recombinantes frente ao ELISA com antígeno bruto deveu-se provavelmente à ausência de contaminação com proteínas de eritrócitos, as quais são apontadas como causas de reações falso-positivas em ELISAs que utilizam antígeno bruto, pela reação com anticorpos antieritrócitos nos soros testes (BARRY *et al.*, 1986; DUZGUN *et al.*, 1988).

A especificidade superior dos ELISAs com MSP1a e MSP2 (100%) com relação ao ELISA competitivo (95,0%) deveu-se provavelmente à presença de proteína de ligação à maltose (PLM) fusionada à MSP5 nesse último teste. Reações com anticorpos anti-PLM residuais nos soros teste podem bloquear a ligação do anticorpo ANAF16C1 à MSP5 (TORIONI DE ECHAIDE *et al.*, 1998). Esta proteína não está presente nos ELISAs indiretos com MSP1a e MSP2 recombinantes, os quais apresentam, além de alta sensibilidade e especificidade, as vantagens de prescindirem de anticorpos monoclonais e da etapa de adsorção prévia de soros teste.

A despeito da alta concordância entre os dois ELISAs (97,9%, índice *kappa* de 0,89), houve uma ocorrência significativamente maior de resultados negativos no ELISA com MSP1a recombinante, o que pode ser resultado de uma sensibilidade um pouco mais baixa ou de uma especificidade um pouco mais alta deste ELISA. Entretanto, a diferença foi de baixa magnitude e não implica em uma clara vantagem de um teste sobre o outro, já que a concordância foi alta entre os ensaios.

Com relação à PCR para *msp5*, o teste demonstrou-se específico, uma vez que não houve amplificação de fragmentos de DNA a partir do sangue de bovinos de Santa Vitória do Palmar, RS, região livre de carrapatos. O teste também demonstrou sensibilidade superior à análise de distensões sangüíneas coradas e ao ELISA na identificação de bovinos infectados, inclusive detectando a riquetsia durante ao período pré-patente, antes mesmo da conversão sorológica. Também a PCR foi mais sensível durante a fase de convalescença da infecção, já que ao final do experimento, 23,1% dos animais apresentaram-se portadores subclínicos da infecção, com resultados negativos na análise de distensões sangüíneas coradas, enquanto 100% permaneceram positivos na PCR.

Comparando-se a PCR com os ELISAs com MSP1a e MSP2 recombinantes, o teste molecular detectou as infecções por *A. marginale* ainda na fase pré-patente, cinco dias antes da produção de anticorpos contra a riquetsia em ambos os testes sorológicos, o que confirma a alta sensibilidade do teste molecular. A comparação da PCR com os ELISAs na detecção de animais cronicamente infectados não foi feita, uma vez que, ao final do experimento, 76,9% dos animais ainda não haviam entrado nesta fase da infecção. No entanto, na última observação, um bovino apresentou-se positivo na PCR e negativo no ELISA para anticorpos contra

MSP1a. No trabalho realizado por TORIONI de ECHAIDE *et al.* (1998), de 151 bovinos positivos na *nested-PCR* para *mSP5*, seis (4%) foram soronegativos no ELISA competitivo para MSP5.

A ausência de diferenças significativas nos percentuais de redução de VG e de aumento da temperatura, bem como nas riquetsemias máximas entre os grupos experimentais, indicam que a imunização com MSP1a associada a MSP2 recombinantes ou MSP2 recombinante isoladamente, utilizando CpG ODN 2006 como adjuvante não foi protetora.

Apesar do pequeno número de animais por tratamento experimental, a cinética de redução dos VGs e de posterior recuperação parcial deste parâmetro (convalescença) foi bastante homogênea entre grupos, ou seja, não foi possível observar um decréscimo ou recuperação de VGs mais acelerados em um grupo experimental específico, o que corrobora a ausência de proteção induzida pelos imunógenos.

A possibilidade dos efeitos da imunização não terem se manifestado em razão de um desafio com inóculo alto ($3,2 \times 10^7$ eritrócitos infectados) não parece provável, em função de todos os animais terem se recuperado sem tratamento. Além disso, GALE *et al.* (1996) não encontraram diferenças significativas na severidade da anemia induzida pela inoculação de bovinos com 10^6 , 10^8 e 10^{10} eritrócitos infectados com a riquetsia. Em diversos estudos de imunoproteção, envolvendo proteínas de membrana nativa ou recombinantes de *A. marginale* e nos quais foi observada proteção, o desafio foi feito com número de eritrócitos infectados acima do que foi utilizado neste estudo (PALMER *et al.*, 1988; PALMER *et al.*, 1989; MONTENEGRO-JAMES *et al.*, 1991; HOPE *et al.*, 2003; RIDING *et al.*, 2003).

A dosagem das proteínas recombinantes empregada nesse trabalho (três doses de 200 µg por animal), foi superior à empregada em outros estudos em que foram utilizadas proteínas nativas purificadas (PALMER *et al.*, 1986a; PALMER *et al.*, 1988; PALMER *et al.*, 1989) ou recombinantes de *A. marginale* (HOPE *et al.*, 2004), nos quais verificou-se imunoproteção contra desafio com a riquétisia.

A ausência de proteção também não se deveu à ausência de resposta humoral, já que os níveis significativos de IgG total contra MSP1a e MSP2 foram detectados no dia do desafio nos grupos imunizados e aumentaram após o desafio (efeito *booster*).

Após o desafio, os níveis máximos de IgG anti-MSP1a ou anti-MSP2 foram superiores ao controle com alúmen, não diferindo, no entanto, do grupo inoculado com CpG 2006/alúmen.

Como seria de se esperar em infecções persistentes (ABBOTT *et al.*, 2005), ao final do experimento, os níveis de IgG total anti-MSP1a ou anti-MSP2 permaneceram semelhantes ou superiores aos níveis do desafio, nos grupos imunizados e nos controles com CpG 2006/alúmen. No entanto, apresentaram-se significativamente inferiores aos níveis do desafio no grupo controle com alúmen.

Apesar da indução da produção de IgG total contra MSP1a e MSP2 pelas imunizações, sabe-se que a proteção contra a anaplasnose está mais especificamente associada à indução de IgG₂ (BROWN *et al.*, 1998a).

Assim, avaliou-se a hipótese da ausência de proteção estar associada à uma deficiente produção dessa subclasse de anticorpo. De fato, não foi possível detectar níveis significantes de IgG₂ contra MSP2 após as imunizações. Porém o mesmo não ocorreu com relação à MSP1a, e, apesar disso, no grupo imunizado

com essa proteína, a despeito dos altos níveis de IgG₂, não houve proteção contra o desafio heterólogo com *A. marginale* virulento.

Uma outra possibilidade seria uma maior produção de IgG₁ com relação à IgG₂, já que essa subclasse apresenta menor capacidade opsonizante em bovinos, característica importante para o controle das infecções por *A. marginale* (BROWN *et al.*, 1998a, b).

O isotipo IgG₂ apresenta maior capacidade de promover fagocitose por meio de opsonização do que a IgG₁ (McGUIRE *et al.*, 1979), estando provavelmente envolvido no processo de neutralização da infectividade de corpúsculos iniciais de *A. marginale* mediada por anticorpos (TUO *et al.*, 2000).

Apesar dessa hipótese não ter sido testada, há ainda muita controvérsia sobre o papel do balanço entre IgG₁ e IgG₂, já que bovinos que sofreram depleção parcial de células CD4⁺ apresentaram redução de seis vezes nos níveis de IgG₁ com relação ao grupo controle e ausência de IgG₂ específica para *A. marginale*, porém controlaram a infecção pela riquetsia (VALDEZ *et al.*, 2002), demonstrando que talvez a IgG₁ possa desempenhar um papel relevante nesta função. No entanto, em bovinos, a produção de IgG₁ é estimulada principalmente em respostas Th0 e Th2 (ESTES e BROWN, 2002).

Nesta espécie, poucos clones de linfócitos T auxiliares tipo 2 (Th2) ocorrem em animais infectados ou imunizados com antígenos moduladores deste tipo de resposta (exemplo: helmintos) (ESTES e BROWN, 2002). No entanto, em estudos *in vitro* utilizando bovinos experimentalmente infectados com o trematódeo *Fasciola hepatica*, foram detectados clones Th0 expressando níveis relativamente altos de transcritos de IL-4, quando comparados com aqueles de IFN- γ , além de baixos níveis de secreção IFN- γ (BROWN *et al.*, 1999a, b). Esses clones Th0

estimularam a produção de IgG₁ por linfócitos B autólogos, co-cultivados com antígenos, porém não aumentaram a produção de IgG₂ (BROWN *et al.*, 1999a, b).

Os estudos *in vitro* demonstraram a habilidade de IFN- γ bovino de aumentar a produção de IgG₂ por linfócitos B estimulados de maneira T-dependente ou independente (ESTES *et al.*, 1994; ESTES *et al.*, 1998). Como em outras espécies, a IL-12 também é um potente indutor de IFN- γ por células T, durante a estimulação *ex vivo* de células de memória/efetoras, ou por clones estabelecidos de células T, expressando tanto citocinas do padrão Th1 ou Th2 (TUO *et al.*, 1999). Paradoxalmente, em bovinos, a IL-12 estimula principalmente a produção de IgG₁ (TUO *et al.*, 2000; ESTES e BROWN, 2002), sugerindo que fatores adicionais podem ser requeridos para produção ótima de IgG₂ em bovinos, como por exemplo, IFN tipo 1 (ESTES e BROWN, 2002).

Em bovinos, os membros da família IFN tipo 1 compreendem IFN- α , IFN- β e IFN- τ (derivado de trofoblasto). IFN- α e IFN- τ estimulam a produção de citocinas do tipo 1 (IL-2 e IFN- γ) por culturas de linfócitos T CD4⁺ de memória/efetores, estimulados por antígeno, específicos para os patógenos *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* (TUO *et al.*, 1999). Estudos *in vitro* também demonstraram que IFN tipo 1 estimulam a produção de IgG₂ e IgA, mas não IgG₁, por linfócitos B co-estimulados por IL-2, CD40L e anti-IgM de superfície, para mimetizar ativação T-dependente (ESTES *et al.*, 1998).

O CpG ODN 2006, utilizado como adjuvante neste estudo, induz principalmente a produção de IgG₁ em bovinos, a despeito da estimulação da secreção de IFN- γ (ZHANG *et al.*, 2003), o que também corrobora a importância de outros fatores reguladores da produção de IgG₂ em bovinos.

Pela análise dos dados do presente estudo, possivelmente houve mecanismos reguladores da produção de IgG₂ distintos nos animais imunizados com MSP1a/MSP2 e aqueles imunizados apenas com MSP2. Estes mecanismos poderiam estar associados, por exemplo, à estimulação diferenciada de IFN- γ , muito embora, caso existente, essa diferença não refletiu no grau de proteção frente ao desafio.

Uma outra possibilidade para explicar a ausência de proteção induzida pela imunização com MSP1a/MSP2 seria a deficiente estimulação de resposta celular.

Testando essa hipótese, avaliou-se a resposta proliferativa de CMSPs dos bovinos imunizados frente a MSP1a e MSP2a recombinantes, não sendo possível detectar resposta celular durante a fase de imunização ou após o desafio com isolado heterólogo, a despeito de consistentemente ter sido verificada resposta celular frente à estimulação com concanavalina A.

No entanto, um fator que pode ter influenciado na detecção das respostas proliferativas foi o método empregado, que mediu a incorporação celular de 5-bromo-2' desoxiuridina (BrdU), análogo da timidina, durante a síntese de DNA durante a proliferação. Embora relatado que a sensibilidade do *kit* é semelhante ao método tradicional de análise de incorporação de ³H-timidina, o número de CMSPs recomendado (5 x 10⁴ por poço) é inferior ao usualmente empregado. Apesar desse fato não ter afetado a proliferação frente à concanavalina A, o mesmo não pode necessariamente ser dito com relação aos antígenos MSP1a e MSP2 recombinantes. O uso de CMSPs em concentrações maiores, neste *kit*, gerou *background* elevado nos controles sem antígeno (dados não demonstrados).

Outro fator que poderia ter gerado uma falha na detecção de resposta celular proliferativa seria a concentração dos antígenos (7,5 μ g/mL), porém na curva

concentração-resposta, feita na padronização das reações, concentrações acima de 15-30 $\mu\text{g/mL}$ dos antígenos resultou em inibição da proliferação, o que também foi verificado quando utilizamos antígeno bruto solúvel de *A. marginale* em concentrações mais altas (dados não demonstrados). Esse fenômeno já foi relatado em ensaios linfoproliferativos, com concentrações superiores a 25 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno bruto de *A. marginale* (BROWN *et al.*, 1998a).

Outro fator que poderia ter afetado a detecção de respostas celulares seria um possível efeito tóxico da utilização de MSP1a e MSP2 recombinantes como antígeno, porém essas proteínas, após a purificação, foram extensivamente dialisadas em tampão fosfato, para retirada de potenciais inibidores de proliferação celular.

Os fatos acima expostos sugerem que a ausência de proteção induzida pela imunização pode ter sido devido à uma fraca ou mesmo ausente estimulação de resposta celular.

ESTES e BROWN (2002) sugeriram que fracas respostas contra MSP2, associada a IL-12 como adjuvante, com predomínio de IgG₁ sobre IgG₂, podem ocorrer após múltiplas imunizações.

Após a conclusão deste trabalho, um artigo foi publicado no qual bovinos imunizados seis vezes com 50 μg de MSP2, associado a 1 mg de CpG ODN 2006 ou a 10 μg de IL-12 recombinante humana, apresentaram respostas celulares e humorais, caracterizadas pela presença de números significativos de células produtoras de IFN- γ no ELISPOT e produção de títulos mensuráveis de IgG₁ e IgG₂ (IgG₁ > IgG₂). Após desafio com 3×10^3 eritrócitos infectados com isolado homólogo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos imunizados e controle, com relação ao percentual de redução de VG e níveis de

riquetsemia, indicando ausência de proteção. Analisando-se as respostas celulares e humorais após as imunizações, os números de células produtoras de IFN- γ foram semelhantes após as imunizações e antes do pico de riquetsemia, indicando que o desafio não provocou efeito *booster*. No entanto, após o pico de riquetsemia, houve queda dramática do número de células produtoras de IFN- γ . Os títulos de IgG₁ e IgG₂ atingiram um pico simultaneamente às riquetsemias máximas e, subsequentemente, caíram a níveis iguais ou superiores aos pré-desafio (ABBOTT *et al.*, 2005).

A ausência de respostas de memória no estudo não pôde ser diretamente atribuída à emergência de novas variantes de MSP2 (funcionando como peptídeos antagonistas), nem a mecanismos regulatórios gerados por células ou citocinas supressoras (ex: IL-10 ou TGF- β); ou deficiência na apresentação de antígenos. Também não foi produto de imunossupressão generalizada, já que os animais responderam a antígenos clostridiais durante a fase aguda. Cogitou-se a possibilidade de *A. marginale* induzir deleção periférica de células T, o que é condizente com o fato do antígeno bruto dessa riquetsia (assim como MSP1a e MSP2 recombinantes em nosso trabalho) inibir de maneira dose-dependente a proliferação de CMSPs de bovinos imunes. No entanto, caso verdadeiro, este mecanismo seria ainda não compreendido, uma vez que não se conhece a interação de eritrócitos infectados com células T (ABBOTT *et al.*, 2005).

No presente estudo, não foi possível observar respostas T de memória, a despeito da estimulação de respostas humorais de memória induzidas pela imunização. Nesta última, observou-se um padrão distinto de resposta entre os animais imunizados com MSP1a/MSP2/CpG ODN 2006 e somente com MSP2/CpG ODN 2006, quanto à estimulação de IgG₂. No entanto, essas

diferenças não refletiram no grau de imunoproteção entre os grupos frente ao desafio heterólogo.

De maneira consistente com os resultados obtidos por ABBOTT *et al.* (2005), a imunização com MSP2, nativa ou recombinante, com CpG ODN 2006 não confere proteção contra desafio homólogo ou heterólogo com *A. marginale* virulento, assim como a associação de MSP2 e MSP1a recombinantes, associada a CpG ODN 2006, não mostrou-se eficiente na imunoproteção contra desafio heterólogo.

Estudos mais aprofundados, visando esclarecer realmente qual o mecanismo imunológico de controle das infecções por *A. marginale* serão necessários, em face dos novos conhecimentos sugerindo a modulação do sistema imune bovino por essa riquetsia. Além disso, outros potenciais imunógenos devem ser testados em diferentes adjuvantes, sobretudo em ensaios de imunoproteção frente a desafios homólogo e heterólogo com *A. marginale*, um vez que dados de estimulação de resposta celular não necessariamente se correlacionam à proteção frente à riquetsia.

Nosso grupo de pesquisa na Embrapa Gado de Corte está atualmente testando outras alternativas de imunização contra *A. marginale*, utilizando associações de proteínas de membrana com diferentes adjuvantes e *A. marginale* cultivada em células de *B. microplus*, bem como realizando estudos de conservação em genes que codificam para proteínas de membrana recentemente descobertas, visando a disponibilização de tecnologias mais modernas, seguras e eficientes de imunização contra a anaplasnose.

7. CONCLUSÕES

- Os ensaios de imunoadsorção enzimática (ELISA) indiretos baseados em MSP1a e MSP2 recombinantes e a PCR para *msp5* apresentaram bom desempenho na detecção dos bovinos infectados com *Anaplasma marginale*
- A imunização de bovinos com a proteína de membrana recombinante MSP2, isoladamente ou em associação com MSP1a, tendo CpG ODN 2006 em alúmen como adjuvante, não conferiu proteção contra desafio heterólogo por *A. marginale*.
- A imunização dos bovinos com as referidas proteínas estimulou resposta humoral (IgG) significativa, porém não induziu resposta celular.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, J. R.; PALMER, G. H.; HOWARD, C. J.; HOPE, J. C.; BROWN, W. C. *Anaplasma marginale* major surface protein 2 CD4⁺-T-cell epitopes are evenly distributed in conserved and hypervariable regions (HVR), whereas linear B-cell epitopes are predominantly located in the HVR. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 72, n. 12, p. 7360-7366, 2004.

ABBOTT, J. R.; PALMER, G. H.; KEGERREIS, K. A.; HETRICK, P. F.; HOWARD, C. J.; HOPE, J. C.; BROWN, W. C. Rapid and long-term disappearance of CD4⁺ T lymphocyte responses specific for *Anaplasma marginale* major surface protein-2 (MSP2) in MSP2 vaccinates following challenge with live *A. marginale*. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 174, n. 11, p. 6702-6715, 2005.

AGUIRRE, D. H.; BERMUDEZ, A. C.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Natural infection with *Anaplasma marginale* in cattle of the Hereford, Criolla, and Nelore breeds in Tucuman, Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, México, v. 30, n. 1, p. 37-41, 1988.

AHMAD-NEJAD P, HACKER H, RUTZ M, BAUER S, VABULAS RM, WAGNER H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *European Journal of Immunology*, Weinheim, v. 32, n. 7, p. 1958-1968, 2002.

AJAYI, S. A.; WILSON, A. J.; CAMPBELL, R. S. F. Experimental bovine anaplasmosis: clinico-pathological and nutritional studies. *Research in Veterinary Science*, Oxford, v. 25, p. 76-81, 1978.

ALEXOPOULOU, L.; HOLT, A. C.; MEDZHITOV, R.; FLAVELL, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, London, v. 413, n. 6857, p. 732-738, 2001.

ALLEMAN, A. R.; BARBET, A. F. Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 34, n. 2, p. 270-276, 1996.

ALLEMAN, A. R.; PALMER, G. H.; McGUIRE, T. C.; McELWAIN, T. F.; PERRYMAN, L. E.; BARBET, A. F. *Anaplasma marginale* major surface protein 3 is encoded by a polymorphic, multigene family. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 65, n. 1, p. 156-163, 1997.

ALLRED, D. R.; McGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; LEIB, S. R.; HARKINS, T. M.; McELWAIN, T. F.; BARBET, A. F. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, Washington, v. 87, n. 8, p. 3220-3224, 1990.

ANDERSSON, S. G.; ZOMORODIPOUR, A.; ANDERSSON, J. O.; SICHERITZ-PONTEN, T.; ALSMARK, U. C.; PODOWSKI, R. M.; NASLUND, A. K.; ERIKSSON, A. S.; WINKLER, H. H.; KURLAND, C. G. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*, London, v. 396, n. 6707, p. 133-140, 1998.

ARAUJO, F. R.; ARRUDA, A.; BACANELLI, G.; SANTOS, L. R.; MADRUGA, C. R.; SOARES, C. O. Diagnóstico de *Anaplasma marginale* por reação em cadeia da polimerase para o gene *msp5*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA (CONBRAVET), 19, 2002, Gramado, RS. *Anais ...* Porto Alegre, RS: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2002.

ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; LEAL, C. R. B.; BASTOS, P. A. S.; MARQUES, A. P. C. Frequência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da Bahia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 50, n. 3, p. 243-246, 1998.

ARULKANTHAN, A.; BROWN, W. C.; McGUIRE, T. C.; KNOWLES, D. P. Biased immunoglobulin G1 isotype responses induced in cattle with DNA expressing *msp1a* of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 67, p. 3481-3287, 1999.

BARBET, A. F.; BLENTLINGER, R.; YI, J.; LUNDGREN, A. M.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture, tick salivary glands, and cattle. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 67, n. 1, p. 102-107, 1999.

BARBET, A. F.; PALMER, G. H.; MYLER, P. J.; McGUIRE, T. C. Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for polypeptide Am105L. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 55, n. 10, p. 2428-2435, 1987.

BARBET, A. F.; YI, J.; LUNDGREN, A.; McEWEN, B. R.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Antigenic variation of *Anaplasma marginale*: major surface protein 2 diversity during cyclic transmission between ticks and cattle. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 69, n. 5, p. 3057-3066, 2001.

BARRY, D. N.; PARKER, R. J.; DE VOS, A. J.; DUNSTER, P.; RODWELL, B. J. A microplate enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibody to *Anaplasma marginale* in cattle serum. *Australian Veterinary Journal*, Sydney, v. 63, n. 3, p. 76-79, 1986.

BAUER, M.; REDECKE, V.; ELLWART, J. W.; SCHERER, B.; KREMER, J. P.; WAGNER, H.; LIPFORD, G. B. Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 166, n. 8, p. 5000-5007, 2001.

BELARDELLI, F.; FERRANTINI, M.; SANTINI, S. M.; BACCARINI, S.; PROIETTI, E.; COLOMBO, M. P.; SPRENT, J.; TOUGH, D. F. The induction of in vivo proliferation of long-lived CD44^{hi} CD8⁺ T cells after the injection of tumor cells expressing IFN- α 1 into syngeneic mice. *Cancer Research*, Chicago, v. 58, n. 24, p. 5795-5802, 1998.

BIRON, C. A. Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Seminars in Immunology*, Philadelphia, v. 10, n. 5, p. 383-390, 1998.

BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Morphology and development of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales:Anaplasmataceae) in cultured *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) cells. *Journal of Medical Entomology*, Honolulu, v. 35, n. 5, p. 788-797, 1998.

BLOUIN, E. F.; SALIKI, J. T.; FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; KOCAN, K. M. Antibodies to *Anaplasma marginale* major surface proteins 1a and 1b inhibit infectivity for cultured tick cells. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 111, n. 2-3, p. 247-260, 2003.

BRANDA, R. F.; MOORE, A. L.; MATHEWS, L.; McCORMACK, J. J.; ZON, G. Immune stimulation by an antisense oligomer complementary to the rev gene of HIV-1. *Biochemical Pharmacology*, Oxford, v. 45, n. 10, p. 2037-2043, 1993.

BRAYTON, K. A.; KAPPMAYER, L. S.; HERNDON, D.R.; DARK, M. J.; TIBBALS, D. L.; PALMER, G. H.; McGUIRE, T. C.; KNOWLES, D. P. Jr. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, Washington, v. 102, n. 3, p. 844-849, 2005.

BRAYTON, K. A.; KNOWLES, D. P.; McGUIRE, T. C.; PALMER, G. H. Efficient use of a small genome to generate antigenic diversity in tick-borne ehrlichial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, Washington, v. 98, n. 7, p. 4130-4135, 2001.

BRAYTON, K. A.; MEEUS, P. F.; BARBET, A. F.; PALMER, G. H. Simultaneous variation of the immunodominant outer membrane proteins, MSP2 and MSP3, during *Anaplasma marginale* persistence in vivo. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 71, n. 11, p. 6627-6632, 2003.

BRAYTON, K. A.; PALMER, G. H.; LUNDGREN, A.; YI, J.; BARBET, A. F. Antigenic variation of *Anaplasma marginale* msp2 occurs by combinatorial gene conversion. *Molecular Microbiology*, Oxford, v. 43, n. 5, p. 1151-1159, 2002.

BRIZUELA, C. M.; ORTELLADO, C. A.; SANABRIA, E.; TORRES, O.; ORTIGOSA, D. The safety and efficacy of Australian tick-borne disease vaccine strains in cattle in Paraguay. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 76, p. 27-41, 1998.

BROWN, C. G. Dynamic and impact of tick-borne diseases of cattle. *Tropical Animal Health and Production*, Edinburgh, v. 29, p. 1-3, 1997.

BROWN, W. C.; BRAYTON, K. A.; STYER, C. M.; PALMER, G. H. The hypervariable region of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 (MSP2) contains multiple immunodominant CD4⁺ T lymphocyte epitopes that elicit variant-specific proliferative and IFN- γ responses in MSP2 vaccinates. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 170, n. 7, p. 3790-3798, 2003.

BROWN, W. C.; McELWAIN, T. F.; PALMER, G. H.; CHANTLER, S. E.; ESTES, D. M. Bovine CD4⁺ T-lymphocyte clones specific for rhoptry-associated protein 1 of *Babesia bigemina* stimulate enhanced immunoglobulin G1 (IgG₁) and IgG₂ synthesis. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 67, n. 1, p. 155-164, 1999.

BROWN, W. C.; McGUIRE, T. C.; ZHU, D.; LEWIN, H. A.; SOSNOW, J.; PALMER, G. H. Highly conserved regions of the immunodominant major surface protein 2 of the genogroup II ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale* are rich in naturally derived CD4⁺ T lymphocyte epitopes that elicit strong recall responses. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 166, p. 1114-1124, 2001a.

BROWN, W. C.; McGUIRE, T. C.; MWANGI, W.; KEGERREIS, K. A.; MACMILLAN, H.; LEWIN, H. A.; PALMER, G. H. Major histocompatibility complex class II DR-restricted memory CD4⁺ T lymphocytes recognize conserved immunodominant epitopes of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 70, n. 10, p. 5521-5532, 2002.

BROWN, W. C.; PALMER, G. H.; BRAYTON, K. A.; MEEUS, P. F.; BARBET, A. F.; KEGERREIS, K.A.; McGUIRE, T. C. CD4⁺ T lymphocytes from *Anaplasma marginale* major surface protein 2 (MSP2) vaccinees recognize naturally processed epitopes conserved in MSP3. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 72, n. 6, p. 3688-3692, 2004.

BROWN, W. C.; PALMER, G. H.; LEWIN, H. A.; McGUIRE, T. C. CD4⁺ T Lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1 (MSP1); a heteromeric complex of MSP1a and MSP1b; preferentially recognize the MSP1a carboxyl terminus that is conserved among strains. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 69, p. 6853-6862, 2001b.

BROWN, W. C.; SHKAP, V.; ZHU, D.; McGUIRE, T. C.; TUO, W.; McELWAIN, T. F.; PALMER, G. H. CD4⁺ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 66, p. 5406-5413, 1998a.

BROWN, W. C.; SUAREZ, C. E.; SHODA, L. K.; ESTES, D. M. Modulation of host immune responses by protozoal DNA. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v. 72, n. 1-2, p. 87-94, 1999.

BROWN, W. C.; ZHU, D.; SHKAP, V.; McGUIRE, T. C.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M.; PALMER, G. H. The repertoire of *Anaplasma marginale* antigens recognized by CD4⁺ T-lymphocyte clones from protectively immunized cattle is diverse and includes major surface protein 2 (MSP-2) and MSP-3. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 66, p. 5414-5422, 1998b.

CANTOR, G. H.; PONTZER, C. H.; PALMER, G. H. Opsonization of *Anaplasma marginale* mediated by bovine antibody against surface protein MSP-1. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v. 37, n. 3-4, p. 343-350, 1993.

CARSON, C. A.; SELLS, D. M.; RISTIC, M. Cutaneous hypersensitivity and isoantibody production in cattle injected with live or inactivated *Anaplasma marginale* in bovine and ovine erythrocytes. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v. 37, n. 9, p. 1059-1063, 1976.

CELLA, M.; JARROSSAY, D.; FACCHETTI, F.; ALEBARDI, O.; NAKAJIMA, H.; LANZAVECCHIA, A.; COLONNA, M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nature Medicine*, New York, v. 5, n. 8, p. 919-923, 1999.

DAUBENBERGER, C. A.; TARACHA, E. L.; GAIDULIS, L.; DAVIS, W. C.; McKEEVER, D. J. Bovine $\gamma\delta$ T-cell responses to the intracellular protozoan parasite *Theileria parva*. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 67, n. 5, p. 2241-2249, 1999.

DAVIS, H. L.; WEERATNA, R.; WALDSCHMIDT, T. J.; TYGRET, L.; SCHORR, J.; KRIEG, A. M. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 160, n. 2, p. 870-876, 1998.

DIEU, M. C.; VANBERVLIET, B.; VICARI, A.; BRIDON, J. M.; OLDHAM, E.; AIT-YAHIA, S.; BRIERE, F.; ZLOTNIK, A.; LEBECQUE, S.; CAUX, C. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 188, n. 2, p. 373-386, 1998.

DIKMANS, G. The transmission of anaplasmosis. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v. 11, p. 5-16, 1950.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Reading, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

DUZGUN, A.; SCHUNTNER, C. A.; WRIGHT, I. G.; LEATCH, G.; WALTISBUHL, D. J. A sensitive ELISA technique for the diagnosis of *Anaplasma marginale* infections. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 29, n. 1, p. 1-7, 1988.

ERIKS, I. S.; PALMER, G. H.; McGUIRE, T. C.; ALLRED, D. R.; BARBET, A. F. Detection and quantitation of *Anaplasma marginale* in carrier cattle by using a nucleic acid probe. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 27, n. 2, p. 279-284, 1989.

ERIKS, I. S.; STILLER, D.; PALMER, G. H. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 31, n. 8, p. 2091-2096, 1993.

ESTES, D. M.; BROWN, W. C. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v. 90, n. 1-2, p. 1-10, 2002.

ESTES, D. M.; CLOSSER, N. M.; ALLEN, G. K. IFN- γ stimulates IgG₂ production from bovine B cells costimulated with anti- μ and mitogen. *Cellular Immunology*, New York, v. 154, p. 287-295, 1994.

ESTES, D. M.; CLOSSER, N. M.; ALLEN, G. K. IFN- γ stimulates IgG₂ production from bovine B cells costimulated with anti- μ and mitogen. *Cellular Immunology*, New York, v. 154, n. 1, p. 287-295, 1994.

ESTES, D. M.; TUO, W.; BROWN, W. C.; GOIN, J. Effects of type I/type II interferons and transforming growth factor- β on B-cell differentiation and proliferation. Definition of costimulation and cytokine requirements for immunoglobulin synthesis and expression. *Immunology*, Oxford, v. 95, n. 4, p. 604-611, 1998.

EWING, S. A. Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. p. 395-423. In: R. J. Hidalgo and E. W. Jones (ed.), Proceedings of the 7th National Anaplasmosis Conference. Mississippi State University, Mississippi State, 1981.

FOIL, L. D. Tabanids as vectors of disease agents. *Parasitology Today*, Amsterdam, v. 5, p.88-96, 1989.

FRANCIS, D. H.; KINDEN, D. A.; BUENING, G. M. Characterization of the inclusion limiting membrane of *Anaplasma marginale* by immunoferritin labeling. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v. 40, n. 6, p. 777-782, 1979.

FRENCH, D. M.; BROWN, W. C.; PALMER, G. H. Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 67, n. 11, p. 5834-5840, 1999.

FRENCH, D. M.; McELWAIN, T. F.; McGUIRE, T. C.; PALMER, G. H. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 66, n. 3, p. 1200-1207, 1998.

FREY, A.; DI CANZI, J.; ZURAKOWSKI, D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *Journal of Immunological Methods*, Amsterdam, v. 221, p. 35-41, 1998.

- FUENTE, J., GARCIA-GARCIA, J. C.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. *International Journal for Parasitology*, Oxford, v. 31, p. 145-153, 2001.
- FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 91, p. 265-283, 2003a.
- FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; BLOUIN, E. F.; SALIKI, J. T.; KOCAN, K. M. Infection of tick cells and bovine erythrocytes with one genotype of the intracellular ehrlichia *Anaplasma marginale* excludes infection with other genotypes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Washington, v. 9, n. 3, p. 658-668, 2002a.
- FUENTE, J.; KOCAN, K. M. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants in persistently infected ticks. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 69, n. 8, p. 5151-5156, 2001.
- FUENTE, J.; PASSOS, L. M.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; RIBEIRO, M. F.; FACURY-FILHO, E. J.; KOCAN, K. M. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 121, n. 3-4, p. 307-316, 2004.
- FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; GARCIA-GARCIA, J. C.; RODRÍGUEZ, S. D.; GARCIA, M. A.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; FRICHE PASSOS, L. M.; BARBOSA RIBEIRO, M. F.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 88, n. 3, p. 275-285, 2002b.
- FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; PRADO, T. M.; KOCAN, K. M. *Anaplasma marginale* *msp1 α* genotypes evolved under positive selection pressure but are not markers for geographic isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 41, n. 4, p. 1609-1616, 2003b.
- GALE, K. R.; LEATCH, G.; DeVOS, A. J.; JORGENSEN, W. K. *Anaplasma marginale*: effect of challenge of cattle with varying doses of infected erythrocytes. *International Journal for Parasitology*, Oxford, v. 26, n. 12, p. 1417-1426, 1996.
- GALE, K. R.; LEATCH, G.; DIMMOCK, C. M.; WOOD, P. R. *Anaplasma marginale*: effect of the treatment of cattle with an interferon gamma-neutralizing monoclonal antibody or the nitric oxide synthetase inhibitor aminoguanidine on the course of infection. *Parasite Immunology*, Oxford, v. 19, n. 9, p. 411-417, 1997.
- GALE, K. R.; LEATCH, G.; GARTSIDE, M.; DIMMOCK, C. M. *Anaplasma marginale*: failure of sera from immune cattle to confer protection in passive-transfer experiments. *Parasitology Research*, Berlin, v. 78, p. 410-415, 1992.
- GALHOTRA, A. P.; GAUTAM, O. P.; BANERJEE, D. P.; CHAUBAN, H. V. S.; SINGH, R. P.; KALRA, D. S. Pathological changes in bovine anaplasmosis. *Indian Veterinary Journal*, Madras, v. 54, p. 599-601, 1977.

GARCIA-GARCIA, J. C.; FUENTE, J.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; HALBUR, T.; ONET, V. C.; SALIKI, J. T. Mapping of B-cell epitopes in the N terminal repeated peptides of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and characterization of the humoral immune response of cattle immunized with recombinant and whole organism antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v. 98, n. 3-4, p. 137-151, 2004a.

GARCIA-GARCIA, J. C.; FUENTE, J.; BELL-EUNICE, G.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Glycosylation of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and its putative role in adhesion to tick cells. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 72, n. 5, p. 3022-3030, 2004b.

GARCIA-GARCIA, J. C.; FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; JONSON, T. J.; HALBUR, T.; ONET, V. C.; SALIKI, J. T.; KOCAN, K. M. Differential expression of the *msp1 α* gene of *Anaplasma marginale* occurs in bovine erythrocytes and tick cells. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 98, n. 3-4, p. 261-272, 2004c.

GE, N. L.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; MURPHY, G. L. Developmental studies of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) infected as adult using nonradioactive in situ hybridization. *Journal of Medical Entomology*, Honolulu, v. 33, p. 911-920, 1996.

GHOSH, D. K.; MISUKONIS, M. A.; REICH, C.; PISETSKY, D. S.; WEINBERG, J. B. Host response to infection: the role of CpG DNA in induction of cyclooxygenase 2 and nitric oxide synthase 2 in murine macrophages. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 69, n. 12, p. 7703-7710, 2001.

GOLDAMMER, T.; ZERBE, H.; MOLENAAR, A.; SCHUBERTH, H. J.; BRUNNER, R. M.; KATA, S. R.; SEYFERT, H. M. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Washington, v. 11, n. 1, p. 174-185, 2004.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA-BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Veterinária*, Rio de Janeiro, v. 125, p. 8-10, 2002.

HACKER, H.; MISCHAK, H.; MIETHKE, T.; LIPTAY, S.; SCHMID, R.; SPARWASSER, T.; HEEG, K.; LIPFORD, G. B.; WAGNER, H. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO Journal*, Eynsham, v. 17, n. 21, p. 6230-6240, 1998.

HACKER, H.; VABULAS, R. M.; TAKEUCHI, O.; HOSHINO, K.; AKIRA, S.; WAGNER, H. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 192, n. 4, p. 595-600, 2000.

HARTMANN, G.; KRIEG, A. M. CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes. *Gene Therapy*, London, v. 6, n. 5, p. 893-903, 1999.

HARTMANN, G.; KRIEG, A. M. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 164, n. 2, p. 944-953, 2000.

HARTMANN, G.; KRUG, A.; WALLER-FONTAINE, K.; ENDRES, S. Oligodeoxynucleotides enhance lipopolysaccharide-stimulated synthesis of tumor necrosis factor: dependence on phosphorothioate modification and reversal by heparin. *Molecular Medicine*, Cambridge, v. 2, n. 4, p. 429-438, 1996.

HARTMANN, G.; WEERATNA, R. D.; BALLAS, Z. K.; PAYETTE, P.; BLACKWELL, S.; SUPARTO, I.; RASMUSSEN, W. L.; WALDSCHMIDT, M.; SAJUTHI, D.; PURCELL, R. H.; DAVIS, H. L.; KRIEG, A. M. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 164, n. 3, p. 1617-1624, 2000.

HAYASHI, F.; SMITH, K. D.; OZINSKY, A.; HAWN, T. R.; YI, E. C.; GOODLETT, D. R.; ENG, J. K.; AKIRA, S.; UNDERHILL, D. M.; ADEREM, A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, London, v. 410, n. 6832, p. 1099-1103, 2001.

HEIT, A.; MAURER, T.; HOCHREIN, H.; BAUER, S.; HUSTER, K. M.; BUSCH, D. H.; WAGNER, H. Cutting edge: Toll-like receptor 9 expression is not required for CpG DNA-aided cross-presentation of DNA-conjugated antigens but essential for cross-priming of CD8 T cells. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 170, n. 6, p. 2802-2805, 2003.

HEMMI, H.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; KAISHO, T.; SATO, S.; SANJO, H.; MATSUMOTO, M.; HOSHINO, K.; WAGNER, H.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, London, v. 408, n. 6813, p. 740-745, 2000.

HIDALGO, R. J. Propagation of *Anaplasma marginale* in bovine lymph node cell culture. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v. 36, n. 5, p. 635-640, 1975.

HIDALGO, R. J.; JONES, E. W.; BROWN, J. E.; AINSWORTH, A. J. *Anaplasma marginale* in tick cell culture. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v. 50, n. 12, p. 2028-2032, 1989a.

HIDALGO, R. J.; PALMER, G. H.; JONES, E. W.; BROWN, J. E.; AINSWORTH, A. J. Infectivity and antigenicity of *Anaplasma marginale* from tick cell culture. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v. 50, n. 12, p. 2033-2036, 1989b.

HOPE, M.; RIDING, G.; MENZIES, M.; WILLADSEN, P. A novel antigen from *Anaplasma marginale*: characterization, expression and preliminary evaluation of the recombinant protein. *Vaccine*, Amsterdam, v. 22, n. 3-4, p. 407-415, 2004.

- HORNUNG, V.; ROTHENFUSSER, S.; BRITSCH, S.; KRUG, A.; JAHRSDORFER, B.; GIESE, T.; ENDRES, S.; HARTMANN, G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 168, n. 9, p. 4531-4537, 2002.
- JATKAR, P. R.; KREIER, J. P. Pathogenesis of anemia in *Anaplasma* infection. *Indian Veterinary Journal*, Madras, v. 44, n. 5, p. 393-399, 1967.
- JONES, W. E.; KLIOWER, I. O.; NORMAN, B. B.; BROCK, W. E. *Anaplasma marginale* infection in young and aged cattle. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v. 29, n. 3, p. 535-544, 1968.
- KADOWAKI, N.; HO, S.; ANTONENKO, S.; MALEFYT, R. W.; KASTELEIN, R. A.; BAZAN, F.; LIU, Y. J. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 194, n. 6, p. 863-869, 2001.
- KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 1589, n. 1, p. 1-13, 2002.
- KANO, F. S.; VIDOTTO, O.; PACHECO, R. C.; VIDOTTO, M. C. Antigenic characterization of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 87, n. 2, p. 131-138, 2002.
- KESSLER, R. H.; RISTIC, M. In vitro cultivation of *Anaplasma marginale*: invasion of and development in noninfected erythrocytes. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v. 40, n. 12, p. 1774-1776, 1979.
- KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. *Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos*. Embrapa Gado de Corte: Campo Grande, 1998. 157p.
- KIESER, S. T.; ERIKS, I. S.; PALMER, G. H. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 58, n. 4, p. 1117-1119, 1990.
- KIRSCHNING, C. J.; WESCHE, H.; MERRILL AYRES, T.; ROTHE, M. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 188, n. 11, p. 2091-2097, 1998.
- KLINMAN, D. M.; TAKESHITA, F.; GURSEL, I.; LEIFER, C.; ISHII, K. J.; VERTHELYI, D.; GURSEL, M. CpG DNA: recognition by and activation of monocytes. *Microbes and Infection*, Paris e New York, v. 4, n. 9, p. 897-901, 2002.
- KNOWLES, D.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; PALMER, G.; McGUIRE, T.; STILLER, D.; McELWAIN, T. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 34, n. 9, p. 2225-2230, 1996.

- KOCAN, K. M., STILLER, D.; GOFF, W. L.; CLAYPOOL, P. L.; EDWARDS, W.; EWING, S. A.; McGUIRE, T. C.; HAIR, J. A.; BARRON, S. J. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from infected to susceptible cattle. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v. 53, p. 499-507, 1992a.
- KOCAN, K. M.; ALBUR, T.; BLOUIN, E. F.; ONET, V.; FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C., SALIKI, J. T. Immunization of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 102, n. 1-2, p. 151-161, 2001.
- KOCAN, K. M.; FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A. A.; MELENDEZ, R. D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 16, p. 698-712, 2003.
- KOCAN, K. M.; GOFF, W. L.; STILLER, D.; CLAYPOOL, P. L.; EDWARDS, W.; EWING, S. A.; HAIR, J. A.; BARRON, S. J. Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible cattle. *Journal of Medical Entomology*, Honolulu, v. 29, p.657-668, 1992b.
- KRAMER, M. S.; FEINSTEIN, A. R. Clinical biostatistics. LIV. The biostatistics of concordance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, Saint Louis, v. 29, n. 1, p. 111-123, 1981.
- KRIEG, A. M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annual Review of Immunology*, Palo Alto, v. 20, p. 709-760, 2002.
- KRIEG, A. M.; WAGNER, H. Causing a commotion in the blood: immunotherapy progresses from bacteria to bacterial DNA. *Immunology Today*, Amsterdam, v. 21, n. 10, p. 521-526, 2000.
- KRIEG, A. M.; WAGNER, H. Causing a commotion in the blood: immunotherapy progresses from bacteria to bacterial DNA. *Immunology Today*, Amsterdam, v. 21, n. 10, p. 521-526, 2000.
- KRIEG, A. M.; YI, A. K.; MATSON, S.; WALDSCHMIDT, T. J.; BISHOP, G. A.; TEASDALE, R.; KORETZKY, G. A.; KLINMAN, D. M. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, London, v. 374, n. 6522, p.546-549, 1995.
- KRUG, A.; TOWAROWSKI, A.; BRITSCH, S.; ROTHENFUSSER, S.; HORNUNG, V.; BALS, R.; GIESE, T.; ENGELMANN, H.; ENDRES, S.; KRIEG, A. M.; HARTMANN, G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *European Journal of Immunology*, Weinheim, v. 31, n. 10, p. 3026-3037, 2001.
- LAHMERS, K. K.; NORIMINE, J.; ABRAHAMSEN, M. S.; PALMER, G. H.; BROWN, W. C. The CD4⁺ T cell immunodominant *Anaplasma marginale* major surface protein 2 stimulates $\gamma\delta$ T cell clones that express unique T cell receptors. *Journal of Leukocyte Biology*, New York, v. 77, n. 2, p. 199-208, 2005.

- LEAL, M.; NODA, A.; REYNA-BELLO, A.; CASAS, B.; PRECIGOUT, E.; ASO, P. M.; GORENFLOT, A.; GONZATTI, M. I. Identification and characterization of corpuscular, soluble and secreted antigens of a Venezuelan isolate of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 94, n. 1-2, p. 1-15, 2000.
- LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J. M.; HOFFMANN, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, Cambridge, v. 86, n. 6, p. 973-983, 1996.
- LIN, M.; RIKIHISA, Y. *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 71, n. 9, p. 5324-5331, 2003.
- LIPFORD, G. B.; BAUER, M.; BLANK, C.; REITER, R.; WAGNER, H.; HEEG, K. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *European Journal of Immunology*, Weinheim, v. 27, n. 9, p. 2340-2344, 1997.
- LIPFORD, G. B.; SPARWASSER, T.; BAUER, M.; ZIMMERMANN, S.; KOCH, E. S.; HEEG, K.; WAGNER, H. Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *European Journal of Immunology*, Weinheim, v. 27, n. 12, p. 3420-3426, 1997.
- LOETSCHER, M.; LOETSCHER, P.; BRASS, N.; MEESE, E.; MOSER, B. Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *European Journal of Immunology*, Weinheim, v. 28, n. 11, p. 3696-3705, 1998.
- LÖHR, C. V.; BRAYTON, K. A.; BARBET, A. F.; PALMER, G. H. Characterization of the *Anaplasma marginale msp2* locus and its synteny with the *omp1/p30* loci of *Ehrlichia chaffeensis* and *E. canis*. *Gene*, Amsterdam, v. 325, p. 115-121, 2004.
- LÖHR, C. V.; BRAYTON, K. A.; SHKAP, V.; MOLAD, T.; BARBET, A.F.; BROWN, W. C.; PALMER, G. H. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 operon-associated proteins during mammalian and arthropod infection. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 70, n. 11, p. 6005-6012, 2002a.
- LÖHR, C. V.; RURANGIRWA, F. R.; McELWAIN, T. F.; STILLER, D.; PALMER, G. H. Specific expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 salivary gland variants occurs in the midgut and is an early event during tick transmission. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 70, n. 11, p. 114-120, 2002b.
- MADRUGA, C. R.; KESSLER, R. H.J.; GOMES, A.; SCHENK, M. A. M.; ANDRADE, D. F. Níveis de anticorpos e parasitemia de *Anaplasma marginale* em área enzoótica, nos bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 1, p. 135-142, 1985.
- MADRUGA, C. R.; MARQUES, A. P. C.; LEAL, C. R. B.; CARVALHO, C. M. E.; ARAÚJO, F. R.; KESSLER, R. H. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against *Anaplasma marginale*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 20, n. 3, p.109-112, 2000.

- MANGI, M. H.; NEWLAND, A. C. Interleukin-3 in hematology and oncology: current state of knowledge and future directions. *Cytokines, Cellular & Molecular Therapy*, London, v. 5, n. 2, p. 87-95, 1999.
- MARBLE, D. W.; HANKS, M. A. A tissue culture method for *Anaplasma marginale*. *Cornell Veterinarian*, Ithaca, v. 62, n. 2, p. 196-205, 1972.
- McBRIDE, J. W.; YU, X. J.; WALKER, D. H. Glycosylation of homologous immunodominant proteins of *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia canis*. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 68, n. 1, p. 13-18, 2000.
- McGAREY, D. J.; ALLRED, D. R. Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 62, n. 10, p. 4587-4593, 1994.
- McGAREY, D. J.; BARBET, A. F.; PALMER, G. H.; McGUIRE, T. C.; ALLRED, D.R. Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 62, p. 4594-4601, 1994.
- McGUIRE, T. C.; DAVIS, W. C.; BRASSFIELD, A. L.; McELWAIN, T. F.; PALMER, G. H. Identification of *Anaplasma marginale* long-term carrier cattle by detection of serum antibody to isolated MSP-3. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 29, n. 4, p. 788-793, 1991.
- McGUIRE, T. C.; MUSOKE, A. J.; KURTTI, T. Functional properties of bovine IgG₁ and IgG₂: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. *Immunology*, Oxford, v. 38, p. 249-256, 1979.
- McGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; GOFF, W. L.; JOHNSON, M. I.; DAVIS, W. C. Common and isolate-restricted antigens of *Anaplasma marginale* detected with monoclonal antibodies. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 45, n. 3, p. 697-700, 1984.
- MENA, A.; NICHANI, A. K.; POPOWYCH, Y.; IOANNOU, X. P.; GODSON, D. L.; MUTWIRI, G. K.; HECKER, R.; BABIUK, L. A.; GRIEBEL, P. Bovine and ovine blood mononuclear leukocytes differ markedly in innate immune responses induced by Class A and Class B CpG-oligodeoxynucleotide. *Oligonucleotides*, Larchmont, v. 13, n. 4, p. 245-259, 2003.
- MOLAD, T.; BRAYTON, K. A.; PALMER, G. H.; MICHAELI, S.; SHKAP, V. Molecular conservation of MSP4 and MSP5 in *Anaplasma marginale* and *A. centrale* vaccine strain. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 100, n. 1-2, p. 55-64, 2004.
- MONTENEGRO-JAMES, S.; JAMES, M. A.; BENITEZ, M. T.; LEON, E.; BAEK, B. K.; GUILLEN, A. T. Efficacy of purified *Anaplasma marginale* initial bodies as a vaccine against anaplasmosis. *Parasitology Research*, Berlin, v. 77, n. 2, p. 93-101, 1991.

- MUNDERLOH, U. G.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M.; GE, N. L.; EDWARDS, W. L.; KURTTI, T. J. Establishment of the tick (Acari:Ixodidae)-borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales:Anaplasmataceae) in tick cell culture. *Journal of Medical Entomology*, Honolulu, v. 33, n. 4, p. 656-664, 1996.
- MUNODZANA, D.; McELWAIN, T. F.; KNOWLES, D. P.; PALMER, G. H. Conformational dependence of *Anaplasma marginale* major surface protein 5 surface-exposed B-cell epitopes. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 66, p. 2619-2624, 1998.
- NDUNG'U, L. W.; AGUIRRE, C.; RURANGIRWA, F. R.; McELWAIN, T. F.; McGUIRE, T. C.; KNOWLES, D. P.; PALMER, G. H. Detection of *Anaplasma ovis* infection in goats by major surface protein 5 competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 33, n. 3, p. 675-679, 1995.
- NICHANI, A. K.; MENA, A.; POPOWYCH, Y.; DENT, D.; TOWNSEND, H. G.; MUTWIRI, G. K.; HECKER, R.; BABIUK, L. A.; GRIEBEL, P. J. In vivo immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotide in cattle and sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v. 98, n. 1-2, p. 17-29, 2004.
- OBERLE, S. M.; PALMER, G. H.; BARBET, A. F. Expression and immune recognition of the conserved MSP4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 61, n. 12, p. 5245-5251, 1993.
- OBERLE, S. M.; PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; McGUIRE, T. C. Molecular size variations in an immunoprotective protein complex among isolates of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 56, n. 6, p. 1567-1573, 1988.
- OHASHI, N.; UNVER, A.; ZHI, N.; RIKIHISA, Y. Cloning and characterization of multigenes encoding the immunodominant 30-kilodalton major outer membrane proteins of *Ehrlichia canis* and application of the recombinant protein for serodiagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 36, n. 9, p. 2671-2680, 1998a.
- OHASHI, N.; ZHI, N.; ZHANG, Y.; RIKIHISA, Y. Immunodominant major outer membrane proteins of *Ehrlichia chaffeensis* are encoded by a polymorphic multigene family. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 66, n. 1, p. 132-139, 1998b.
- OLIVEIRA, J. B.; MADRUGA, C. R.; SCHENCK, M. A. M.; KESSLER, R. H.; MIGUITA, M.; ARAÚJO, F. R. Antigenic characterization of Brazilian isolates of *Anaplasma marginale*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p. 395-400, 2003.
- PALMER, G. H. *Anaplasma* vaccines. In: WRIGHT, I. G. *Veterinary protozoan and hemoparasite vaccines*. Boca Raton: CRC Press, 1989. p.1-29.
- PALMER, G. H. The highest priority: what microbial genomes are telling us about immunity. *Veterinary Immunology Immunopathology*, Amsterdam, v. 85, n. 1-2, p. 1-8, 2002.

PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; CANTOR, G. H.; McGUIRE, T. C. Immunization of cattle with the MSP-1 surface protein complex induces protection against a structurally variant *Anaplasma marginale* isolate. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 57, n. 11, p. 3666-3669, 1989.

PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; DAVIS, W. C.; McGUIRE, T. C. Immunization with an isolate-common surface protein protects cattle against anaplasmosis. *Science*, Washington, v. 231, p. 1299-1302, 1986a.

PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; KUTTLER, K.L.; McGUIRE, T. C. Detection of an *Anaplasma marginale* common surface protein present in all stages of infection. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 23, n. 6, p. 1078-1083, 1986b.

PALMER, G. H.; EID, G.; BARBET, A. F.; McGUIRE, T. C.; McELWAIN, T. F. The immunoprotective *Anaplasma marginale* major surface protein 2 is encoded by a polymorphic multigene family. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 62, p. 3808-3816, 1994a.

PALMER, G. H.; KNOWLES, D. P.; RODRIGUEZ, J. L.; GNAD, D. P.; HOLLIS, L. C.; MARSTON, T.; BRAYTON, K. A. Stochastic transmission of multiple genotypically distinct *Anaplasma marginale* strains in a herd with high prevalence of *Anaplasma* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 42, n. 11, p. 5381-5384, 2004.

PALMER, G. H.; McELWAIN, T. F. Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Parasitology Today*, Amsterdam, v. 57, p. 233-253, 1995.

PALMER, G. H.; McGUIRE, T. C. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 133, n. 2, p. 1010-1015, 1984.

PALMER, G. H.; MUNODZANA, D.; TEBELE, N.; USHE, T.; McELWAIN, T. F. Heterologous strain challenge of cattle immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v. 42, n. 3-4, p. 265-273, 1994b.

PALMER, G. H.; OBERLE, S. M.; BARBET, A. F.; GOFF, W. L.; DAVIS, W. C.; McGUIRE, T. C. Immunization of cattle with a 36-kilodalton surface protein induces protection against homologous and heterologous *Anaplasma marginale* challenge. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 56, n. 6, p. 1526-1531, 1988.

PALMER, G. H.; RURANGIRWA, F. R.; McELWAIN, T. F. Strain composition of the ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a mammalian reservoir for tick transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 39, n. 2, p. 631-635, 2001.

POPOV, V. L.; HAN, V. C.; CHEN, S. M.; DUMLER, J. S.; FENG, H. M.; ANDREADIS, T. G.; TESH, R. B.; WALKER, D. H. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *Journal of Medical Microbiology*, Edinburgh, v. 47, p. 235-251, 1998.

- POTGIETER, F. T.; SUTHERLAND, B.; BIGGS, C. Attempts to transmit *Anaplasma marginale* with *Hippobosca rufipes* and *Stomoxys calcitrans*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, Pretoria, v. 48, p. 119-122, 1981.
- POTGIETER, F. T.; van RENSBURG, L. The persistence of colostral *Anaplasma* antibodies and incidence of *in utero* transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, Pretoria, v. 54, n. 4, p.557-560, 1987.
- RESCIGNO, M.; GRANUCCI, F.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Molecular events of bacterial-induced maturation of dendritic cells. *Journal of Clinical Immunology*, New York, v. 20, n. 3, p. 161-166, 2000.
- RIDING, G.; HOPE, M.; WALTISBUHL, D.; WILLADSEN, P. Identification of novel protective antigens from *Anaplasma marginale*. *Vaccine*, Amsterdam, v. 21, p. 1874-1883, 2003.
- RIKIHISA, Y. Mechanisms to create a safe haven by members of the family Anaplasmataceae. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, v. 990, p. 548-555, 2003.
- RISTIC, M.; WATRACH, A. M. Anaplasmosis. VI. Studies and a hypothesis concerning the cycle of development of the causative agent. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v. 24, n. 99, p. 267-277, 1963.
- ROCK, F. L.; HARDIMAN, G.; TIMANS, J. C.; KASTELEIN, R. A.; BAZAN, J. F. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, Washington, v. 95, n. 2, p. 588-593, 1998.
- RODRIGUEZ, S. D.; GARCIA ORTIZ, M. A.; HERNANDEZ SALGADO, G.; SANTOS CERDA, N. A.; ABOYTES TORRE, R.; CANTO ALARCON, G. J. *Anaplasma marginale* inactivated vaccine: dose titration against a homologous challenge. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Oxford, v. 23, n. 4, p. 239-252, 2000.
- ROTHENFUSSER, S.; TUMA, E.; ENDRES, S.; HARTMANN, G. Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG. *Human Immunology*, New York, v. 63, n. 12, p. 1111-1119, 2002.
- RURANGIRWA, F. R.; STILLER, D.; PALMER, G. H. Strain diversity in major surface protein 2 expression during tick transmission of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 68, n. 5, p. 3023-3027, 2000.
- SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunological Reviews*, Copenhagen, v. 177, p. 134-140, 2000.
- SALLUSTO, F.; LENIG, D.; FORSTER, R.; LIPP, M.; LANZAVECCHIA, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, London, v. 401, n. 6754, p. 708-712, 1999.

- SAMISH, M.; PIPANO, E.; HANA, B. Cultivation of *Anaplasma marginale* from cattle in a *Dermacentor* cell line. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v. 49, n. 2, p. 254-256, 1988.
- SCHWANDNER, R.; DZIARSKI, R.; WESCHE, H.; ROTHE, M.; KIRSCHNING, C. J. Peptidoglycan and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 274, n. 25, p. 17406-17409, 1999.
- SHIMADA, M. K.; YAMAMURA, M. H.; KAWASAKI, P. M.; TAMEKUNI, K.; IGARASHI, M.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C. Detection of *Anaplasma marginale* DNA in larvae of *Boophilus microplus* ticks by polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, Washington, v. 1026, p. 95-102, 2004.
- SHKAP, V.; MOLAD, T.; BRAYTON, K. A.; BROWN, W. C.; PALMER, G. H. Expression of major surface protein 2 variants with conserved T-cell epitopes in *Anaplasma centrale* vaccines. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 70, n. 2, p. 642-648, 2002.
- SIVORI, S.; FALCO, M.; DELLA CHIESA, M.; CARLOMAGNO, S.; VITALE, M.; MORETTA, L.; MORETTA, A. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, Washington, v. 101, n. 27, p. 10116-10121, 2004.
- SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; D'AMICO, G.; LUINI, W.; BIANCHI, G.; KATAURA, M.; IMAI, T.; YOSHIE, O.; BONECCHI, R.; MANTOVANI, A. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 161, n. 3, p. 1083-1086, 1998.
- SPARWASSER, T.; MIETHKE, T.; LIPFORD, G.; ERDMANN, A.; HACKER, H.; HEEG, K.; WAGNER, H. Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock. *European Journal of Immunology*, Weinheim, v. 27, n. 7, p. 1671-1679, 1997a.
- SPARWASSER, T.; MIETHKE, T.; LIPFORD, G.; ERDMANN, A.; HACKER, H.; HEEG, K.; WAGNER, H. Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock. *European Journal of Immunology*, Weinheim, v. 27, n. 7, p. 1671-1679, 1997b.
- STACEY, K. J.; SWEET, M. J.; HUME, D. A. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 157, n. 5, p. 2116-2122, 1996.
- STICH, R. W.; KOCAN, K. M.; PALMER, G. H.; EWING, S. A.; HAIR, J. A.; BARRON, S. J. Transstadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentor variabilis*. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v. 50, p. 1377-1380, 1989.
- TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology*, Palo Alto, v. 21, p. 335-376, 2003.

TANAKA, T.; CHU, C. C.; PAUL, W. E. An antisense oligonucleotide complementary to a sequence in I gamma 2b increases gamma 2b germline transcripts, stimulates B cell DNA synthesis, and inhibits immunoglobulin secretion. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 175, n. 2, p. 597-607, 1992.

TEBELE, N., McGUIRE, T. C., PALMER, G. H. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 59, n. 9, p. 3199-3204, 1991.

THEILER, A. "*Anaplasma marginale* (gen. and spec. nov.). The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease." Report to the Government, Transvaal, South Africa. *Veterinary Bacteriology*, Department of Agriculture (1908-9,1910) v. 7, n. 64.

TOKUNAGA, T.; YAMAMOTO, H.; SHIMADA, S.; ABE, H.; FUKUDA, T.; FUJISAWA, Y.; FURUTANI, Y.; YANO, O.; KATAOKA, T.; SUDO, T.; *et al.* Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *Journal of the National Cancer Institute*, Bethesda, v. 72, n. 4, p. 955-962, 1984.

TORIONI DE ECHAIDE, S.; KNOWLES, D. P.; McGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; SUAREZ, C. E.; McELWAIN, T. F. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 36, p. 777-782, 1998.

TOUGH, D. F.; BORROW, P.; SPRENT, J. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science*, Washington, v. 272, n. 5270, p. 1947-1950, 1996.

TUO, W.; PALMER, G. H.; McGUIRE, T. C.; ZHU, D.; BROWN, W. C. Interleukin-12 as an adjuvant promotes immunoglobulin G and type 1 cytokine recall responses to major surface protein 2 of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 68, p. 270-280, 2000.

VALDEZ, R. A.; McGUIRE, T. C.; BROWN, W. C.; DAVIS, W. C.; JORDAN, J. M.; KNOWLES, D. P. Selective in vivo depletion of CD4⁺ T lymphocytes with anti-CD4 monoclonal antibody during acute infection of calves with *Anaplasma marginale*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Washington, v. 9, n. 2, p. 417-424, 2002.

VAN HEERDEN, H.; COLLINS, N. E.; BRAYTON, K. A.; RADEMEYER, C.; ALLSOPP, B. A. Characterization of a major outer membrane protein multigene family in *Ehrlichia ruminantium*. *Gene*, Amsterdam, v. 330, p. 159-168, 2004.

VIDOTTO, M. C.; McGUIRE, T. C.; McELWAIN, T. F.; PALMER, G. H.; KNOWLES, D. P. JR. Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 62, p. 2940-2946, 1994.

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*, Bethesda, v. 60, n. 12, p. 5139-5144, 1992.

- VORDERMEIER, H. M.; PONTAROLLO, R.; KARVONEN, B.; COCKLE, P.; HECKER, R.; SINGH, M.; BABIUK, L. A.; HEWINSON, R. G.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Synthetic peptide vaccination in cattle: induction of strong cellular immune responses against peptides derived from the *Mycobacterium bovis* antigen Rv3019c. *Vaccine*, Amsterdam, v. 23, n. 35, p. 4375-4384, 2005.
- WAGHELA, S. D.; CRUZ, D.; DROLESKEY, R. E.; DELOACH, J. R., WAGNER, G. G. In vitro cultivation of *Anaplasma marginale* in bovine erythrocytes co-cultured with endothelial cells. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 73, n. 1-2, p. 43-52, 1997.
- WAGHELA, S. D.; MELENDY, D.; CRUZ, D.; WAGNER, G. G. Antigenic analysis of *Anaplasma marginale* grown in bovine erythrocytes co-cultured with bovine endothelial cells. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 94, n. 1-2, p. 133-139, 2000.
- WAGNER, H. Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Advances in Immunology*, New York, v. 73, p. 329-368, 1999.
- WAGNER, H. The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends in Immunology*, Oxford, v. 25, n. 7, p. 381-386, 2004.
- WEDLOCK, D. N.; DENIS, M.; SKINNER, M. A.; KOACH, J.; DE LISLE, G. W.; VORDERMEIER, H. M.; HEWINSON, R. G.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; BABIUK, L. A.; HECKER, R.; BUDDLE, B. M. Vaccination of cattle with a CpG oligodeoxynucleotide-formulated mycobacterial protein vaccine and *Mycobacterium bovis* BCG induces levels of protection against bovine tuberculosis superior to those induced by vaccination with BCG alone. *Infection and Immunity*, Bethesda, v. 73, n. 6, p. 3540-3546, 2005a.
- WEDLOCK, D. N.; SKINNER, M. A.; DE LISLE, G. W.; VORDERMEIER, H. M.; HEWINSON, R. G.; HECKER, R.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; BABIUK, L. A.; BUDDLE, B. M. Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* culture filtrate proteins and CpG oligodeoxynucleotides induces protection against bovine tuberculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v. 106, n. 1-2, p. 53-63, 2005b.
- WERLING, D.; HOPE, J. C.; HOWARD, C. J.; JUNGI, T. W. Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. *Immunology*, v. 111, n. 1, p. 41-52, 2004.
- WERLING, D.; JUNGI, T. W. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v. 91, n. 1, p. 1-12, 2003.
- WHITE, S. N.; KATA, S. R.; WOMACK, J. E. Comparative fine maps of bovine toll-like receptor 4 and toll-like receptor 2 regions. *Mammalian Genome*, New York, v. 14, n. 2, p. 149-155, 2003.

- WYATT, C. R.; MADRUGA, C.; CLUFF, C.; PARISH, S.; HAMILTON, M. J.; GOFF, W.; DAVIS, W. C. Differential distribution of gamma delta T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v. 40, n. 3, p.187-199, 1994.
- YAMAMOTO, S.; YAMAMOTO, T.; SHIMADA, S.; KURAMOTO, E.; YANO, O.; KATAOKA, T.; TOKUNAGA, T. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiology and Immunology*, Tokyo, v. 36, n. 9, p. 983-997, 1992.
- YOUNG, M. F.; KUTTLER, K. L.; ADAMS, L. G. Experimentally induced anaplasmosis in neonatal isohemolytic anemia-recovered calves. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v. 38, n. 11, p. 1745-1747, 1977.
- YU, X. J.; ZHANG, X. F.; McBRIDE, J. W.; ZHANG, Y.; WALKER, D. H. Phylogenetic relationships of *Anaplasma marginale* and '*Ehrlichia platys*' to other *Ehrlichia* species determined by GroEL amino acid sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Reading, v. 51, n. 3, p. 1143-1146, 2001.
- ZAUGG, J. L. Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v. 46, n. 3, p. 570-572, 1985.
- ZAUGG, J. L.; KUTTLER, K. L. Bovine anaplasmosis: In utero transmission and the immunologic significance of ingested colostral antibodies. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v. 45, n. 3, p. 440-443, 1984.
- ZHANG, X.; SUN, S.; HWANG, I.; TOUGH, D. F.; SPRENT, J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. *Immunity*, Cambridge, v. 8, n. 5, p. 591-599, 1998.
- ZHANG, Y.; PALMER, G. H.; ABBOTT, J. R.; HOWARD, C. J.; HOPE, J. C.; BROWN, W. C. CpG ODN 2006 and IL-12 are comparable for priming Th1 lymphocyte and IgG responses in cattle immunized with a rickettsial outer membrane protein in alum. *Vaccine*, Amsterdam, v. 21, n. 23, p. 3307-3318, 2003.

9. ANEXOS

9.1. Dados clínicos, bacteriológicos e sorológicos dos bovinos experimentais

Quadro 1. Volumes globulares dos bovinos experimentais.

Grupos	Animal	08/10	05/11	06/12	29/12	03/01	05/01	07/01	10/01	12/01	14/01	17/01	19/01	21/01	24/01	26/01	28/01	31/01	04/02
1	974	38,0	34,0	35,0	38,0	39,0	37,0	35,0	33,0	34,0	32,0	25,0	19,0	12,0	10,0	12,0	15,0	19,0	25,0
	977	39,0	44,0	42,0	37,0	33,0	37,0	32,0	33,0	33,0	29,0	28,0	12,0	10,0	15,0	18,0	20,0	23,0	17,0
	6160	35,0	37,0	35,0	37,0	34,0	35,0	37,0	34,0	30,0	25,0	19,0	15,0	14,0	16,0	22,0	15,0	17,0	19,0
	968	35,0	31,0	34,0	32,0	34,0	33,0	34,0	32,0	31,0	27,0	23,0	17,0	12,0	12,0	17,0	17,0	21,0	22,0
	Média	36,8	36,5	36,5	36,0	35,0	35,5	34,5	33,0	32,0	28,3	23,8	15,8	12,0	13,3	17,3	16,8	20,0	20,8
2	978	37,0	36,0	34,0	37,0	32,0	35,0	32,0	32,0	24,0	20,0	13,0	9,0	12,0	15,0	16,0	21,0	26,0	
	983	36,0	35,0	37,0	34,0	34,0	35,0	34,0	33,0	34,0	33,0	31,0	21,0	15,0	10,0	8,0	10,0	14,0	23,0
	966	32,0	28,0	34,0	30,0	33,0	31,0	28,0	29,0	27,0	22,0	16,0	16,0	16,0	14,0	17,0	18,0	17,0	17,0
	Média	35,0	33,0	35,0	33,7	33,0	33,7	31,3	31,3	31,0	26,3	22,3	16,7	13,3	12,0	13,3	14,7	17,3	22,0
3	1	37,0	31,0	32,0	31,0	32,0	31,0	28,0	28,0	33,0	32,0	32,0	28,0	20,0	11,0	11,0	13,0	17,0	20,0
	975	34,0	34,0	36,0	36,0	39,0	35,0	34,0	34,0	36,0	32,0	29,0	21,0	13,0	11,0	16,0	17,0	19,0	23,0
	967	30,0	33,0	35,0	35,0	36,0	33,0	33,0	31,0	33,0	28,0	21,0	14,0	10,0	9,0	12,0	13,0	15,0	21,0
	Média	33,7	32,7	34,3	34,0	35,7	33,0	31,7	31,0	34,0	30,7	27,3	21,0	14,3	10,3	13,0	14,3	17,0	21,3
4	2	38,0	40,0	45,0	41,0	36,0	38,0	32,0	31,0	38,0	28,0	21,0	15,0	10,0	12,0	17,0	17,0	22,0	19,0
	970	34,0	35,0	35,0	36,0	34,0	34,0	34,0	32,0	33,0	31,0	31,0	24,0	19,0	12,0	14,0	15,0	18,0	24,0
	982	36,0	34,0	35,0	35,0	37,0	36,0	31,0	30,0	31,0	26,0	23,0	18,0	12,0	15,0	18,0	18,0	19,0	15,0
	Média	36,0	36,3	38,3	37,3	35,7	36,0	32,3	31,0	34,0	28,3	25,0	19,0	13,7	13,0	16,3	16,7	19,7	19,3

Grupo 1: MSP1a e MSP2 recombinantes + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 2: MSP2 recombinante + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 3: CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 4: Alúmen

Quadro 2. Temperaturas retais dos bovinos experimentais.

Grupos	Animal	08/10	05/11	06/12	29/12	05/01	12/01	19/01	26/01	04/02
1	974	38,9	38,7	38,8	38,6	38,7	38,9	41,0	39,9	38,5
	977	38,7	38,6	38,7	38,8	38,3	39,1	40,2	38,3	39,2
	6160	39,0	39,0	39,0	38,6	38,7	39,1	40,5	39,2	38,5
	968	38,6	38,6	38,6	38,4	38,2	38,5	40,4	39,0	38,0
	Média	38,8	38,7	38,8	38,6	38,5	38,9	40,5	39,1	38,6
2	978	38,4	38,7	38,8	38,3	38,4	38,2	40,9	39,2	38,4
	983	38,6	38,7	38,6	38,4	38,3	38,3	40,4	40,2	38,3
	966	39,0	38,7	38,5	38,3	38,4	39,2	39,6	39,2	38,7
	Média	38,7	38,7	38,6	38,3	38,4	38,6	40,3	39,5	38,5
3	1	38,7	38,9	38,6	38,4	38,5	38,6	39,6	40,0	38,0
	975	38,7	38,7	38,4	38,4	38,3	38,4	39,8	39,5	38,2
	967	38,8	38,6	38,6	38,4	38,4	38,5	40,7	40,0	38,1
	Média	38,7	38,7	38,5	38,4	38,4	38,5	40,0	39,8	38,1
4	2	39,0	38,7	38,9	38,6	38,4	38,7	40,5	39,0	38,7
	970	38,7	38,6	38,7	38,4	38,2	38,7	39,6	40,0	38,5
	982	38,7	38,6	38,7	38,7	38,3	39,2	40,0	38,7	39,2
	Média	38,8	38,6	38,8	38,6	38,3	38,9	40,0	39,2	38,8

Grupo 1: MSP1a e MSP2 recombinantes + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 2: MSP2 recombinante + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 3: CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 4: Alúmen

Quadro 3. Riquetsemias dos animais experimentais.

Grupos	Animal	08/10	05/11	06/12	29/12	03/01	05/01	07/01	10/01	12/01	14/01	17/01	19/01	21/01	24/1	26/01	28/01	31/01	04/02
1	974	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,10	0,10	8,50	6,25	7,00	3,40	0,10	1,00	0,01	0,01
	977	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,17	1,50	11,00	4,40	10,00	0,01	0,10	0,20	1,40	4,75
	6160	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,12	0,16	0,20	0,01	1,00	1,30	1,00	0,01	0,70	0,00
	968	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,10	0,00	1,00	2,40	9,00	2,00	0,01	2,50	0,00	0,80
	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,12	0,44	5,18	3,27	6,75	1,68	0,30	0,93	0,53	1,39
2	978	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,20	0,70	12,50	11,30	13,00	0,30	0,01	0,01	0,00	0,20
	983	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,06	0,60	1,80	2,00	8,80	0,01	0,30	0,20	0,00
	966	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,60	1,14	3,30	1,00	2,50	7,00	1,10	2,00	0,80	1,30
	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,29	0,63	5,47	4,70	5,83	5,37	0,37	0,77	0,33	0,50
3	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	2,10	2,90	5,00	5,00	0,01	0,50	0,01	0,01
	975	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	3,70	4,80	0,00	7,00	0,00	0,60	0,01	0,70	
	967	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	5,25	0,01	2,00	1,00	1,40	0,40	0,00	0,00	
	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,20	3,68	2,57	2,33	4,33	0,47	0,50	0,01	0,24
4	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,80	1,40	7,00	6,50	0,01	1,20	0,01	0,00	0,40	4,00
	970	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,08	5,00	2,10	0,01	11,20	3,40	1,50	0,00	1,00
	982	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,38	4,60	8,00	1,00	0,50	0,20	0,70	1,50	0,60
	Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,32	0,62	5,53	5,53	0,34	4,30	1,20	0,73	0,63	1,87

Grupo 1: MSP1a e MSP2 recombinantes + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 2: MSP2 recombinante + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 3: CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 4: Alúmen

Quadro 4. Resultados das PCRs dos animais experimentais.

Grupos	Animal	08/10	05/11	06/12	29/12	03/01	05/01	07/01	10/01	12/01	14/01	17/01	19/01	21/01	24/01	26/01	28/01	31/01	04/01
1	974	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
	977	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
	6160	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
	968	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
2	978	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
	983	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
	966	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
3	1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
	975	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
	967	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
4	2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
	970	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
	982	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos

Grupo 1: MSP1a e MSP2 recombinantes + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 2: MSP2 recombinante + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 3: CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 4: Alúmen

Quadro 5. Resultados dos ELISA para IgG total anti-MSP1a (índice DO soros teste/*cutoff*).

Grupos	Animal	08/10	05/11	06/12	29/12	03/01	05/01	07/01	10/01	12/01	14/01	17/01	19/01	21/01	24/01	26/01	28/01	31/01	04/02
1	974	81,84	91,80	170,02	183,20	185,33	190,50	194,36	229,98	222,67	241,44	196,64	208,72	252,81	248,93	178,93	250,38	159,38	154,00
	977	70,13	94,15	155,13	171,83	156,10	173,04	171,34	177,82	208,94	217,88	207,16	194,07	225,53	216,04	235,03	229,06	159,96	157,14
	6160	78,00	102,27	151,71	186,32	163,37	207,64	189,69	215,37	224,94	228,21	202,80	196,98	230,35	192,51	223,22	207,74	168,07	162,72
	968	60,02	98,24	139,54	148,17	106,40	134,92	132,61	127,82	190,30	208,19	167,79	158,95	185,16	196,79	183,25	178,30	124,41	114,76
	Média	74,35	92,05	124,65	119,45	109,06	117,51	120,10	134,97	169,10	195,38	166,15	168,38	222,46	202,09	225,08	202,96	130,00	128,36
3	1	69,38	85,84	78,17	82,70	70,14	85,02	90,89	104,08	170,91	186,27	163,20	176,51	198,66	132,09	150,63	117,39	129,42	96,56
	975	72,75	77,83	80,28	76,66	79,55	82,75	85,37	85,49	144,96	178,21	149,78	158,50	210,70	208,02	223,22	196,32	117,58	123,63
	967	69,48	72,66	79,98	78,37	77,02	75,21	87,41	224,22	114,36	157,81	132,10	130,43	125,40	108,56	139,21	125,51	117,43	102,12
	Média	70,54	78,78	79,48	79,24	75,57	80,99	87,89	137,93	143,41	174,10	148,36	155,15	178,25	149,56	171,02	146,41	121,48	107,44
4	2	52,34	66,02	83,80	74,75	71,18	76,14	84,89	108,63	165,74	177,58	148,21	149,11	174,33	156,95	188,20	159,52	124,32	117,50
	970	59,64	82,71	79,18	82,70	82,31	82,33	74,34	84,89	144,58	179,97	114,65	101,12	170,19	144,12	158,12	146,32	106,19	110,96
	982	70,13	63,77	63,38	66,90	64,67	72,31	70,86	129,02	178,34	110,71	133,78	132,33	143,58	118,85	142,26	126,02	105,96	104,32
	Média	60,70	70,83	75,45	74,78	72,72	76,93	76,70	107,51	162,89	156,09	132,21	127,52	162,70	139,97	162,86	143,95	112,16	110,93

Grupo 1: MSP1a e MSP2 recombinantes + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 3: CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 4: Alúmen

Quadro 6. Resultados dos ELISA para IgG total anti-MSP2 (índice DO soros teste/cutoff).

Grupos	Animal	08/10	05/11	06/12	29/12	03/01	05/01	07/01	10/01	12/01	14/01	17/01	19/01	21/01	24/01	26/01	28/01	31/01	04/02
G1	974	65,30	92,99	121,62	123,43	139,42	150,10	155,94	206,12	195,77	226,69	178,69	176,46	223,70	226,09	209,75	211,31	136,90	123,59
	977	91,48	94,65	117,05	125,83	151,04	145,02	152,80	162,41	190,22	201,09	192,62	178,81	219,96	199,27	200,52	196,47	170,02	130,36
	6160	89,43	103,92	110,10	146,14	142,60	163,90	152,62	182,20	204,47	201,69	187,12	187,94	215,59	200,73	188,80	187,14	131,00	126,34
	968	59,62	84,49	103,67	130,56	107,37	122,93	129,90	126,40	192,27	194,08	174,36	165,46	193,56	167,05	156,95	161,62	110,70	131,15
	Média	76,46	94,01	113,11	131,49	135,11	145,49	147,82	169,28	195,68	205,89	183,20	177,17	213,20	198,29	189,01	189,14	137,16	127,86
G2	978	68,77	105,17	112,36	110,52	132,16	108,16	137,59	151,75	188,29	209,42	168,62	184,31	217,15	218,50	228,22	205,08	150,00	129,17
	983	82,49	80,05	103,86	106,73	110,17	115,15	115,03	120,45	163,65	171,26	167,45	165,22	205,72	159,25	183,82	182,57	113,93	138,41
	966	70,50	97,50	109,20	112,36	120,44	133,51	142,48	124,48	156,76	193,12	173,65	164,29	203,22	190,44	186,31	179,88	131,83	121,35
	Média	73,92	94,24	108,47	109,87	120,92	118,94	131,70	132,23	169,57	191,27	169,91	171,27	208,70	189,40	199,45	189,18	131,92	129,64
G3	1	64,04	82,30	78,83	76,85	78,84	85,37	88,46	109,09	175,97	183,21	172,72	185,71	180,67	165,28	154,36	141,39	134,44	133,48
	975	74,13	78,76	77,41	78,14	85,27	83,51	85,14	81,99	156,16	175,36	164,64	164,40	201,14	187,63	192,43	181,43	127,03	144,50
	967	79,50	74,00	75,10	78,59	63,52	78,22	84,79	196,33	122,10	157,00	146,02	143,56	151,98	146,15	134,34	136,51	102,31	102,31
	Média	72,56	78,35	77,11	77,86	75,88	82,37	86,13	129,14	151,41	171,86	161,13	164,56	177,93	166,35	160,38	153,11	121,26	126,76
G4	2	71,14	71,56	76,96	77,12	88,28	80,29	84,97	105,07	167,03	183,45	162,41	153,16	174,84	181,91	169,29	157,37	104,52	116,22
	970	74,29	74,52	78,19	62,45	73,21	86,72	77,27	86,36	159,66	167,75	130,91	111,24	183,37	162,47	158,61	147,10	114,21	108,55
	982	64,51	55,73	63,32	64,12	66,39	73,86	68,88	118,18	182,49	113,41	142,39	138,99	153,95	142,10	155,08	128,42	105,62	117,71
	Média	69,98	67,27	72,82	67,90	75,96	80,29	77,04	103,20	169,73	154,87	145,24	134,46	170,72	162,16	160,99	144,30	108,12	114,16

Grupo 1: MSP1a e MSP2 recombinantes + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 2: MSP2 recombinante + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 3: CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 4: Alúmen

Quadro 7. Resultados dos ELISA para IgG₂ anti-MSP1a (índice DO soros teste/*cutoff*).

Grupos	Animal	08/10	05/11	06/12	29/12	05/01	12/01	19/01	26/01	04/02
G1	974	71,00	132,30	633,00	453,90	597,60	594,30	427,70	398,00	275,00
	977	73,90	137,00	550,00	286,30	479,50	495,50	430,70	318,80	229,80
	6160	63,50	240,20	656,80	584,60	817,30	829,50	569,30	416,80	321,20
	968	75,90	120,50	372,70	190,50	241,70	263,60	172,30	143,60	116,30
	Média	71,08	157,50	553,13	378,83	534,03	545,73	400,00	319,30	235,58
G3	1	68,00	84,30	120,50	73,90	95,30	164,80	175,20	97,00	127,90
	975	76,80	76,40	84,10	103,30	78,70	119,30	162,40	126,70	92,30
	967	66,80	68,50	76,10	82,20	70,10	94,30	109,90	134,70	108,70
	Média	70,53	76,40	93,57	86,47	81,37	126,13	149,17	119,47	109,63
G4	2	65,60	57,50	98,90	80,50	79,50	147,70	124,80	112,90	94,20
	970	78,00	84,30	78,40	68,90	71,70	121,60	143,60	105,90	86,50
	982	75,90	75,60	80,80	75,10	94,50	163,60	128,70	109,90	91,30
	Média	73,17	72,47	86,03	74,83	81,90	144,30	132,37	109,57	90,67

Grupo 1: MSP1a e MSP2 recombinantes + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 3: CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 4: Alúmen

Quadro 8. Resultados dos ELISA para IgG₂ anti-MSP2 (índice DO soros teste/*cutoff*).

Grupos	Animal	08/10	05/11	06/12	29/12	05/01	12/01	19/01	26/01	04/02
G1	974	71,10	95,30	100,00	123,30	131,80	259,30	181,80	123,40	147,80
	977	68,90	88,20	105,80	114,40	151,80	196,50	209,10	126,00	131,90
	6160	72,20	98,80	115,10	131,10	152,90	258,10	154,50	110,40	137,70
	968	83,30	98,80	96,50	106,70	128,20	253,50	153,20	102,60	113,00
	Média	73,88	95,28	104,35	118,88	141,18	241,85	174,65	115,60	132,60
G2	978	84,40	84,70	87,20	103,30	105,90	218,60	227,30	132,50	104,30
	983	81,20	109,40	129,10	153,30	162,40	122,10	163,60	105,20	113,00
	966	70,00	84,70	90,70	86,70	103,50	122,10	127,30	100,00	110,10
	Média	78,53	92,93	102,33	114,43	123,93	154,27	172,73	112,57	109,13
G3	1	80,00	81,20	115,10	92,20	94,10	189,50	154,50	85,70	104,30
	975	76,70	87,10	72,10	76,70	84,70	111,60	154,50	122,10	100,00
	967	66,70	75,30	73,30	67,80	83,50	89,50	93,50	90,90	88,40
	Média	74,47	81,20	86,83	78,90	87,43	130,20	134,17	99,57	97,57
G4	2	56,70	65,90	66,30	68,90	76,50	138,40	107,80	89,60	98,60
	970	75,60	85,90	80,20	84,40	97,60	119,80	133,80	92,20	89,90
	982	63,30	80,00	86,00	94,40	98,80	186,00	109,10	97,40	97,10
	Média	65,20	77,27	77,50	82,57	90,97	148,07	116,90	93,07	95,20

Grupo 1: MSP1a e MSP2 recombinantes + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 2: MSP2 recombinante + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 3: CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 4: Alúmen

9.2. Avaliação da imunidade celular dos bovinos experimentais

Quadro 9. Resultados dos ensaios de proliferação celular dos animais experimentais (expressos como a média das densidades ópticas das triplicata e índices de estimulação - IE).

8/10/2004									
Grupo	Animal	con-A	Cont. neg	IE	MSP1a	MSP2	Cont. neg	IE-MSP1A	IE-MSP2
1	968	2,313	0,132	17,567	0,360	0,310	0,402	0,896	0,771
	974	2,112	0,134	15,722	0,305	0,293	0,339	0,901	0,863
	977	1,547	0,151	10,220	0,274	0,189	0,328	0,835	0,576
	6160	1,683	0,157	10,743	0,369	0,224	0,370	0,997	0,606
	Média	1,914	0,144	13,563	0,327	0,254	0,360	0,907	0,704
2	966	2,309	0,133	17,315	-	0,283	0,479	-	0,591
	978	1,934	0,141	13,749	-	0,281	0,445	-	0,633
	983	1,313	0,111	11,832	-	0,230	0,435	-	0,528
	Média	1,852	0,128	14,299	-	0,265	0,453	-	0,584
3	1	2,189	0,162	13,510	0,348	0,337	0,334	1,042	1,011
	967	1,809	0,176	10,298	0,424	0,407	0,670	0,634	0,607
	975	1,707	0,165	10,343	0,282	0,327	0,382	0,737	0,857
	Média	1,901	0,168	11,384	0,351	0,357	0,462	0,804	0,825
4	2	2,377	0,140	16,936	0,392	0,327	0,348	1,128	0,941
	970	1,348	0,107	12,641	0,366	0,335	0,352	1,041	0,951
	982	2,287	0,137	16,691	0,393	0,263	0,437	0,899	0,602
	Média	2,004	0,128	15,422	0,384	0,308	0,379	1,022	0,831
29/12/2004									
Grupo	Animal	con-A	Cont. neg	IE	MSP1a	MSP2	Cont. neg	IE-MSP1A	IE-MSP2
1	968	1,907	0,162	11,794	0,213	0,225	0,311	0,687	0,723
	974	1,553	0,154	10,065	0,216	0,222	0,336	0,642	0,661
	977	1,883	0,150	12,528	0,336	0,318	0,334	1,006	0,950
	6160	3,335	0,160	20,846	0,402	0,398	0,398	1,011	0,999
	Média	2,170	0,157	13,808	0,292	0,291	0,345	0,836	0,833
2	966	1,948	0,157	12,436	-	0,257	0,362	-	0,710
	978	1,973	0,142	13,897	-	0,357	0,353	-	1,011
	983	1,945	0,124	15,685	-	0,365	0,416	-	0,878
	Média	1,956	0,141	14,006	-	0,326	0,377	-	0,866
3	1	1,825	0,154	11,825	0,243	0,330	0,324	0,750	1,021
	967	1,744	0,157	11,087	0,254	0,254	0,336	0,755	0,755
	975	1,890	0,146	12,945	0,193	0,175	0,321	0,600	0,546
	Média	1,820	0,153	11,952	0,230	0,253	0,327	0,701	0,774
4	2	1,924	0,169	11,387	0,255	0,301	0,333	0,766	0,902
	970	1,812	0,172	10,533	0,211	0,237	0,329	0,640	0,721
	982	2,453	0,122	20,164	0,383	0,407	0,355	1,080	1,146
	Média	2,063	0,154	14,028	0,283	0,315	0,339	0,828	0,923

26/1/2005									
Grupo	Animal	con-A	Cont. neg	IE	MSP1a	MSP2	Cont. neg	IE-MSP1A	IE-MSP2
1	968	2,277	0,178	12,814	0,530	0,430	0,592	0,895	0,726
	974	2,487	0,183	13,564	0,384	0,341	0,455	0,843	0,749
	977	1,977	0,157	12,564	0,296	0,183	0,197	1,500	0,927
	6160	1,931	0,189	10,197	0,288	0,142	0,184	1,568	0,775
	Média	2,168	0,177	12,285	0,374	0,274	0,357	1,201	0,794
2	966	2,395	0,207	11,572	-	0,352	0,451	-	0,781
	978	2,295	0,137	16,752	-	0,142	0,174	-	0,818
	983	2,109	0,200	10,543	-	0,134	0,186	-	0,722
	Média	2,266	0,181	12,956	-	0,210	0,270	-	0,774
3	1	2,416	0,169	14,267	0,402	0,444	0,405	0,993	1,098
	967	2,663	0,253	10,527	0,415	0,507	0,485	0,856	1,046
	975	2,240	0,123	18,261	0,391	0,421	0,544	0,718	0,773
	Média	2,440	0,182	14,352	0,403	0,458	0,478	0,856	0,972
4	2	2,620	0,173	15,115	0,463	0,364	0,379	1,221	0,960
	970	2,237	0,175	12,805	0,456	0,379	0,449	1,014	0,843
	982	2,018	0,173	11,689	0,293	0,134	0,160	1,825	0,838
	Média	2,292	0,174	13,203	0,404	0,292	0,330	1,354	0,880

Grupo 1: MSP1a e MSP2 recombinantes + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 2: MSP2 recombinante + CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 3: CpG ODN 2006 + alúmen

Grupo 4: Alúmen

9.3. Trabalho aprovado para publicação

Development of ELISAs based on recombinant MSP1a and MSP2 of

Anaplasma marginale

Flávio R Araújo^{†****}, Valeska SP Melo^{*}, Carlos AN Ramos^{††}, Claudio R Madruga,
 Cleber O Soares, Raul H Kessler, Nalvo F Almeida^{**}, Graziela S Araújo^{**}, Leucio C
 Alves^{*}, Roberto AA Torres Júnior, Stênio P Fragoso^{***}, Paulo RC Arauco^{***}, Gisele
 Bacanelli^{††}, Maristelli B Oliveira^{††}, Lenita R Santos^{****}

Embrapa Gado de Corte, Caixa Postal 154, 79002-970 Campo Grande, MS, Brasil ^{*} Departamento
 de Medicina Veterinária, UFRPe, Recife, PE, Brasil ^{**} Departamento de Computação e Estatística,
 UFMS, Campo Grande, MS, Brasil ^{***} Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Curitiba, PR, Brasil
^{****} Pós-Graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, UFBA, Salvador, BA, Brasil

Indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) based on recombinant MSP1a and MSP2 from a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale* were developed for detecting antibodies against this rickettsia in cattle. The high sensitivities (99% for both tests) and specificities (100% for both tests) were confirmed with sera from cattle positive or negative for *A. marginale* antibodies, respectively, by immunofluorescent antibody test. By the analysis of 583 sera from cattle of three regions of the state of Pernambuco, Brazil, the agreement between

[†] Corresponding author. E-mail: flabio@cnpqg.embrapa.br

^{††} Research fellow CNPq

Financial support: FUNDECT, CNPq

Received ...

both tests was high, with a kappa index of 0.89. The similar performances of the ELISAs suggest that both tests can be used in epidemiological surveys for detection of antibodies to *A. marginale* in cattle.

Key words: *Anaplasma marginale* - ELISA - major surface proteins - Brazil

Anaplasmosis, a tick-borne cattle disease caused by the rickettsia *Anaplasma marginale*, which is endemic in tropical and subtropical areas of the world. The disease causes considerable economic loss to both dairy and beef industries worldwide (Kocan et al. 2003), and is characterized by fever, anemia, general weakness, pale mucous membranes, weight loss (Ajayi et al. 1978), abortion (Correa et al. 1978), decreased milk production, and mortality during the acute phase of infection (Palmer et al. 1986).

A variety of serological tests, such as indirect fluorescent antibody test (IFAT) (Lohr et al. 1973), complement fixation (Gainer 1961), agglutination test (Welter & Zuschek 1962), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Luckins 1977) have been used to detect antibodies to *A. marginale*. Although sensitivities of these assays were considered acceptable, there is potential for false-positive reactions when crude antigens are used, due to the contamination with erythrocyte components (Barry et al. 1986).

Advances in biochemical, immunologic, and molecular technologies during the last decade have been applied to research of *A. marginale* (Kocan et al. 2003). As a result of these studies, the major surface proteins (MSPs) with potential for diagnostics were identified (Palmer et al. 1986, Oberle et al. 1988, Visser et al. 1992).

The objectives of the present study were to develop, evaluate and compare ELISAs based on recombinant MSP1a and MSP2, two immunodominant membrane proteins of *A. marginale*.

MATERIALS AND METHODS

Anaplasma marginale isolate - Infected blood was obtained by the inoculation of a splenectomized Nelore calf with a Brazilian isolate of *A. marginale* (Pernambuco, Zona da Mata). Blood was collected in vacuum tubes with heparin when rickettsemia reached 87%.

DNA purification and PCR - DNA was purified from 350 µl of infected blood by Easy DNA kit (Invitrogen, US). Based on the reported *msp1a* and *msp2* nucleotide sequences (Genbank accession numbers: AY010247 and AF317726, respectively), primers were designed to amplify a fragment of *msp1a* that encodes the hydrophilic domain of MSP1a, and a fragment of *msp2* that encodes part of the N terminal region, the hypervariable region and the C terminal region of MSP2. These primers were *msp1aF* (5' GGGTACGCCACCTATCTCGC 3') and *msp1aR* (5' AACAAAGCTGTGTAGTAGTGTCCGAAGG 3'); *msp2F* (5' GCAGGCGGCGAGGGTCTATTTTCA 3') and *msp2R* (5' AGAATCCCCCTAAGCGTTGCCGAACCTCAA 3'). PCR amplification reaction mixtures were prepared in volumes of 50 µl, containing 10 mM tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM (each) deoxynucleoside triphosphate, 100 ηg (each) primer, 100 ηg of genomic DNA, and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Cenbiot, Brazil). Amplification was performed in a PTC-200 thermocycler (MJ Research, US) as follows: 94°C for 1 min (denaturation); the next 35 cycles were 94°C for 1 min (denaturation), 61°C (*msp1a*) or 60°C (*msp2*) for 1 min (annealing),

and 72°C for 1 min (*msp1a*) or 1.5 min (*msp2*) (extension), and the last cycle was 72°C for 7 min (extension). PCR products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gel, stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml).

Cloning and expression of msp1a and msp2 - PCR amplicons were cloned in plasmid *pTrcHisTOPO* (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. The recombinant plasmids were used to transform *Escherichia coli* TOP10 cells (Invitrogen). Insert orientation was determined by colony PCR, using the vector forward primer Xpress (Invitrogen) and insert reverse primers. The inserts were also sequenced in both directions by the dideoxide method and analyzed in an ABI 3100 automatic sequencer (Applied Biosystems, US). Only sequences with a PHRED index greater than 20 were considered.

Overnight 50 ml cultures of TOP10 cells carrying the recombinant plasmids (*pTrcHisTOPO-msp1a* and *pTrcHisTOPO-msp2*) grown in liquid selective Luria-Bertani (LB) medium containing 100 µg/ml of ampicillin (LB-amp) were cultured each one in 450 ml of LB-amp for 1 h at 37°C. Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added at a final concentration of 1 mM. The cultures were allowed to grow for 6 h. Aliquots of 2 ml were taken before induction with IPTG and then every 2 h. These aliquots were centrifuged at 18,000 x g and pellets were frozen at -20°C. After a 6-h culture, TOP10 cells were recovered by centrifugation at 10,000 x g for 10 min. Pellets were suspended in 20 ml of 50 mM phosphate buffer and then frozen in liquid nitrogen. After thawing at 4°C, suspensions were sonicated (Branson 250, US - output 40) six times for 20 sec on ice. The production of recombinant proteins was verified by SDS-PAGE, followed by Coomassie blue staining.

Purification of recombinant proteins - Purifications of recombinant MSP1a and MSP2 (rMSP1a and rMSP2) were performed by affinity chromatography, using agarose-nickel resin (ProBond Purification kit, Invitrogen), following the manufacture's instructions. A hybrid protocol, with lysis under denaturing conditions and washes and elution steps under native conditions, was used. Purity was verified by SDS-PAGE, followed by Coomassie blue staining.

Western blot - The antigenicity of rMSP1a and rMSP2 was tested by Western blot with sera of immune cattle from different regions of Brazil (states of Pernambuco, Paraná, and Mato Grosso do Sul). A Western blot with recombinant MSP2 and monoclonal antibody (MoAb) ANAO70A2, specific for this protein (McGuire et al. 1984), was also performed.

ELISAs - Optimal dilutions of rMSP1a and rMSP2, sera and conjugate were determined by testing six sera negative for *A. marginale* antibodies, from cattle kept in an isolation area of Embrapa Beef Cattle, Campo Grande, MS, Brazil, and six sera positive for *A. marginale* antibodies, from experimentally-infected cattle.

For determination of the concentrations of rMSP1a and rMSP2, these proteins and known concentrations of human serum albumin were submitted to SDS-PAGE, stained with Coomassie blue, and then analyzed by Alpha-DigiDoc software (Alpha Innotec, US).

For the recombinant ELISAs, 96-well plates (Greiner Bio One, Microton, Austria, ref. 655001) were adsorbed with 10 η g/well of rMSP1a or 5.7 η g/well of rMSP2, diluted in Dulbecco's phosphate buffer, pH 7.2, for 4 h, at 4°C. Plates were blocked with 5% γ -globulin free equine serum diluted in phosphate buffer saline with 0.1% Tween (PBST), for 60 min, at 37°C. After three washes with PBST, control

and test sera, diluted 1:600 in PBST, were incubated for 60 min at 37°C. Plates were then washed five times with PBST, and rabbit anti-bovine IgG horseradish peroxidase conjugate (Sigma, US, ref. A-7414), diluted 1:10,000 in PBST, was added to the wells. Plates were incubated for 30 min at 37°C and after five washes with PBST, the chromogen/substrate *o*-phenylene diamine dihydrochloride (OPD; Sigma)/ H₂O₂ was added. The reaction was stopped by addition of H₂SO₄ (2.5 N) and results were read on a Bio-Tek EL-800 ELISA reader (US), with a 490 nm filter.

Cut-offs were determined for each plate with 12 negative control sera, according to Frey et al. (1998). A 99% confidence interval was used.

One hundred and seven sera positive for *A. marginale* antibodies by indirect-fluorescent antibody test (IFAT), from naturally-infected cattle of the states of Mato Grosso do Sul (nr 25) and Goiás (nr 61), Brazil, and sera from experimentally-infected calves (nr 21), were used for determination of sensitivity. Eighty nine sera negative for *A. marginale* antibodies by IFAT, from cattle of the state of Rio Grande do Sul (nr 27), Brazil, and from cattle raised in a tick-free isolation area of Embrapa Beef Cattle (nr 62), were used for determination of specificity. Positive and negative predictive values were also determined with these sera.

Five hundred and eighteen sera from dairy cross-bred cattle, from both sexes, and varying ages, from three regions of the state of Pernambuco, Brazil (Recife, Zona da Mata and Agreste), were analyzed by both ELISAs for analysis of agreement between tests.

In the quantitative evaluation of the agreement between the ELISAs with rMSP1a and rMSP2, the *kappa* index was calculated (Kramer & Feinstein 1981). To the samples with disagreements, the Fischer's exact test was applied.

RESULTS

PCRs for msp2 and msp1a - Amplifications of *msp1a* and *msp2* by PCR resulted in fragments of 626 bp and 1,211 bp, respectively (Fig. 1).

DNA sequencing - The cloned fragments were identified (base-calling) using the program PHRED and the consensus sequence was obtained using the program PHRAP. The resulting sequences showed significant alignments, using the program Blastx (*nr* data base), with sequences of MSP2 (accession nr AAL26275, e-value 10^{-178}) and MSP1a (accession nr AAP49429, e-value 5×10^{-78}) of *A. marginale*, available at the Genbank.

Expression of msp1a and msp2 - The induction of *msp1a* and *msp2* with IPTG resulted in protein bands of approximately 33 kDa and 42.2 kDa, respectively, which were purified by affinity chromatography with agarose/nickel. rMSP1a was partially soluble, while rMSP2 was completely insoluble (Figs. 2, 3).

Antigenic analysis by Western blot - rMSP1a and rMSP2 were blotted onto nitrocellulose membranes after SDS-PAGE and reacted with sera of *A. marginale* seropositive cattle from different regions of Brazil (Figs. 4, 5). Recombinant MSP2 also reacted with monoclonal antibody ANAO70A2 (Fig. 6).

Performances of the ELISAs – Results concerning the sensitivity, specificity, negative and positive predictive values and precision of the rMSP1a and rMSP2 ELISAs are shown in Table I. The tests showed identical performances.

Agreement between tests - From the 583 sera analyzed, 571 showed identical results in both tests (MSP1a+/MSP2+ or MSP1a-/MSP2-), corresponding to an agreement of 97.9% (Table II), with a *kappa* index of 0.89. With regards to the

discrepant results, there was a statistically superior number of MSP1a-/MSP2+ sera than MSP2-/MSP1a+ sera (P 0.039).

DISCUSSION

Despite the existence of a central hypervariable region in MSP2, which comprises variable epitopes, including in Brazilian isolates of *A. marginale* (Oliveira et al. 2003), this protein exhibits conserved N and C termini (French et al. 1999).

MSP1a is composed of an N-terminal region consisting of 28 or 29 amino acid serine-rich repeats that vary in number and sequence among strains and a highly conserved C-terminal region (Allred et al. 1990). Transmembrane protein prediction analysis of MSP1a from the Virginia strain revealed a large hydrophilic domain (HD), extending from amino acids 1 to 366, and a hydrophobic region extending from amino acid 367 to 593 (Brown et al. 2002).

The *msp1a* and *msp2* fragments cloned in this experiment encode for conserved domains, including part of the N-terminal, all the C-terminal regions of MSP2 and the HD of the C-terminal region of MSP1a. This reflects the recognition of rMSP1a and rMSP2 by sera of cattle from different regions of Brazil in the Western blot and in the ELISAs.

The sensitivities of rMSP1a and rMSP2 ELISAs were high (99% for both tests), situating between an indirect ELISA with crude antigen (100%) (Madruga et al. 2000) and a competitive ELISA with recombinant MSP5 and monoclonal antibody (MoAb) ANAF16C1 (96%) (Torioni de Echaide et al. 1998). The slightly

inferior sensitivities of rMSP1a and rMSP2 ELISAs compared to the crude antigen ELISA is probably due to the higher diversity of epitopes in the latter method.

The specificities of rMSP1a and rMSP2 ELISAs (100% for both tests) were higher than in the indirect ELISA with crude antigen (94%) (Madruga et al. 2000) and in the competitive ELISA (95%) (Torioni de Echaide et al. 1998). In the first case, the higher specificity of rMSP1a and rMSP2 ELISAs may be due to the absence of contamination of the antigen with erythrocyte proteins, which are associated with false-positive reactions in the ELISA, due to the reaction of anti-erythrocyte antibodies in the sera (Barry et al. 1986).

In the second case, the lower specificity of the competitive ELISA compared to rMSP1a and rMSP2 ELISAs may be due to the Maltose Binding Protein (MBP) fused to the MSP5, which could induce false-positive reactions due to the reaction of anti-MBP antibodies in the sera, blocking the reaction of ANAF16C1 MoAb, even after the adsorption step of test sera with MBP (Torioni de Echaide et al. 1998). This protein is absent in rMSP1a and rMSP2 ELISAs, which showed higher sensitivities and specificities. Another advantage of the rMSP1a and rMSP2 ELISAs is that there is no need of monoclonal antibodies nor of adsorption steps of test sera.

The agreement between the two tests was high, defined by a *kappa* index of 0.89. The *kappa* index was used in the present investigation to determine the concordance of the assays with each other and to assess the reliability of the observed agreement, as this test corrects the agreement expected by chance.

With regards to the discrepant results, the statistically superior number of MSP1a-/MSP2+ sera over the MSP2-/MSP1a+ sera may be attributed to a slightly

lower sensitivity or a slightly superior specificity of rMSP1a ELISA. However, this is a low magnitude difference, which doesn't represent a clear advantage of an assay over the other, as the agreement between the ELISAs was high.

The high sensitivities and specificities of rMSP1a and rMSP2 ELISAs, associated with the recognition of both antigens by sera from cattle of different regions of Brazil, suggest that these serological tests can be used for epidemiological studies. The similar performances of both tests, with a high agreement in the results, suggest that both tests can be used indistinctly for the detection of *A. marginale* antibodies.

REFERENCES

- Ajayi SA, Wilson AJ, Campbell RS 1978. Experimental bovine anaplasmosis: clinico-pathological and nutritional studies. *Res Vet Sci* 25: 76-81.
- Allred DR, McGuire TC, Palmer GH, Leib SR, Harkins TM, McElwain TF, Barbet AF 1990. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3220-3224.
- Barry DN, Parker RJ, De Vos AJ, Dunster P, Rodwell BJ 1986. A microplate enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibody to *Anaplasma marginale* in cattle serum. *Aust Vet J* 63: 76-79.
- Brown WC, Palmer GH, Lewin HA, McGuire TC 2002. CD4⁺ T lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* major surface protein 1 (MSP1), a heteromeric complex of MSP1a and MSP1b, preferentially recognize the

MSP1a carboxyl terminus that is conserved among strains. *Infect Immun* 69: 6853-6862.

Coggon T, Rose G, Barker DJ 1993. Measurement, error and bias. In T Coggon T, G Rose, DJ Barker (eds), *Epidemiology for the Uninitiated*, BJM Publishing Group, London, p. 20-25.

Correa WM, Correa CN, Gottschalk AF 1978. Bovine abortion associated with *Anaplasma marginale*. *Can J Comp Med* 42: 227-228.

French DM, Brown WC, Palmer GH 1999. Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. *Infect Immun* 67: 5834-5840.

Frey A, Di Canzio J, Zurakowski D 1998. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *J Immunol Methods* 221: 35-41.

Gainer JH 1961. Demonstration of *Anaplasma marginale* with the fluorescent dye, acridine orange; comparisons with the complement-fixation test and Wright's stain. *Am J Vet Res* 22: 882-886.

Kocan KM, de la Fuente J, Guglielmone AA, Melendez RD 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin Microbiol Rev* 16: 698-712.

Kramer MS, Feinstein AR 1981. Clinical biostatistics. LIV. The biostatistics of concordance. *Clin Pharmacol Ther* 29: 111-123.

Lohr KF, Ross JP, Meyer H 1973. Studies on homologous and heterologous antibody responses to infections with *Anaplasma marginale* and *A. centrale*

using the indirect fluorescent antibody and capillary tube agglutination tests. *Z Tropenmed Parasitol* 24: 86-95.

Luckins AG 1977. Detection of antibodies in trypanosome-infected cattle by means of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay. *Trop Anim Health Prod* 9: 53-62.

Madruga CR, Marques APC, Leal CRB, Carvalho CME, Araújo FR, Kessler RH 2000. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against *Anaplasma marginale*. *Pesq Vet Bras* 20: 109-112.

McGuire TC, Palmer GH, Goff WL, Johnson MI, Davis WC 1984. Common and isolate-restricted antigens of *Anaplasma marginale* detected with monoclonal antibodies. *Infect Immun* 45: 697-700.

Oberle SM, Palmer GH, Barbet AF, McGuire TC 1988. Molecular size variations in an immunoprotective protein complex among isolates of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 56: 1567-1573.

Oliveira JB, Madruga CR, Schenk MA, Kessler RH, Migueta M, Araújo FR 2003. Antigenic characterization of Brazilian isolates of *Anaplasma marginale*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 395-400.

Palmer GH, Barbet AF, Kuttler KL, McGuire TC 1986. Detection of an *Anaplasma marginale* common surface protein present in all stages of infection. *J Clin Microbiol* 23: 1078-1083.

Torioni de Echaide S, Knowles DP, McGuire TC, Palmer GH, Suarez CE, McElwain TF 1998. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked

immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *J Clin Microbiol* 36: 777-782.

Visser ES, McGuire TC, Palmer GH, Davis WC, Shkap V, Pipano E, Knowles DP Jr 1992. The *Anaplasma marginale msp5* gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infect Immun* 60: 5139-5144.

Welter CJ, Zuschek F 1962. Properties of *Anaplasma marginale* antigen used in a capillary tube-agglutination test. *J Am Vet Med Assoc.* 141: 595-599.

TABLE I

Performances of recombinant MSP1a and MSP2 ELISAs for *Anaplasma marginale* antibodies

ELISA	Infection status of the calves ^a		
	Positive	Negative	Total
rMSP1a			
Positive	106 (a)	0 (b)	106 (a+b)
Negative	1 (c)	89 (d)	90 (c+d)
Total	107 (a+c)	89 (b+d)	196 (a+b+c+d)
rMSP2			
Positive	106 (a)	0 (b)	106 (a+b)
Negative	1 (c)	89 (d)	90 (c+d)
Total	107 (a+c)	89 (b+d)	196 (a+b+c+d)

^a determined by indirect immunofluorescent antibody test (IFAT); according to Coggon et al. (1993):

Sensitivity: $a / (a+c) \times 100 = 99\%$ for both rMSP1a and rMSP2 ELISAs

Specificity: $d / (b+d) \times 100 = 100\%$ for both rMSP1a and rMSP2 ELISAs

Positive predictive value: $a / (a+b) \times 100 = 100\%$ for both rMSP1a and rMSP2 ELISAs

Negative predictive value: $d / (c+d) \times 100 = 98.9\%$ for both rMSP1a and rMSP2 ELISAs

Precision: $(a+d) / (a+b+c+d) \times 100 = 99.5\%$ for both rMSP1a and rMSP2 ELISAs

TABLE II

Agreement between ELISAs with recombinant MSP1a and MSP2 from a Brazilian isolate (Pernambuco-Zona da Mata) of *Anaplasma marginale*, using sera from three regions of the state of Pernambuco, Brazil

ELISA	MSP1a+	MSP1a -	Total
MSP2+	516	10	526
MSP2-	2	55	57
Total	518	65	583

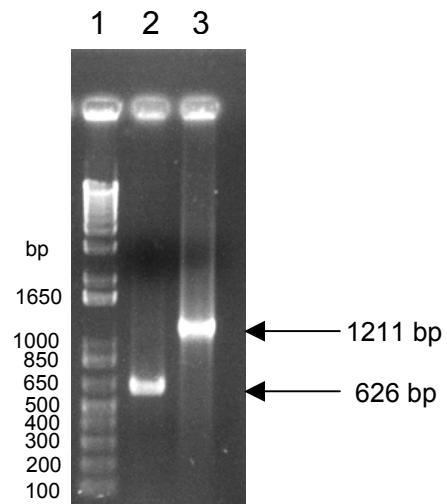


Fig. 1: amplification by PCR of *msp1a* and *msp2* from a Brazilian isolate (Pernambuco-Zona da Mata) of *Anaplasma marginale*. Lanes - 1: 1 kb plus (Invitrogen); 2: *msp1a* fragment; 3: *msp2* fragment.

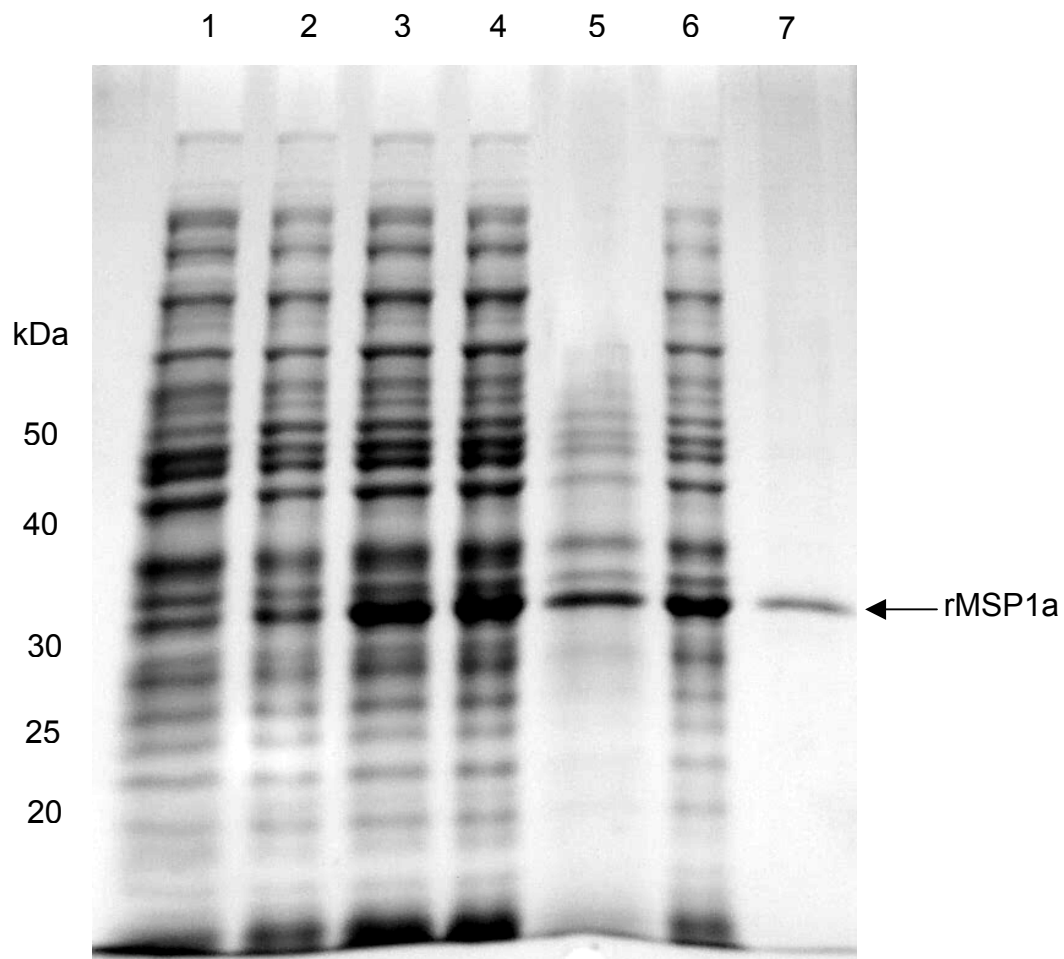


Fig. 2: coomassie blue stained SDS-PAGE profile of *Escherichia coli* TOP 10 extracts expressing *msp1a* from a Brazilian isolate (Pernambuco-Zona da Mata) of *Anaplasma marginale*. Lanes - 1: extract of *E. coli* TOP10 transformed with pTrcHis-TOPO/*msp1a* without induction with IPTG; 2: 2 h induction with IPTG; 3: 4 h induction with IPTG; 4: 6 h induction with IPTG; 5: soluble fraction; 6: insoluble fraction; 7: purified recombinant MSP1a.

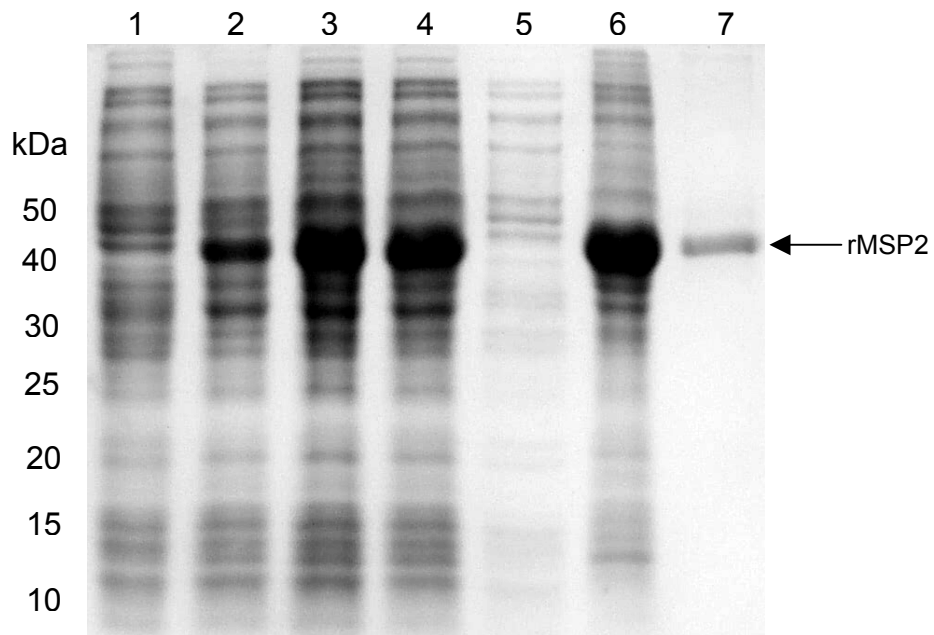


Fig. 3: coomassie blue stained SDS-PAGE profile of *Escherichia coli* TOP 10 extracts expressing *msp2* from a Brazilian isolate (Pernambuco-Zona da Mata) of *Anaplasma marginale*. Lanes - 1: extract of *E. coli* TOP10 transformed with pTrcHis-TOPO/*msp2* without induction with IPTG; 2: 2 h induction with IPTG; 3: 4 h induction with IPTG; 4: 6 h induction with IPTG; 5: soluble fraction; 6: insoluble fraction; 7: purified recombinant MSP2.

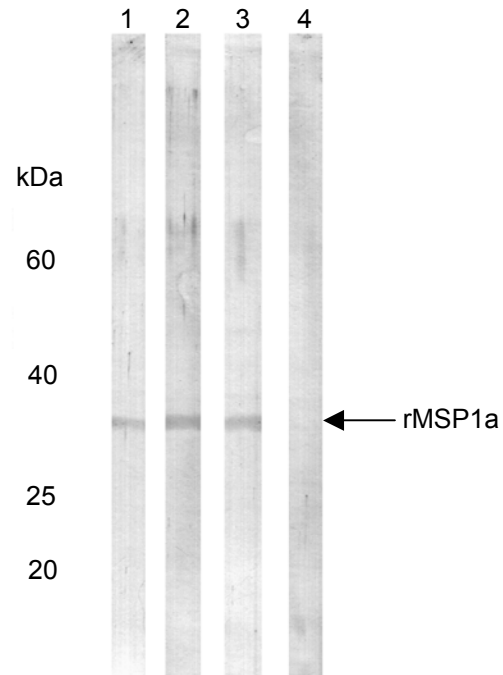


Fig. 4: Western blot with recombinant MSP1a from a Brazilian isolate (Pernambuco-Zona da Mata) of *Anaplasma marginale* and seropositive cattle sera from different regions of Brazil. Lanes - 1: serum of cattle from state of Pernambuco; 2: serum of cattle from state of Mato Grosso do Sul; 3: serum of cattle from state of Paraná; 4: negative control (serum of cattle from state of Mato Grosso do Sul, negative for *A. marginale* antibodies by immunofluorescent antibody test).

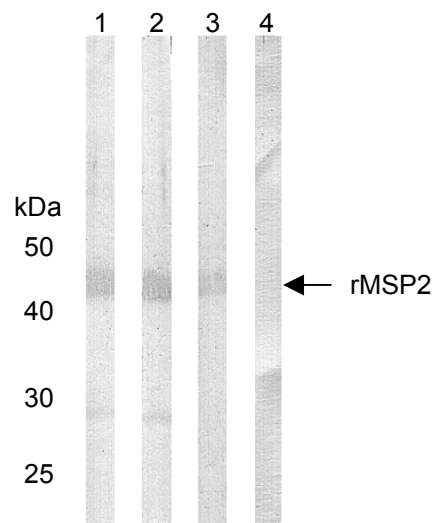


Fig. 5: Western blot with recombinant MSP2 from a Brazilian isolate (Pernambuco-Zona da Mata) of *Anaplasma marginale* and seropositive cattle sera from different regions of Brazil. Lanes - 1: molecular mass marker (BenchMark, Invitrogen); 2: serum of cattle from state of Paraná; 2: serum of cattle from state of Pernambuco; 3: serum of cattle from state of Mato Grosso do Sul; 4: negative control (serum of cattle from state of Mato Grosso do Sul, negative for *A. marginale* antibodies by immunofluorescent antibody test).

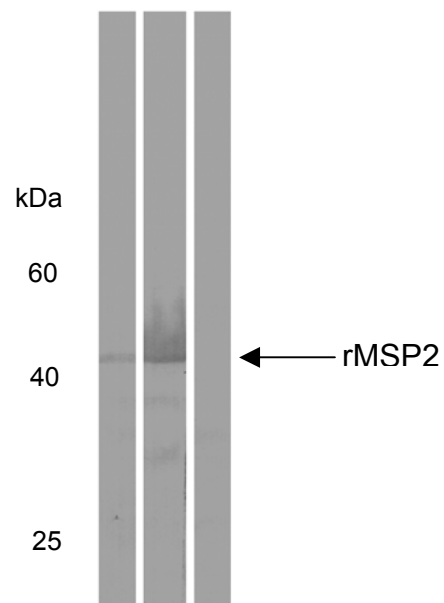


Fig. 6: Western blot with recombinant MSP2 from a Brazilian isolate (Pernambuco-Zona da Mata) of *Anaplasma marginale* and monoclonal antibody (MoAb) ANA70A2. Lanes - 1: purified recombinant MSP2; 2: *E. coli* lysate of a 6 h induction with IPTG; 3: *E. coli* lysate without induction with IPTG.