

CAMILA DE VALGAS E BASTOS CASTRO

**Isolado de *Anaplasma marginale* de baixa patogenicidade:
cultivo *in vitro* e avaliação de proteção ao desafio com isolado de
alta patogenicidade**

**Belo Horizonte
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Isolado de *Anaplasma marginale* de baixa patogenicidade:
cultivo *in vitro* e avaliação de proteção ao desafio com isolado de
alta patogenicidade**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-graduação da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia

Aluna: Camila de Valgas e Bastos Castro

Orientador: Prof. Múcio F. Barbosa Ribeiro

**Belo Horizonte
2009**

Co-orientação

- Dra Lygia M. Friche Passos^I

Colaboradores

- Dr. Elias Jorge Facury Filho^{II}
- Dra Elida M. Leite Rabelo^{III}
- Dr. José de la Fuente^{IV}

I – Laboratório de Protozooses do Departamento de Medicina Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); Institute for Comparative Tropical Medicine and Parasitology, LMU, Munich, Germany.

II – Clínica de Ruminantes do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, UFMG.

III – Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), UFMG.

IV - Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC (CSIC-UCLM-JCCM), Spain; Department of Veterinary Pathobiology, Center for Veterinary Health Sciences, Oklahoma State University, USA.

Suporte Financeiro

- FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais – Projeto aprovado e financiado pela FAPEMIG/Nº EDT 2198/03
- CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Bolsa de Doutorado

Apoio

- UFMG - Laboratório de Leishmanioses e Vacinas (Dr. Evaldo Nascimento)
- Fazenda São João – True Type – Grupo ReHAgro (Médico Veterinário/Gerente Paulo Henrique Martins Garcia)

Agradecimentos

A Deus, por me acompanhar e guiar em meus caminhos.

Ao Homero, por sempre me apoiar, incentivar e por todo o amor dedicado.

Aos meus pais, Walter e Ione, às minhas irmãs e aos seus maridos, Cassiana e Fred e Clarissa e Gu, aos meus sobrinhos Pedro e Letícia, aos meus cunhados Ulisses, Augusto e Lu, à Lourdes, à tia Herzila e à Vovó Senhorinha: obrigada pelo apoio.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do ICB/UFMG, a todos seus professores e funcionários pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro, meu orientador, pela amizade, dedicação em minha pesquisa e por ser sempre exemplo de pesquisador ético e comprometido com seu trabalho.

À Prof. Dra. Lygia Maria Friche Passos, pela co-orientação, amizade e por abrir meus horizontes.

Aos queridos amigos do Laboratório de Protozoologia Veterinária: Júlia, Mercês, Simone, Lívio, Diana, Manoel, Daniella, Carlos, Rízia e Bruna. Vocês foram importantes desde uma ajuda na bancada até um sorriso em momentos em que precisei! Extensivo à Nayara e à Lílian!

A todos os amigos do Laboratório de Parasitologia Molecular, em especial à Professora Élide, que abriu as portas do laboratório, e a Ana Flávia, Carina, Sílvia e Rodrigo pelo suporte na minha inexperiência.

Ao Professor Evaldo Nascimento, por ter cedido gentilmente seu laboratório para o desenvolvimento de parte deste trabalho.

À querida Sumara, secretária do curso de Pós-graduação em Parasitologia do ICB/UFMG, obrigada por estar sempre atenta e amiga quando precisamos.

Aos professores Ricardo Fujiwara e Ângela Lana e ao Danilo Bastos pela ajuda no tratamento estatístico dos dados.

Aos integrantes da “Família Mexicana”, turma de mestrado em Parasitologia de 2005, que me acolheram tão bem e se tornaram amigos especiais.

Aos professores Elias J. Facury Filho e Antônio Último de Carvalho (queridos professores Lobão e Último) pela amizade, apoio, sorrisos, abraços e companheirismo! Vocês são admiráveis!

Aos amigos do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias que contribuíram imensamente para a realização do projeto: Prof. Paulo Marcos Ferreira, Prof. Valentim Gheller, Rafa, Moisés, Leozão, Marcelo (Mutum), Helinho e Marina.

Aos estagiários que ajudaram em várias fases do experimento com tanta disposição, amor e dedicação: Carol (Bahia), Bernardo, Háina, Júlia Carvalho, Júlia Dias, Juliana Leão, Juliana Saez, Manu, Mateus, Natália, Taciana, Thábata, Thaís, Tiago, Tiago Facury, Tiago (Pexe), Rúbia, Samanta, Soraia e Vítor. Vocês não imaginam quanto me ensinaram!

Ao Veterinário Paulo Henrique Garcia por abrir as portas da Fazenda São João e aos funcionários da Fazenda que não mediram esforços para ajudar.

A Dra. Lesley Bell-Sakyi e Dr. José de la Fuente pelas orientações durante os trabalhos na Escócia e Espanha.

Às minhas queridas e fiéis amigas: Fabrízia, Paulinha, Olívia, Karina, Lílian, Bel, Sílvia, Amália, Renatinha, Gabi, Débora e Míriam.

À Leona, presente especial que sempre me fará lembrar da fase experimental do projeto, pela alegria e companheirismo. Extensivo ao querido Jeremias!

A todos os animais que contribuíram na minha pesquisa. Espero tê-los tratado com a dignidade e respeito que merecem.

RESUMO

A anaplasnose bovina, causada pela rickétsia intraeritrocitária *Anaplasma marginale*, é responsável, em vários países, por prejuízos mensurados pela mortalidade de animais e por parâmetros como baixo ganho de peso, redução na produção leiteira, abortos e custos com tratamento e controle. Este trabalho teve por objetivo a imunização de bezerros com isolado de *A. marginale* de baixa patogenicidade, mantido ou não em cultivo de células do carrapato *Ixodes scapularis* (IDE8), e verificar: a ocorrência de resistência ao desafio com outro isolado altamente patogênico; presença ou ausência de exclusão de infecção entre os dois isolados; e resposta celular dos animais durante as infecções por meio de expressão de linfócitos T CD4+ produtores de IL-4 ou INF γ e linfócitos B. Quinze bezerros com idade até duas semanas de vida foram utilizados nesse experimento, sendo que cinco animais (Grupo 1) receberam, intravenosamente, UFMG1 produzido *in vitro* (células de carrapato IDE8), enquanto que outros cinco (Grupo 2) receberam UFMG1 produzido *in vivo* (sangue de bovino esplenectomizado e naturalmente infectado). Os cinco animais restantes (Grupo 3, denominado controle) receberam, neste mesmo momento, doses contendo solução salina. Todos os animais foram desafiados com um isolado de *A. marginale* de alta patogenicidade (UFMG2) produzido *in vivo* (sangue de bovino esplenectomizado e naturalmente infectado). O cultivo de isolado de *A. marginale* de baixa patogenicidade foi estabelecido em células IDE8 com sucesso. O isolado UFMG1, após ser inoculado nos animais, não impediu a infecção de um novo genótipo de *A. marginale* com grande semelhança com UFMG2. Além disso, animais que receberam UFMG1 não desenvolveram sinais clínicos ao serem desafiados com UFMG2, enquanto que o grupo controle, não imunizado, desenvolveu a doença levando à morte três dos cinco animais. A resposta celular avaliada

desenvolvida nos animais dos Grupos 1 e 2 se mostrou predominantemente Th1 e efetiva, conferindo proteção contra desafio com o isolado UFMG2.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C = grau centígrado

% = Percentagem

BE = Brometo de Etídio = *Et Br*

BFA = Brefeldina A

CD4 = Grupo de Diferenciação 4

CD8 = Grupo de Diferenciação 8

CD21 = Grupo de Diferenciação 21

cm² = centímetros quadrados (área)

CTF = Caldo de Triptose Fosfatada

DMSO = Dimetil Sulfóxido

DNA = Ácido Desoxirribonucléico

dNTP = deoxinucleosideo trifosfato

EDTA = Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ELISA = *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

Fc = Receptor

FSC = tamanho (FSC – *Forward Scatter*)

FITC = Isotiocianato de Fluoresceína

g = gravidade

g = gramas

µg = micrograma

ng = nanograma

mg = miligrama

kg = quilograma

Hind III = enzima de restrição

IDE8 = linhagem de células de *Ixodes scapularis*

IgG / IgG1/ IgG2 = Imunoglobulina G / Imunoglobulina G (Isotipo G1)/ (Isotipo 2)

IgE = Imunoglobulina E

IgM = Imunoglobulina M

INFγ = Interferon gama

IL-4 = Interleucina 4

L = litro
L-15B = Meio Leibovitz (meio de cultivo)
LBC = Lipoproteína Bovina Concentrada
ml = mililitro
 μ l = microlitro
M = molar
Min. = minuto
mM = milimolar
nM = nanomolar
 μ M = micromolar
MHC = Complexo de Histocompatibilidade Principal
MOPS = Tampão (*3-{N-morpholino} propanesulfonic acid*)
MSP = Proteína Principal de Superfície
msp = Gene da MSP
NK = *natural killer*
PBS = *Phosphate Buffered Saline*
PBS-W = PBS Wash (PBS com Soro Fetal Bovino e azida sódica)
PBS-P = PBS-W com saponina
PCR = *Polimerase Chain Reaction*
PE = Ficoeritrina
pi = pós-infecção
pH = Potencial Hidrogeniônico
PMA = *Phorbol Myristate Acetate*
PVC = *Packet Cell Volume* (= volume globular)
RFLP-PCR = *Restriction Fragment Length Polymorphism - Polimerase Chain Reaction*
RIFI = Reação de Imunofluorescência Indireta
RPMI 1640 = *Roswell Park Memorial Institute medium* (meio de cultivo)
RT-PCR = *Real Time - Polimerase Chain Reaction*
SFB = Soro Fetal Bovino
SSC = granulidade ou complexidade interna (SSC – *Side Scatter*)
SSM = *slipped-strand mispairing*

T.A. = Temperatura ambiente

Taq = Taq DNA Polimerase - enzima termoestável recombinante da bactéria *Thermus aquaticus*

U = unidade

VG = Volume globular, hematócrito

SUMÁRIO

RESUMO	7
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1) <i>ANAPLASMA MARGINALE</i>	18
2.1.1) <i>Anaplasmosse bovina</i>	18
2.1.2) <i>Distribuição geográfica</i>	19
2.1.3) <i>Impacto econômico</i>	19
2.1.4) <i>Transmissão</i>	20
2.1.5) <i>Ciclo biológico do A. marginale</i>	21
2.1.6) <i>Diagnóstico laboratorial</i>	22
2.1.7) <i>Resposta humoral e celular contra A. marginale</i>	24
2.1.8) <i>Controle</i>	25
2.1.8.1) <i>Uso de Vacinas</i>	26
2.1.8.2) <i>Vacinas derivadas de cultivo in vitro – novas perspectivas</i>	28
2.1.9) <i>Fenômeno de exclusão</i>	29
2.1.10) <i>Amostra de A. marginale de baixa patogenicidade</i>	31
2.2) CULTIVO CELULAR	31
2.2.1) <i>Cultivo in vitro</i>	31
2.2.2) <i>Cultivo de células de carrapato</i>	32
2.2.3) <i>Cultivo de A. marginale em IDE8</i>	33
3. OBJETIVOS	36
3.1) OBJETIVO GERAL	36
3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
A. ESTABELEECER O CULTIVO IN VITRO DO ISOLADO UFMG1 DE A. MARGINALE DE BAIXA PATOGENICIDADE EM CÉLULAS IDE8;	36
B. INOCULAR BEZERROS COM ISOLADO DE A. MARGINALE DE BAIXA PATOGENICIDADE E VERIFICAR A OCORRÊNCIA DE PROTEÇÃO AO DESAFIO COM ISOLADO DE ALTA PATOGENICIDADE. VERIFICAR, AINDA, SE A PROTEÇÃO ESTÁ RELACIONADA À OCORRÊNCIA DO FENÔMENO DE EXCLUSÃO ENTRE OS ISOLADOS;	36
C. AVALIAR A PARÂMETROS DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA (EXPRESSÃO DE LINFÓCITOS TCD4+, PRODUTORES DE IL-4 E INFγ E LINFÓCITOS B, POR MEIO DO MARCADOR DE SUPERFÍCIE CD21) DE BEZERROS APÓS IMUNIZAÇÃO COM ISOLADO DE A. MARGINALE DE BAIXA PATOGENICIDADE E DESAFIO COM ISOLADO DE ALTA PATOGENICIDADE.	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1) LOCAIS DOS EXPERIMENTOS	38
4.2) ISOLADOS DE ANAPLASMA MARGINALE	38

4.3) APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA _____	39
4.4) ANIMAIS EXPERIMENTAIS _____	39
ORGANOGRAMA DAS INOCULAÇÕES EXPERIMENTAIS _____	41
4.5) ANÁLISES ESTATÍSTICAS _____	42
4.6) METODOLOGIA DE APRESENTAÇÃO _____	42
5. RESULTADOS _____	44
5.1) <i>IN VITRO</i> ESTABLISHMENT AND PROPAGATION OF A BRAZILIAN STRAIN OF <i>ANAPLASMA MARGINALE</i> WITH APPENDAGE IN IDE8 (<i>IXODES SCAPULARIS</i>) CELLS _____	44
5.2) PROTECTION IN THE ABSENCE OF EXCLUSION BETWEEN TWO BRAZILIAN ISOLATES OF <i>ANAPLASMA MARGINALE</i> IN EXPERIMENTALLY INFECTED CALVES. _____	52
5.3) ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR NA INFECÇÃO E RE-INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE BOVINOS COM ISOLADOS HETERÓLOGOS DE <i>ANAPLASMA MARGINALE</i> _____	73
6. CONSIDERAÇÕES GERAIS _____	94
6.1) PRODUÇÃO DO ISOLADO DE <i>A. MARGINALE</i> DE BAIXA PATOGENICIDADE EM CÉLULAS IDE8 (UFMG1) _____	94
6.2) INOCULAÇÃO DE BEZERROS COM ISOLADO DE BAIXA PATOGENICIDADE: AVALIAÇÃO DE PROTEÇÃO AO DESAFIO COM ISOLADO DE ALTA PATOGENICIDADE E OCORRÊNCIA DE EXCLUSÃO ENTRE OS ISOLADOS. _____	97
6.3) AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA (EXPRESSÃO DE LINFÓCITOS TCD4+, PRODUTORES DE IL-4 E INF γ E LINFÓCITOS B, POR MEIO DO MARCADOR DE SUPERFÍCIE CD21) DE BEZERROS IMUNIZADOS COM INÓCULO DE <i>A. MARGINALE</i> DE BAIXA PATOGENICIDADE E DESAFIADOS COM ISOLADO DE ALTA PATOGENICIDADE _____	102
7. CONCLUSÕES _____	108
8. REFERÊNCIAS _____	110
PERSPECTIVAS FUTURAS _____	130

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A tristeza parasitária bovina constitui um complexo de doenças infecciosas causadas por agentes dos gêneros *Anaplasma* e *Babesia*, transmitidos por carrapatos e moscas hematófagas. A anaplasmose bovina, cujo agente etiológico é o *Anaplasma marginale*, causa importantes perdas econômicas em vários países, principalmente pela alta morbidade e mortalidade em rebanhos susceptíveis (Kocan *et al.*, 2003). Em áreas tropicais e subtropicais, *A. marginale* é transmitido biologicamente pelo carrapato de maior prevalência em bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Alonso *et al.*, 1992). No Brasil, a anaplasmose bovina é endêmica (revisado por Vidotto e Marana, 2001), sendo em Minas Gerais um fator limitante à criação de bovinos (Ribeiro e Reis, 1981a).

Métodos de diagnóstico sensíveis, específicos, de fácil execução e de baixo custo e a utilização de vacinas eficientes são condições imprescindíveis para o controle apropriado desta enfermidade. O processo de produção de antígenos, por meio de inoculação experimental de animais livres de patógenos e de vetores, dificulta e encarece a obtenção destes em áreas endêmicas. Por esta razão, o cultivo *in vitro* de *A. marginale* apresenta perspectivas positivas por ser mais simples, seguro e com menor custo de manutenção comparada à infecção experimental de animais susceptíveis (Blouin *et al.*, 2000).

Munderloh *et al.* (1994) descreveram o estabelecimento e manutenção de uma linhagem de células de carrapato derivada de *Ixodes scapularis*, denominada IDE8. Nesse sistema tem-se conseguido multiplicar *in vitro* várias rickétsias, dentre estas o *A. marginale* possibilitando maior desenvolvimento de métodos de produção de antígenos para fins de

diagnóstico e vacinas (Munderloh *et al.*, 1996). *Anaplasma marginale* cultivado nessas células conserva sua morfologia e se mantém infectante para bovinos (Blouin e Kocan, 1998). Por ser imunogênico para bovinos, o material obtido de cultivo celular tem sido utilizado como inóculo com grande eficiência (Blouin *et al.*, 1998).

A real possibilidade de cultivo em linhagens de células de carrapato abre perspectivas para a manutenção *in vitro* de amostras de *A. marginale* de baixa patogenicidade para bovinos, representando importante avanço para a produção de inóculos com o objetivo de proteger estes animais contra amostras mais patogênicas no campo.

Este trabalho teve por objetivo o estabelecimento de um isolado brasileiro de baixa patogenicidade de *A. marginale* em células de carrapato IDE8, seguido de inoculação em bezerros para a verificação de proteção contra isolado brasileiro de alta patogenicidade. Foram avaliadas a presença de co-infecção dos dois isolados utilizados e a expressão sangüínea das populações de células TCD4+ e B, além das citocinas IL-4 e INF gama ao longo das infecções experimentais.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1) *Anaplasma marginale*

2.1.1) Anaplasmosose bovina

A anaplasmosose bovina, causada pela riquétsia intraeritrocitária *Anaplasma marginale*, é caracterizada por anemia, perda de peso e morte (Ristic, 1960). Clinicamente, os bovinos são os hospedeiros mais susceptíveis, entretanto, outros ruminantes podem se tornar infectados com *A. marginale* (Kuttler, 1984).

Anaplasma marginale foi descrito pela primeira vez em bovinos da África do Sul como “pontos marginais” nos eritrócitos (Theiler, 1910). Inclusões de *Anaplasma* também foram observadas no centro de eritrócitos, sendo por isto descritas como *A. centrale*, uma subespécie de *A. marginale* (Theiler, 1911); estas amostras apresentavam-se menos patogênicas.

Anaplasma marginale ocorre exclusivamente no interior de eritrócitos dentro de vacúolos, onde corpúsculos iniciais se multiplicam por divisão binária (Ristic e Watrach, 1963). Durante fase aguda, 70% ou mais eritrócitos podem se tornar parasitados (Richey, 1981).

O período de incubação é de 28 dias em média, variando de sete a 60 dias dependendo do número de organismos da dose infectante (Kocan *et al.*, 2003). As células parasitadas são removidas da circulação pelo sistema monocítico fagocitário do animal causando uma anemia branda a grave e icterícia (Richey, 1981). Bezerros recém-nascidos são menos susceptíveis à infecção por *A. marginale* e, quando infectados, apresentam sinais clínicos moderados. Animais que se recuperam da fase aguda desenvolvem uma infecção

persistente caracterizada por uma ricketsemia baixa e cíclica (Ribeiro e Reis, 1981b; Eriks *et al.*, 1989; Kieser *et al.*, 1990). Esses animais, também chamados de portadores, desenvolvem imunidade e são resistentes à doença clínica em caso de exposição ao agente homólogo (Ristic e Carson, 1977), entretanto, se tornam fontes de infecção para os vetores (Ristic, 1960; Eriks *et al.*, 1989).

2.1.2) Distribuição geográfica

Anaplasma marginale tem distribuição cosmopolita, com maior prevalência em regiões tropicais e subtropicais. É enzoótica na maioria dos países da América Latina, com exceção de áreas de deserto ou montanhas como os Andes (Guglielmone, 1995). A soroprevalência em países das Américas é variável, contribuindo para a formação de áreas enzoóticas estáveis e instáveis (Kocan *et al.*, 2003).

2.1.3) Impacto econômico

Doenças transmitidas por carrapatos são extremamente prejudiciais aos animais susceptíveis e causam grandes prejuízos econômicos (Harrus e Baneth, 2005). Dos estimados 250 milhões de bovinos na América Central e do Sul no início da década de 1990, 70% estavam em regiões infestadas por carrapatos (Montenegro-James, 1992). Em vários países os prejuízos causados por hemoparasitoses podem ser mensurados pela mortalidade de animais e por parâmetros produtivos e econômicos como baixo ganho de peso, redução na produção leiteira, abortos e custos com tratamento e controle (Kocan *et al.*, 2003; Harrus e Baneth, 2005). Recentemente, demonstrou-se que anaplasnose e babesiose foram responsáveis por prejuízos econômicos de 875 a 1.365 milhões de dólares

por ano na América Latina, maior produtor mundial de carne bovina (Montenegro-James, 1992; Brown, 1997).

A anaplasmose constitui ainda uma barreira para o melhoramento genético dos rebanhos em países tropicais, pois bovinos *Bos taurus* importados de regiões temperadas são altamente susceptíveis a doenças transmitidas por carrapatos e, frequentemente, não sobrevivem, a menos que sejam submetidos a um esquema de imunização adequado. Esses prejuízos são incalculáveis, mas é a realidade para a maioria dos rebanhos da América Latina (Meléndez, 2000).

2.1.4) Transmissão

A transmissão da anaplasmose ocorre mecanicamente por picada de moscas e por meio de fômites contaminados com sangue infectado ou, biologicamente, por carrapatos (Dikmans, 1950; Ewing, 1981).

A transmissão mecânica por artrópodes foi relatada por moscas hematófagas (tabanídeos e *Stomoxys*) e mosquitos (*Culex* e *Aedes*) (Ewing, 1981; Potgieter, 1981; Foil, 1989). Em áreas da América Central, do Sul e África, onde não ocorrem carrapatos transmissores (Ewing, 1981; Foil, 1989) ou onde o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* não se comporta como vetor (Figuerola *et al.*, 1998; Coronado, 2001), a transmissão mecânica é uma importante forma de disseminação da anaplasmose.

Envolvendo mais de 20 espécies de carrapatos por todo o mundo (Dikmans, 1950; Ewing, 1981), a transmissão biológica pode ocorrer transtadialmente ou intraestadialmente, enquanto que a transmissão transovariana parece ser esporádica e com pouca importância

(Stich *et al.*, 1989; Ribeiro *et al.*, 1996). *Anaplasma marginale* é transmitido transestadialmente por ninfas ou adultos que se infectaram no estágio anterior, enquanto que a transmissão intraestadial ocorre dentro do mesmo estágio. A transmissão intraestadial é realizada por carrapatos machos, podendo se tornar um importante mecanismo de transmissão de *A. marginale* no caso de carrapatos de apenas um hospedeiro, como *R. (B.) microplus* e *Dermacentor albipictus* (Kocan *et al.*, 2003).

Em geral, o grupo de carrapatos vetores de *A. marginale* inclui *Boophilus* spp., *Dermacentor* spp., *Ixodes ricinus* e *Rhipicephalus* spp., enquanto que o *Amblyomma* spp. demonstrou não estar envolvido na transmissão. Em regiões tropicais e subtropicais o *R. (B.) microplus* tem sido considerado o principal vetor de *A. marginale* (Alonso *et al.*, 1992).

Além da transmissão mecânica e biológica, *A. marginale* pode ser transmitido da vaca para o bezerro via placenta durante a gestação (Norton *et al.*, 1983; Zaugg e Kuttler, 1984; Zaugg, 1985), podendo este tipo de transmissão ter importância epidemiológica em algumas regiões (Kocan *et al.*, 2003), embora ocorra com baixa frequência (Ribeiro *et al.*, 1995).

2.1.5) Ciclo biológico do *A. marginale*

O desenvolvimento do ciclo do *A. marginale* foi descrito em carrapatos adultos machos infectados e está relacionado à alimentação destes. Os carrapatos se alimentam de sangue infectado e após a multiplicação do *A. marginale* nas células epiteliais intestinais, as rickétsias passam para a hemolinfa e infectam vários tecidos, incluindo as glândulas salivares. Durante uma nova alimentação, essas rickétsias são transmitidas para um novo

hospedeiro vertebrado. Nos tecidos infectados do carrapato o *A. marginale* se desenvolve dentro de vacúolos ou colônias. A primeira visualização é a de colônias com formas reticuladas (vegetativas) que se dividem binariamente, formando grandes colônias com centenas de organismos. As formas reticuladas se transformam em densas que são infectantes e sobrevivem fora de células. Portanto, o bovino se torna hospedeiro quando carrapatos infectados com *A. marginale* nele se alimentam, transmitindo, via glândulas salivares, estas formas densas (Kocan, 1986; Kocan *et al.*, 1992a, b; Ge *et al.*, 1996).

2.1.6) Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da anaplasmose aguda geralmente é baseado na detecção direta, por microscopia, de inclusões de *A. marginale* em esfregaços sangüíneos, ou indiretamente, por sorologia. Há uma variedade de testes sorológicos que mensuram anticorpos específicos contra *Anaplasma* (Ristic, 1962; Amerault e Roby, 1968; Schunter e Leatch, 1988; Shkap *et al.*, 1990; Rodgers *et al.*, 1994).

Nas últimas décadas, o ELISA tem substituído a técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) por demonstrar vantagens como a possibilidade de análise de grande número de amostras de maneira rápida, discriminando sem subjetividade o positivo do negativo (Madruga *et al.*, 2000). Um avanço descrito para o diagnóstico da anaplasmose é o ELISA com antígenos recombinantes de proteínas principais de superfície (MSP) MSP1a e MSP2 que apresentou alta sensibilidade e especificidade (Araújo *et al.*, 2005).

Outra técnica de diagnóstico altamente sensível na detecção de organismos infecciosos é a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). É um diagnóstico direto, indicando a presença do parasito. Embora métodos sorológicos informem a flutuação de títulos de anticorpos no

animal, demonstrando a dinâmica da doença, a única evidência conclusiva da presença do parasito é pela detecção direta do agente causador (Callow *et al.*, 1986). Animais portadores, que se recuperaram da fase aguda, não podem ser diferenciados clinicamente de animais saudáveis e normalmente não são diagnosticados eficientemente por meio de esfregaço sangüíneo convencional. Entretanto, durante este estágio, ocorrem oscilações na ricketsemia, o que permite que a transmissão aconteça (Callow, 1984), sendo estes animais de grande importância na epidemiologia da doença. A PCR também tem se mostrado eficiente para diferenciação entre animais naturalmente infectados com *A. marginale* e animais vacinados com *A. centrale* (Molad *et al.*, 2006), sendo a técnica de imunofluorescência indireta incapaz de distinguir anticorpos de ambas as espécies de *Anaplasma* devido à semelhança antigênica (Palmer, 1989; Visser *et al.*, 1992). A técnica vem sendo desenvolvida também de forma que não só *A. marginale* seja detectado, assim como *Babesia bovis* e *B. bigemina* (Multiplex-PCR), já que comumente são encontrados animais portadores dos três agentes simultaneamente (Figuroa *et al.*, 1993)

Uma maior sensibilidade em relação a PCR convencional foi obtida com a técnica de PCR Tempo-Real (Carelli *et al.*, 2007), sendo possível uma análise quantitativa do DNA desejado. PCR Tempo-Real pode ser empregado na detecção e quantificação da ricketsemia no animal portador e nos animais pré-sintomáticos e sintomáticos, na correlação entre níveis de ricketsemia e sintomas clínicos, na avaliação da eficiência de vacinas e de tratamentos com drogas (Carelli *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de eficientes métodos de diagnóstico é importante no controle da anaplasnose. A infecção de animais livres de patógenos e de vetores para a obtenção de antígeno dificulta e encarece o processo em áreas endêmicas. Como alternativa, alguns

testes diagnósticos foram desenvolvidos utilizando como antígeno o *A. marginale* mantido *in vitro* em células de carrapatos *I. scapularis* (IDE8). Por ser imunogênico para bovinos, o material obtido de cultivo celular tem sido utilizado como inóculo (Blouin *et al.*, 1998) e material antigênico adequado para testes sorológicos (Saliki *et al.*, 1998; Rodgers *et al.* 1998).

2.1.7) Resposta humoral e celular contra *A. marginale*

A imunidade contra *A. marginale* envolve mecanismos humorais e celulares. Em um modelo vacinal proposto, o antígeno é eliminado por meio de anticorpos contra epitopos de superfície em combinação com a ativação de macrófagos aumentando a fagocitose e destruição do *Anaplasma*. A peça central do modelo é o linfócito T CD4+ expressando Interferon gama (INF γ) que é responsável pela síntese de IgG bovina, subclasse IgG2 e que também ativa macrófagos a aumentar seus receptores de expressão, fagocitose, fusão do fagolisossoma e produção de óxido nítrico (revisado por Kocan *et al.*, 2003).

As proteínas principais de superfície (MSPs) identificadas nos corpúsculos iniciais de *A. marginale* (Palmer e McGuire, 1984; Tebele *et al.*, 1991) parecem estar envolvidas na resposta imune contra anaplasnose. Brown *et al.* (1998) demonstraram que MSPs purificadas podem induzir a resposta por linfócitos T CD4+ e, assim, prevenir ricketsemia de *A. marginale* em animais expostos ao desafio. Mais especificamente, a terminação carboxila da MSP1a, que se conserva entre os isolados de *A. marginale*, é preferencialmente reconhecida por linfócitos T CD4+ (Brown *et al.*, 2001). As MSPs ainda induzem a produção de anticorpos relacionados ao controle da ricketsemia aguda (Tebele *et*

al., 1991), visto que anticorpos contra MSP1 bloqueiam corpúsculos iniciais de *A. marginale* (McGarey e Allred, 1994).

Valdez *et al.* (2002) questionaram a atribuição do papel principal da resposta imune aos linfócitos T CD4+, já que em bezerros timectomizados foram capazes de controlar anaplasnose aguda após terem seus linfócitos T CD4+ tratados com anticorpos monoclonais anti-CD4+. Isso demonstraria que a resposta por anticorpos é essencial (Kocan *et al.*, 2003). Entretanto, segundo Araújo *et al.* (2003), no experimento de Valdez *et al.* (2002) não houve a depleção total de CD4+, logo não seria possível afirmar que a resposta isolada de anticorpos protege o animal.

Respostas celulares envolvendo linfócitos T auxiliares (CD4+) continuam em evidência, já que linfócitos T CD4+ produzem INF γ que ativa macrófagos, aumentando a produção de óxido nítrico, substância de ação tóxica sobre as rickétsias, e estimulando a expressão de receptores Fc e a fusão de fagossomo e lisossomo (Brown *et al.*, 1998).

Em bovinos, o INF γ atua ainda sobre linfócitos B, estimulando a produção de IgG2 (Estes *et al.*, 1994). IgG2 está provavelmente envolvida no processo de neutralização da infectividade de corpúsculos iniciais de *A. marginale* mediada por anticorpos (Tuo *et al.*, 2000).

2.1.8) Controle

As medidas de controle da anaplasnose pouco modificaram nos últimos 60 anos. Essas variam com a região geográfica e incluem o controle de artrópodes com acaricidas, a administração de antibióticos e o uso de vacinas (Kocan *et al.*, 2000). O controle de

carrapatos é complexo, podendo ser aplicado apenas em algumas áreas e prevenindo parcialmente a infecção, já que há outras formas de transmissão. A quimioterapia é largamente empregada, entretanto é uma prática de alto custo, e de aplicação limitada em criações extensivas, havendo ainda o risco de se selecionar amostras resistentes pelo uso intenso de antibióticos (Kocan *et al.*, 2003).

2.1.8.1) Uso de Vacinas

A vacinação tem sido um método eficaz de controle da doença por todo o mundo, podendo ser realizada com antígenos vivos ou mortos.

O uso destas vacinas, porém, ainda apresenta várias limitações. O desenvolvimento de vacinas vivas para *Anaplasma* teve início há cerca de 100 anos (Theiler, 1911) e seu uso continua até os dias atuais. Vacinas vivas envolvem a inoculação de eritrócitos com amostras menos patogênicas ou atenuadas de *A. marginale* ou com amostras de *A. centrale*. A vacina é produzida a partir de sangue de animais esplenectomizados, inoculados experimentalmente com as amostras conhecidas. O inóculo é constituído de sangue colhido durante a fase de ricketsemia. Os bovinos vacinados desenvolvem uma infecção persistente que induz a uma imunidade protetora, não sendo necessária a revacinação (Ristic e Carson, 1977; Abdala *et al.*, 1990; Wright, 1990; Tebele e Palmer, 1991). O uso de sangue de portadores de anaplasnose não é seguro, pois o número de eritrócitos infectados normalmente é desconhecido e ainda há o risco de transmissão de patógenos como *Babesia*, *Trypanosoma*, *Brucella*, *Mycobacterium* e de vírus como da Diarréia Bovina a Vírus e Leucemia Bovina (Rogers *et al.*, 1988; Rodríguez *et al.*, 2000).

A utilização de amostras patogênicas de *A. marginale* seguida de tratamento com baixas doses de tetraciclina durante o aparecimento dos primeiros sinais clínicos, faz com que os animais adquiram imunidade sem experimentarem a anaplasmoze aguda (Wright, 1990). Entretanto, esse tipo de imunização requer supervisão veterinária, o que encarece o processo (Kocan *et al.*, 2003).

Amostras atenuadas de *A. marginale* foram obtidas após várias passagens em carneiros ou cervos (Lignieres, 1928; Kuttler e Zaugg, 1988) ou ainda por meio de irradiação (Edds *et al.*, 1966; Ristic *et al.*, 1968; Sharma e Bansal, 1986). Porém, pesquisadores da Austrália não tiveram sucesso com técnicas de atenuação por passagem em carneiros (Rogers e Shiels, 1979). Ristic e Carson (1977) desenvolveram uma vacina atenuada e fizeram vários testes, confirmando sua efetividade, mas pesquisadores brasileiros observaram efeitos adversos após a aplicação desta vacina (Ribeiro *et al.*, 1980). Benavides *et al.* (2000) testaram na Colômbia uma vacina contra babesiose e anaplasmoze. A vacina apresentava *A. marginale* atenuado e os resultados foram insatisfatórios quanto à indução de proteção contra a doença. Além disto, alguns animais ainda apresentaram sinais clínicos.

Por outro lado, *A. centrale*, subespécie de menor patogenicidade, pode desenvolver imunidade protetora contra *A. marginale* (Theiler, 1911). Isto ocorre porque os dois agentes compartilham epitopos imunodominantes (Shkap *et al.*, 1991). Estudos demonstraram que a variação antigênica da proteína principal de superfície dois (MSP2) na infecção persistente com *A. centrale* ocorre de maneira similar ao descrito para *A. marginale* (Shkap *et al.*, 2002a). Além disso, os epitopos de células T CD4⁺ que se conservam entre os dois agentes, contribuem para a proteção cruzada que ocorre no caso de vacinas vivas com *A. centrale* (Shkap *et al.*, 2002b).

Apesar dessa comprovada imunidade parcial observada com a inoculação de *A. centrale*, vários pesquisadores não obtiveram resultados satisfatórios. Payne *et al.* (1990), no Paraguai, observaram que inóculos de *A. centrale* não conferiram proteção suficiente contra *A. marginale* após desafio a campo.

2.1.8.2) Vacinas derivadas de cultivo *in vitro* – novas perspectivas

A produção de vacinas de *A. marginale* em cultivo de células tem sido amplamente pesquisada na tentativa de se evitar os problemas associados com vacinas derivadas de eritrócitos. Além de ser livre de eritrócitos bovinos e de patógenos, esta vacina pode ser mais facilmente padronizada, eliminando ainda a necessidade de inoculação experimental em animais em sua produção (Kocan *et al.*, 2003).

A propagação do *A. marginale in vitro*, utilizando células IDE8, uma linhagem contínua de células embrionárias originadas do carrapato *Ixodes scapularis* (Munderloh *et al.*, 1994; Munderloh *et al.*, 1996), tem apresentado perspectivas animadoras. Durante o desenvolvimento nas células IDE8, *A. marginale* apresenta semelhança morfológica e similaridade com o ciclo de desenvolvimento ao observado nas células epiteliais do intestino de carrapatos (Blouin e Kocan, 1998).

As MSPs identificadas em *A. marginale* derivados de eritrócitos são preservados durante o cultivo em IDE8 (Barbet *et al.*, 1999), indicando que o cultivo pode ser potencial fonte de antígenos para estudos básicos e aplicados. A imunidade protetora em bovinos gerada pelo antígeno cultivado em células de carrapatos já foi confirmada, sendo similar à imunidade gerada por inoculação de *A. marginale* derivado de eritrócitos (Kocan *et al.*, 2001; de la Fuente *et al.*, 2002b).

O cultivo de células IDE8 foi implantado no Brasil em 2004. As condições de manutenção e criopreservação desta linhagem celular foram adaptadas e aprimoradas (Bastos, 2005; Bastos *et al.* 2006) e um isolado de *A. marginale* de baixa patogenicidade foi estabelecido *in vitro* (Bastos *et al.*, 2009). Atualmente, outros isolados de *A. marginale* vêm sendo cultivados na UFMG. O cultivo da amostra brasileira *A. marginale* de baixa patogenicidade abre perspectivas de produção de uma vacina que poderá ser utilizada em áreas de ocorrência de amostras altamente patogênicas.

2.1.9) Fenômeno de exclusão

O fenômeno de exclusão foi descrito em infecções causadas por agentes do gênero *Rickettsia*, uma vez que carrapatos *Dermacentor andersoni* infectados com *Rickettsia peacockii* foram resistentes à infecção por *R. rickettsii* (Burgdorfer *et al.*, 1981).

O mecanismo do fenômeno de exclusão não está totalmente esclarecido, mas, pode estar relacionado a uma série de fatores como a competição por receptores na célula hospedeira ou fatores intracelulares do hospedeiro, produção de interferon ou substâncias similares pelo hospedeiro infectado e liberação de substâncias inibitórias pelo primeiro parasito infectante (Karpf *et al.*, 1997).

Palmer *et al.* (2001) verificaram que, em área endêmica de *A. marginale*, os rebanhos bovinos eram infectados com múltiplos genótipos *msp1 α* , entretanto quando os animais foram individualmente examinados constatou-se que estavam infectados com um único genótipo. Esse achado sugeriu que bovinos infectados por um determinado genótipo de *A. marginale* poderiam realizar a exclusão dos demais genótipos presentes no rebanho.

Experimentalmente, foi demonstrado que bovinos, inoculados com dois isolados de *A. marginale*, se infectaram com apenas um dos isolados. O mesmo fenômeno foi também observado em cultivo *in vitro* em células IDE8, quando as culturas foram inoculadas simultaneamente com dois isolados de *A. marginale* em doses equivalentes e apenas um deles estabeleceu-se *in vitro* (de la Fuente *et al.*, 2002a).

Ainda no estudo realizado com cultura *in vitro*, amostras de *A. marginale* não foram capazes de infectar culturas de células de carrapatos previamente infectadas com *Anaplasma ovis* (de la Fuente *et al.*, 2002a), sugerindo que o fenômeno de exclusão se conservava quando diferentes espécies de *Anaplasma* estavam envolvidas. Entretanto, em estudo realizado por Shkap *et al.* (2002b), um animal vacinado com *A. centrale* tornou-se posteriormente infectado com *A. marginale*, sugerindo a não ocorrência deste fenômeno entre amostras de espécies diferentes.

O fenômeno de exclusão foi também descrito em carrapatos infectados (de la Fuente *et al.*, 2003a). Isso é esperado, considerando que carrapatos têm como fonte de alimentação bovinos infectados com apenas um genótipo de *Anaplasma* (Palmer *et al.*, 2001). Entretanto, quando se permitiu que carrapatos se alimentassem de sangue com várias amostras de *A. marginale*, a infecção individual de carrapatos ocorreu por apenas um único genótipo, reforçando a hipótese de exclusão (de la Fuente, 2003a).

Entretanto, recentemente, Leverich *et al.* (2008) demonstraram experimentalmente a possibilidade de superinfecção de animais com duas amostras de *A. marginale*. Além disso, esses animais co-infectados serviram de fonte de alimentação para *D. andersoni*, o que permitiu que estes carrapatos também se infectassem com os dois isolados de *A. marginale*,

contrariando, por fim, o fenômeno de exclusão entre isolados de *A. marginale* em bovinos e carrapatos.

2.1.10) Amostra de *A. marginale* de baixa patogenicidade

Bock *et al.* (2003) isolaram, na Austrália, uma amostra de *A. marginale* que apresentava patogenicidade similar ou inferior que *A. centrale*. Bezerros previamente expostos a essa amostra foram resistentes ao desafio com quatro isolados de campo. Essa amostra de patogenicidade reduzida foi capaz de proteger os animais contra outros isolados. Os autores sugeriram sua utilização como vacina.

Já no Brasil, Ribeiro *et al.* (1997) isolaram uma amostra de *A. marginale* morfologicamente distinta por possuir um apêndice. A proteína MSP1a deste isolado foi seqüenciada e identificada como UFMG1 no *GenBank* (número EU676176). Essa amostra tem demonstrado ser de baixa patogenicidade, pois o seu uso em inoculações experimentais de bezerros esplenectomizados proporcionou altas ricketsemias sem ocasionar óbito dos animais (Ribeiro, 2005, comunicação pessoal). Por esta razão, a amostra de *A. marginale* brasileira com apêndice possui grande potencial para uso em inóculos e vacinas.

2.2) Cultivo celular

2.2.1) Cultivo *in vitro*

O cultivo de células e órgãos é uma técnica amplamente aplicada em diferentes disciplinas, desde as ciências básicas até a biologia molecular e a biotecnologia (Freshney, 1986). Os sistemas de cultivo *in vitro* possibilitam a produção de antígenos em larga escala, o

desenvolvimento de pesquisas sobre interação, infecção e ciclo biológico de microrganismos, testes de eficiência de drogas, dentre outras inúmeras aplicações.

2.2.2) Cultivo de células de carrapato

O cultivo de células de carrapatos teve estabelecimento da sua primeira linhagem há mais de 30 anos atrás (Varma *et al.*, 1975). Sistemas de culturas de células *in vitro* derivadas de vetores ou tecidos dos hospedeiros têm importante papel em pesquisas sobre carrapatos e doenças transmitidas por estes, possibilitando avanços nos aspectos da biologia básica destes vetores, na relação hospedeiro-vetor-parasito e ainda no controle das doenças (Bell-Sakyi *et al.*, 2007). Hoje, estão disponíveis mais de 40 linhagens celulares derivadas de 13 ixodídeos e de um argasídeo, que servem de fonte de propagação de diversos microrganismos de importância médica e veterinária (revisado por Bell-Sakyi *et al.*, 2007).

É importante ressaltar que há limitações de se obter material antigênico de hemoparasitas. Normalmente são realizadas infecções experimentais sucessivas em animais susceptíveis. Esses procedimentos são acompanhados de custos elevados devido à manutenção de animais esplenectomizados e livres de agentes patogênicos (ecto e hemoparasitas, bactérias, vírus). Além disso, muitas vezes o material obtido apresenta riscos de contaminações por células animais e patógenos que comumente infectam esses animais (Kocan *et al.*, 2001).

A produção de antígenos a partir de células cultivadas de carrapatos comparada à infecção experimental de animais susceptíveis é mais simples e demanda, em geral, menor custo de manutenção. Atualmente, alguns sistemas de cultivos de células de carrapatos já possibilitam a produção de materiais antigênicos livres de membranas animais ou patógenos, para serem utilizados em testes de diagnóstico (Saliki *et al.*, 1998; Rodgers *et*

al., 1998) e no desenvolvimento de vacinas (Blouin *et al.*, 1998; Kocan *et al.*, 2001; de la Fuente *et al.*, 2002b).

Apesar de algumas desvantagens do sistema, como o custo de materiais e reagentes, o cultivo *in vitro* apresenta vantagens como o controle rigoroso do ambiente, a possibilidade de caracterização e homogeneização de amostras, além de favorecerem as questões éticas, por eliminarem o uso de animais experimentais. Todas estas vantagens têm sido demonstradas em trabalhos desenvolvidos com as células IDE8 (Munderloh *et al.*, 1994), uma linhagem embrionária de células do carrapato *Ixodes scapularis*, o que motiva novos estudos sobre a manutenção e a possibilidade de infecções da linhagem com amostras brasileiras de rickétsias.

2.2.3) Cultivo de *A. marginale* em IDE8

A IDE8 é uma linhagem contínua de células embrionárias originadas do carrapato *Ixodes scapularis*. Estabelecida em 1994, essa linhagem é mantida em meio L-15B (Leibovitz), com pH próximo de 7,2, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 10% de caldo de triptose fosfatada (CTF) e 0,1% de lipoproteína bovina concentrada (LBC). Geralmente, as monocamadas são propagadas em frascos com área de 25 cm². A temperatura de manutenção deve ser de 30°C (± 2°C) (Munderloh *et al.*, 1994), o meio trocado semanalmente e as células aderidas se multiplicam dobrando a população em 3-5 dias, com densidade de aproximadamente 5x10⁶ células/ml (Munderloh *et al.*, 1996).

Um exemplo de sucesso de cultivo em células de carrapatos é a propagação do *A. marginale* em IDE8. *Anaplasma marginale* se multiplica em hemácias de bovinos (Ristic e Watrach, 1963) e em vários tecidos do seu vetor (Kocan *et al.*, 1992a), o que sugere que as

células de carrapatos são mais apropriadas para o cultivo *in vitro* deste agente (Munderloh *et al.*, 1996). A escolha da IDE8 para o cultivo do *A. marginale* se baseia nas características primitivas e fagocitárias da linhagem e propensão do agente em infectar diferentes tipos de tecidos do seu vetor natural.

Somente a IDE8 dentre quatro linhagens inicialmente testadas foi capaz de permitir o desenvolvimento do *A. marginale*, apesar de o *I. scapularis* não ser o vetor natural desta rickétsia (Munderloh, *et al.*, 1996). A adaptação do *A. marginale* a essa linhagem mostra que as células da IDE8 são capazes de promover um ambiente apropriado para crescimento e desenvolvimento de rickétsias (Blouin e Kocan, 1998). Observa-se uma semelhança morfológica entre o *A. marginale* cultivado em células IDE8 ao encontrado em carrapatos naturalmente infectados, mantendo-se ainda similaridades no ciclo de desenvolvimento. Embora este desenvolvimento seja aparentemente dependente de fatores fisiológicos induzidos pela alimentação do vetor, o cultivo *in vitro* pode facilitar o entendimento do ciclo biológico do *A. marginale* (Blouin e Kocan, 1998).

O crescimento do patógeno nestas células tem sido utilizado para produção de antígenos para ELISA (Saliki *et al.*, 1998), preparações vivas ou inativadas para imunoenaios experimentais em bovinos (Blouin *et al.*, 1998; Kocan *et al.*, 2001), desenvolvimento de testes com drogas *in vitro* (Blouin *et al.*, 2002b) e uma série de outros estudos sobre a expressão das proteínas principais de superfície (Blouin *et al.*, 2003). A IDE8 provou ser um bom modelo para os estudos das interações entre o *A. marginale* e carrapatos. As informações obtidas por meio desse sistema de cultivo podem ser aplicadas a outros patógenos transmitidos por carrapatos que se propagam nessa linhagem celular (Blouin *et al.*, 2002a).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1) Objetivo geral

Imunizar bezerros com isolado de *Anaplasma marginale* de baixa patogenicidade produzido *in vitro* e constatar a ocorrência de proteção contra isolado altamente patogênico, verificando ainda a presença ou ausência do fenômeno de exclusão entre os dois isolados.

3.2) Objetivos específicos

- A.** Estabelecer o cultivo *in vitro* do isolado UFMG1 de *A. marginale* de baixa patogenicidade em células IDE8;
- B.** Inocular bezerros com isolado de *A. marginale* de baixa patogenicidade e verificar a ocorrência de proteção ao desafio com isolado de alta patogenicidade. Verificar, ainda, se a proteção está relacionada à ocorrência do fenômeno de exclusão entre os isolados;
- C.** Avaliar a parâmetros da resposta imunológica (expressão de linfócitos TCD4+, produtores de IL-4 e INF γ e linfócitos B, por meio do marcador de superfície CD21) de bezerros após imunização com isolado de *A. marginale* de baixa patogenicidade e desafio com isolado de alta patogenicidade.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1) Locais dos experimentos

Os cultivos celulares foram realizados no Laboratório de Protozooses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária-UFMG e no Laboratório de Protozoologia Veterinária do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas, ICB-UFMG. A fase de experimentação animal foi conduzida nas instalações da Clínica de Ruminantes do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias - Escola de Veterinária-UFMG. As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Parasitologia – ICB-UFMG e no Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC (CSIC-Universidad Castilla La Mancha - JCCM), Ciudad Real, Espanha, e as análises imunológicas foram realizadas no Laboratório de Leishmanioses e Vacinas do Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG.

4.2) Isolados de *Anaplasma marginale*

Dois isolados de *A. marginale* oriundos de Minas Gerais, Brasil, foram utilizados neste estudo. O isolado UFMG1, obtido a partir de sangue de um bezerro naturalmente infectado em Pará de Minas (Ribeiro *et al.*, 1997), possui a presença de apêndice e produz altos picos de ricketsemia em animais esplenectomizados sem causar morte. O isolado UFMG2, obtido em 2005 a partir de sangue de um bezerro naturalmente infectado em Inhaúma, não apresenta apêndice e induz alta morbidade e mortalidade em bovinos esplenectomizados ou não-esplenectomizados.

Ambos os isolados sofreram passagem em dois bezerros machos, esplenectomizados, livres de hemoparasitos e ectoparasitos. Os animais foram acompanhados diariamente por meio de exame clínico, aferição de temperatura, acompanhamento da variação do volume globular e quantificação de ricketsemia por esfregaços sangüíneos em lâminas coradas com Giemsa.

O bezerro esplenectomizado que recebeu o inóculo UFMG1 teve amostras de sangue colhidas ao atingir ricketsemia de 64%, enquanto que o bezerro esplenectomizado que recebeu o inóculo UFMG2 teve amostras de sangue colhidas ao atingir ricketsemia de 56%, sendo ainda necessário o tratamento com Cloridrato de Tetraciclina (15 mg/kg de peso corporal, repetido em 12 horas) para se evitar a morte do animal. As amostras foram diluídas em DMSO, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas no Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG.

Os isolados foram também caracterizados por meio de seqüenciamentos da MSP1a e podem ser acessados pelos números EU676176 (UFMG1) e EU676175 (UFMG2) no *GenBank*.

4.3) Aprovação pelo comitê de ética

O projeto que deu origem ao presente estudo teve aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (número de protocolo 41/2006).

4.4) Animais experimentais

Foram utilizados 15 bezerros machos da raça holandesa com uma a duas semanas de idade, divididos em três grupos:

Grupo 1- Cinco animais inoculados individualmente com aproximadamente $3,6 \times 10^7$ corpúsculos de *A. marginale* por via intravenosa (UFMG1 produzido *in vitro*);

Grupo 2- Cinco animais inoculados individualmente com aproximadamente $2,0 \times 10^7$ hemácias parasitadas com *A. marginale*, por via intravenosa (UFMG1 produzido *in vivo*);

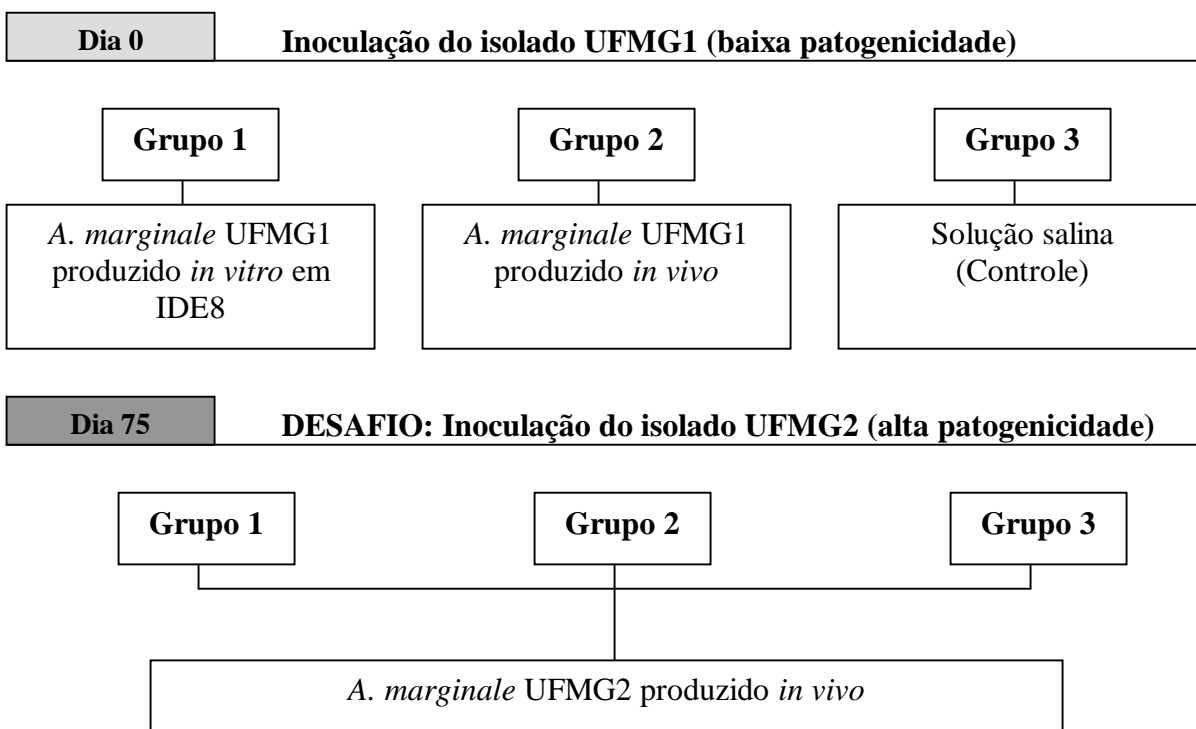
Grupo 3- Cinco animais inoculados individualmente com o mesmo volume utilizado nos grupos anteriores, por via intravenosa (solução salina), constituindo assim, o grupo controle.

Os animais foram avaliados diariamente por exame clínico por meio de alterações de comportamento, coloração de mucosas, fezes, grau de desidratação, batimentos cardíacos e movimentos respiratórios por minuto. Além da observação clínica, diariamente foram realizadas coletas de sangue de capilares de orelha para a determinação do volume globular (técnica de microhematócrito) e confeccionados esfregaços sangüíneos a partir do sangue de ponta de cauda, que foram corados pelo método de Giemsa. A visualização em microscópio óptico teve como objetivo a confirmação do início e acompanhamento da ricketsemia (quantificação), bem como o controle de negatividade dos animais para outros hemoparasitos como *Babesia bovis* e *B. bigemina*. O percentual de hemácias infectadas foi estimado por meio da contagem de 20 campos homogêneos contendo aproximadamente 200 hemácias.

A necessidade de intervenção medicamentosa para cada animal foi baseada na associação de alterações nos exames clínicos (comportamento e sinais clínicos como mucosas anêmicas e anorexia) e laboratoriais (volume globular e ricketsemia).

O momento do desafio com o isolado UFMG2 foi determinado de acordo com retorno dos animais dos Grupos 1 e 2 aos valores normais de volume globular e temperatura e observação de ricketsemia baixa ou inaparente. Dentro destes critérios, no dia 75 do experimento, 5×10^7 hemácias infectadas com *A. marginale* (isolado UFMG2) foram inoculadas por via intravenosa em todos os animais dos Grupos 1, 2 e 3.

Organograma das inoculações experimentais



4.5) Análises estatísticas

As análises estatísticas dos dados hematológicos dos animais inoculados foram realizadas pelo teste Qui-quadrado. Os dados imunológicos, obtidos pela citometria de fluxo de amostras sanguíneas dos mesmos animais, foram analisados por teste de *t* de Student e por análise de variância (ANOVA) com correção do teste de *Bonferroni*.

4.6) Metodologia de apresentação

A metodologia utilizada para obtenção dos três objetivos específicos descritos anteriormente, assim como seus resultados e discussões foram apresentados por meio de três artigos na seção “Resultados”:

- a) *In vitro* establishment and propagation of a Brazilian strain of *Anaplasma marginale* with appendage in IDE8 (*Ixodes scapularis*) cells (***Brazilian Journal of Microbiology* (2009), 40:399-403**)
- b) Protection in the absence of exclusion between two Brazilian isolates of *Anaplasma marginale* in experimentally infected calves. (**submetido ao *Veterinary Journal***)
- c) Estudo da resposta imune celular na infecção e re-infecção experimental de bovinos com isolados heterólogos de *Anaplasma marginale* (**não submetido**)

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1) *In vitro* establishment and propagation of a Brazilian strain of *Anaplasma marginale* with appendage in IDE8 (*Ixodes scapularis*) cells

Estabelecimento e propagação *in vitro* de uma amostra brasileira de *Anaplasma marginale* com apêndice em células IDE8 (*Ixodes scapularis*)

Camila V. Bastos¹, Lygia M. F. Passos^{2*}, Maria Mercês C. Vasconcelos¹,

Múcio F. B. Ribeiro¹

¹Departamento de Parasitologia, ICB-UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária- UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

*Corresponding author:

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária

Universidade Federal de Minas Gerais

Caixa Postal 567, CEP 30123-970

Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

e-mail: lygia@vet.ufmg.br

Submetido e aceito no *Brazilian Journal of Microbiology*

**IN VITRO ESTABLISHMENT AND PROPAGATION OF A BRAZILIAN STRAIN
OF ANAPLASMA MARGINALE WITH APPENDAGE IN IDE8
(IXODES SCAPULARIS) CELLS**

Camila V. Bastos¹; Lygia M. F. Passos^{2*}; Maria Mercês C. Vasconcelos¹; Múcio F. B. Ribeiro¹

¹Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil; ²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

Submitted: March 10, 2008; Returned to authors for corrections: April 22, 2008; Approved: March 13, 2009.

ABSTRACT

A Brazilian isolate of *Anaplasma marginale* with appendage was successfully established and maintained *in vitro* in a tick cell line (IDE8). Infection was confirmed by optical and transmission electron microscopy. In addition, primers MSP1aNF2 and MSP1aNR2 amplified products from DNA extracted from infected IDE8 cells. Comparisons with partial sequences of the *msp1α* gene and the complete genome of *A. marginale* confirmed that the sequences of amplified fragments were from the *A. marginale* genome. This is the first establishment of a Brazilian *A. marginale* isolate in tick cells, representing a new system for biological and molecular studies and also a new source of material for diagnosis and development of vaccines.

Key words: IDE8 cells, *Anaplasma marginale*, *in vitro* culture

*Corresponding Author. Mailing address: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 567, CEP 30123-970, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. E-mail: lygia@vet.ufmg.br

INTRODUCTION

Bovine anaplasmosis, caused by the intraerythrocytic rickettsia *Anaplasma marginale*, is a tick transmitted disease characterized by anemia, weight loss, fever, abortion and deaths, and can lead to significant economical losses for the dairy and meat industry (22). Calves are less susceptible than adults to *A. marginale* infections and when infected, usually present moderate clinical signals. Animals that are able to recover from an acute phase

undergo a persistent infection status characterized by cyclical and low rickettsemias (10,16). These animals, so called carriers, become immune and resistant to new clinical diseases in case of exposure to a homologous strain (19). However, they act as a source of infection for other animals within the herd or the area.

Differences among *A. marginale* strains have been described on the basis of morphology (8,11,18), tick transmission (20,23), virulence (13), membrane surface

proteins (MSP) (1), and reactivity detected by monoclonal antibodies (21).

Ribeiro *et al.* (18) reported the first ultra-structural description of a Brazilian isolate of *A. marginale* with an inclusion appendage, obtained from an acutely infected cow from Pará de Minas, Minas Gerais. Later, this isolate was characterized by a panel of monoclonal antibodies that revealed antigenic differences among Brazilian isolates (8). Furthermore, this isolate with appendage was not infective for *Boophilus microplus* ticks (9).

The IDE8 line had been established from embryonic *Ixodes scapularis* ticks (14) and recently we have reported efficient ways to preserve this cell line by refrigeration and cryopreservation (3). Few other isolates of *A. marginale* have been established *in vitro* in IDE8 cells (4,5,15,24). However, no Brazilian strains of *A. marginale* have been previously establishment *in vitro* using tick cell systems.

Thus, the present paper reports the first establishment of a strain of *A. marginale* with appendage in IDE8 cells, its morphological characterization through optical and electronic microscopy, as well as the sequence of the *m脾1a* gene during its *in vitro* cultivation in this tick cell line.

MATERIALS AND METHODS

One Friesian calf, free from hemoparasites, was used to provide infected blood for *in vitro* infections. The calf had been separated from his mother before ingestion of colostrum and was housed in an individual pen protected against ticks and flies. The animal was fed with powered milk, commercial ration and water *ad libitum*. Weekly, the calf and the animal shed were treated with cypermethrin acaricide and the calf was monitored through examination of Giemsa stained

blood smears to ensure the absence of any hemoparasite infection. Serum samples were also examined by the indirect fluorescent antibodies test (IFAT) for detection of anti-*A. marginale*, anti-*Babesia bovis* and *B. bigemina* antibodies. Once the calf was ensured to be free from hemoparasitic infections, it was splenectomized and inoculated intravenously with 5 x 10⁷ infected erythrocytes of an isolate of *A. marginale* with appendage (18) (GenBank accession number EU676176), which had been kept as a frozen stabilate in liquid nitrogen. When rickettsemia in blood smears reached 64% (37 days post inoculation), blood samples were collected with EDTA and were processed as described by Blouin *et al.* (5). The material was aliquoted into 1.8 mL vials, which were cryopreserved in liquid nitrogen using DMSO (6%) as cryoprotectant; these cryostabilates were used to infect the IDE8 cells.

IDE8 cells were cultured in L-15B supplemented with foetal calf serum in 25 cm² flasks, following standard procedures (14). Each of two flasks containing on growing monolayers of IDE8 cells were infected with one *A. marginale* cryostabilate. After a quickly defrosting procedure (immersion into a 37°C water bath), the content of each vial was centrifuged at 10,000 x g, for 20 minutes and the sediment was resuspended in 5mL of medium L-15B containing inactivated 5% fetal calf serum. In order to make the medium more appropriate for anaplasma growth, NaHCO₃ (2.5 g/L) and MOPS (2.093g/L) were added to the complete medium (15). The inoculated flasks were incubated at 34°C and the first medium change was carried out at 24 hours after inoculation; the subsequent medium changes were done weekly. The cultures were monitored daily through examination under an inverted microscope with phase contrast.

At each weekly medium change, samples from the supernatants were used to make cytospin smears, which were stained with Giemsa and examined in a light microscopy under oil immersion.

From cultures exhibiting growth of *A. marginale*, 1mL of cell suspensions was collected, centrifuged at 10,000 x g for 10 minutes at 4°C and the pelleted cells, obtained after supernatant removal, were fixed in 2.5% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer (0.2M, pH 7.2), during 24 hours at 4°C (17). IDE8 cells were then washed three times in cacodylate buffer, included in 2% Agar and post-fixed in a solution containing 2% osmium tetroxide in sodium cacodylate buffer (0.2M, pH 7.2) at 4°C during two hours. The agar blocks were washed in cacodylate buffer and were dehydrated in increasing concentrations of ethylic alcohol for posterior inclusion in Epon-Araldite. Ultra-thin sections (90 nm) were stained with uranyl acetate and lead citrate and were examined in a transmission electron microscopy (Zeiss EM-10).

DNA was extracted from samples of infected and uninfected IDE8 cells, using a commercial kit (Wizard Genomic DNA Purification, PROMEGA), following the manufacturer instructions for extraction from cells and tissues. The *msp1α* gene of *A. marginale* was amplified from the DNA through PCR using 20pmol of each primer, MSP1aNF2 (5' - CAC CGC CAA ACA TGA AGT CGA CAA - 3') and MSP1aNR2 (5' - TGT GGT TGT CCT CTT TCC CGA TGT - 3'), in a final volume of 50 µl [0.2 mM dNTP, 5 µl DNA Polymerase Taq (1x), 0.5 µl DNA Polymerase Taq (2.5U) and ultrapure sterile water to complete the final volume. The reactions were processed adding 5 µl of each extracted DNA in an automatic thermocycling reactor (Eppendorf Mastercycler) with 35 cycles. After the initial denaturation of 5 minutes at 94°C, each cycle lasted 30 seconds of denaturation

at 94°C, one minute annealing at 60°C and one minute and 30 seconds extension at 72°C. The final step was 5 minutes at 72°C and maintenance of samples at 18°C. The PCR products were submitted to electrophoresis in 1% agarose gels, which were stained with ethidium bromide for detection of amplified fragments.

PCR products from infected IDE8 cells were purified, following recommendations in the GFX PCR DNA kit (GE Healthcare Biosciences). The purified DNA was sequenced using the MSP1a primers, as previously described, and this was followed by the precipitation of unincorporated nucleotides.

The products from sequencing were read in an automatic capillary *MegaBACE 1000* sequencing system and sequences were aligned and edited using the *MEGA 3.0* program (12). To confirm identity, the sequence was compared with that available in the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), accession number EU676176.

RESULTS

A. marginale infected IDE8 cells were first observed on day 8 after inoculation, as small and compact colonies, which were intensively stained in the cytoplasm of IDE8 cells (Fig. 1A). In the following days distinct forms of colonies were observed, suggesting an evolutive sequence. Initially, well defined parasitophorous vacuoles containing compact colonies were formed (Fig. 1B). In the subsequent stage, the corpuscles were clearly isolated (Fig. 1C), with increasing numbers (Fig. 1D). On day 12 after inoculation, large colonies were observed, and their corpuscles were released into the culture medium after disruption of the vacuole membrane (Fig. 1E and 1F). *A. marginale* cultivation was propagated

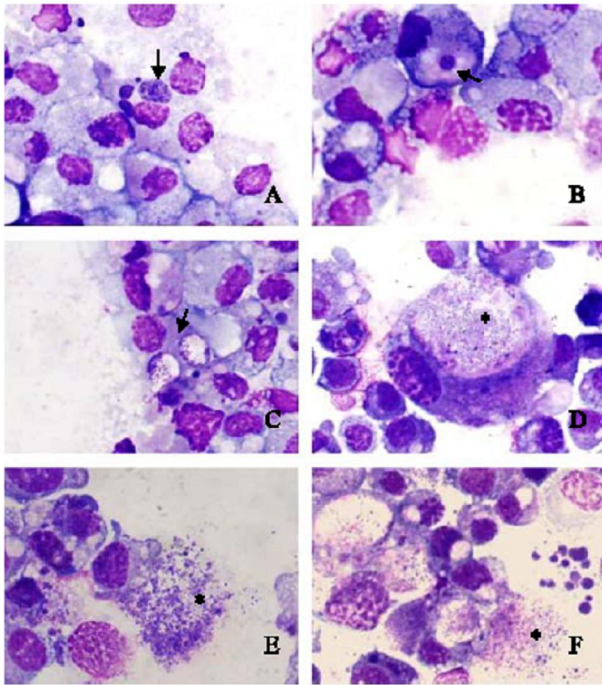


Figure 1. IDE8 cells infected with *Anaplasma marginale* with appendage. (A) Formation of vacuoles containing *A. marginale* (arrow); (B) Initial formation of *A. marginale* colonies (arrow); (C) Colonies with isolated corpuscles (arrow); (D) Large colony of *A. marginale* with dislocation of the nucleus (asterisk); (E) Rupture of a colony releasing corpuscles (asterisk); (F) *A. marginale* extra cellular corpuscles (asterisk).

continuously along 18 months with several passages, which were carried out when approximately 30% of the cells were infected.

The images obtained from transmission electron microscopic analysis confirmed the *A. marginale* infection in IDE8 cells. Due to the large quantity of initial corpuscles present in the inoculum, some IDE8 cells were invaded by several corpuscles. The corpuscles were adhered to the cell membrane (Fig. 2A), which showed later a depression (Fig. 2B). After entering, the corpuscles were seen inside parasitophorous vacuoles, and some of them were undergoing binary division (Fig. 2B). Several colonies were seen within a cell

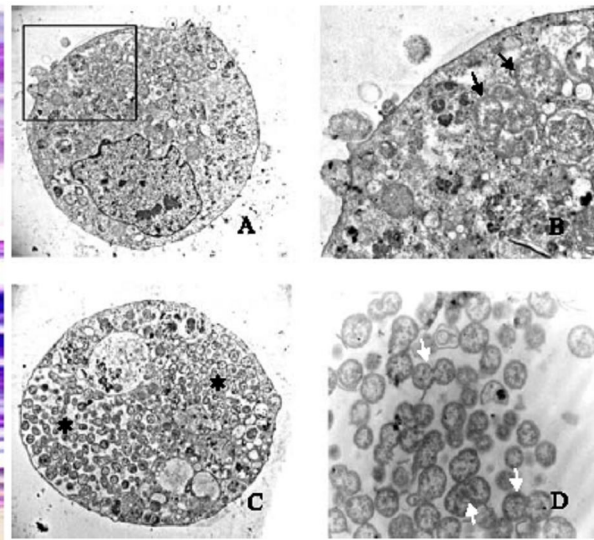


Figure 2. Electron micrograph of IDE8 cells infected with *Anaplasma marginale* with appendage. (A) Adhesion of a dense form of *A. marginale* on the membrane of the IDE8 cell, initiating cellular invasion; (B) Depression of the cytoplasmic membrane of the IDE8 cell; (C) IDE8 cell containing two intracytoplasmic colonies with several corpuscles of *A. marginale*. The colonies occupy most of the cytoplasm of the cell (asterisks); (D) Dense forms of *A. marginale* free in the extra cellular medium, able to infect new cells (arrows).

(Fig. 2B and C). Thereafter, large colonies were observed, in general one in each IDE8 cell, although some cells had multiple colonies (Fig. 2C). Several initial bodies were observed free in the culture medium, as dense forms (Fig. 2D).

Primers MSP1aNF2 and MSP1aNR2 amplified products from DNA extracted from *A. marginale* infected IDE8 cells, while no amplification was detected from uninfected IDE8 cells. The sequencing analysis revealed a fragment of 1166 nucleotides that were identical to the original sequence (GenBank accession number EU676176). Therefore, the *msp1α* gene found in the original inoculum was conserved in infected cultured IDE8 cells.

DISCUSSION

This *in vitro* culture system for *A. marginale* using tick cells opens new perspectives to the study of bovine anaplasmosis, particularly in areas where the infection is endemic and the maintenance of bovine donors free from hemoparasites is difficult and expensive. The present work constitutes the first establishment *in vitro* of a Brazilian rickettsia using tick cells.

The process of colony formation followed the same pattern described by Blouin and Kocan (4) and the sequence of pictures showed here is of relevance for researchers who are initiating to culture this rickettsia *in vitro*. The electron microscopy analysis revealed a penetration process of initial corpuscles into IDE8 cells similar to that described by Blouin *et al.* (5). The multiple infection of cells with several vacuoles being formed in the cytoplasm of IDE8 cells suggest a fusion of vacuoles, forming large colonies, as observed in later stages.

Gonçalves-Ruiz *et al.* (9) demonstrated, through transmission electron microscopy, that this isolate with appendage has no developmental stages into epithelial gut cells of engorged *B. microplus* females that had been fed on calves undergoing high rickettsemia. In addition, no transtadiol or intrastadiol transmissions were observed. For these reasons, this isolate was considered to be non infective for *B. microplus* ticks, suggesting mechanical transmissions to be the main way for its maintenance in nature.

On the other hand, Blouin *et al.* (6) indicated that *A. marginale* isolates that are not tick-transmitted are not able to grow in tick cell cultures, and therefore propagation of these isolates *in vitro* would not be possible. However, this was not the case for this particular isolate, which is not

transmissible by ticks and nevertheless could be successfully established in the *in vitro* IDE8 cells. Thus, this *in vitro* culture system can be very useful as a new tool to evaluate the development of different stages of *Anaplasma* strains, as well as their relationship within the tick cells.

It has also been proved that cultured *A. marginale* strains retain their antigenic composition and infectivity for cattle after successive passages (2,4,15). The *m脾1α* gene is genetically stable, as it does not change during tick and animal passage or *in vitro* culture of an isolate (2).

The sequence of the *m脾1α* gene obtained from the *A. marginale* with appendage after cultivation was highly preserved when compared to the original sequence obtained from the donor blood. Thus, it was proved that the MSP1a protein was conserved in this Brazilian isolate after *in vitro* cultivation in tick cells. Similarly, Bowie *et al.* (7) reported that the *m脾1α* sequence of an Oklahoma isolate of *A. marginale* did not change after successive passages *in vitro* or after being transmitted through *Dermacentor variabilis*. Therefore, this *in vitro* culture system constitute a new tool to study Brazilian strains of *A. marginale*, providing a new source of this rickettsia for *in vitro* studies, diagnostic tests and for the development of vaccines.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank FAPEMIG for the financial support (grant EDT 2198/03), CNPq and CAPES for awarding scholarships, and Dr U.G. Munderloh (University of Minnesota, USA) for permission to use the IDE8 cell line.

RESUMO

Estabelecimento e propagação *in vitro* de uma amostra brasileira de *Anaplasma marginale* com apêndice em células IDE8 (*Ixodes scapularis*)

Uma amostra brasileira de *Anaplasma marginale* com apêndice foi estabelecida e mantida *in vitro* em uma linhagem de células de carrapatos (IDE8). A infecção foi confirmada através de microscopia ótica e eletrônica de transmissão. Além disso, os primers MSP1aNF2 e MSP1aNR2 amplificaram produtos do DNA extraído das células infectadas. Comparações de sequências parciais do gene *mSP1α* e do genoma completo de *A. marginale* confirmaram que as sequências dos fragmentos amplificados pertenciam ao genoma de *A. marginale*. Este é o primeiro estabelecimento *in vitro* de uma amostra brasileira de *A. marginale* em células de carrapatos, representando um novo sistema para estudos biológicos e moleculares, além de ser uma nova fonte de material para o desenvolvimento de testes diagnósticos e de vacinas.

Palavras-chave: IDE8 cells, *Anaplasma marginale*, cultivo *in vitro*

REFERENCES

1. Allred, D.R.; McGuire, T.C.; Palmer, G.H.; Leibt, S.R.; Harkins, T.M.; McElwain, T.F.; Barbet, A.F. (1990). Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralizationsensitive epitope in *Anaplasma marginale* (tick-borne diseases/rickettsia/gene structure/tandem repeats). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 3220-3224.
2. Barbet, A.F.; Blentlinger, R.; Yi, J.; Lundgren, A.M.; Blouin, E.F.; Kocan, K.M. (1999). Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture, tick salivary glands, and cattle. *Infect. Immun.*, 67, 102-107.
3. Bastos, C.V.; Vasconcellos, M.M.C.; Ribeiro, M.F.B.; Passos, L.M.F. (2006). Use of refrigeration as a practical means to preserve viability of *in vitro*-cultured IDE8 cells. *Exp. Appl. Acarol.* 39, 347-352.
4. Blouin, E.F.; Kocan, K.M. (1998). Morphology and development of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in cultured *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) cells. *J. Med. Entomol.*, 35, 788-797.
5. Blouin, E.F.; Barbet, A.F.; Yi, J.; Kocan, K.M.; Saliki, J.T. (2000). Establishment and characterization of an Oklahoma isolate of *Anaplasma marginale* in cultured *Ixodes scapularis* cells. *Vet. Parasitol.*, 87, 301-313.
6. Blouin, E.F.; de la Fuente, J.; Garcia-Garcia, J.C.; Sauer, J.R.; Saliki, J.T.; Kocan, K.M. (2002). Applications of a cell culture system for studying the interaction of *Anaplasma marginale* with tick cells. *Animal Health Research Reviews*, 3, 57-68.
7. Bowie, M.V.; de la Fuente, J.; Kocan, K.M.; Blouin, E.F.; Barbet, A.F. (2002). Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. *Gene*, 282, 95-102.
8. Gonçalves-Ruiz, P.M.; Passos, L.M.F.; Martins, M.S.; Patarroyo, J.H.S.; Ribeiro, M.F.B. (2002). Antigenic characterization of morphologically distinct *Anaplasma marginale* isolates using a panel of monoclonal antibodies. *Vet. Parasitol.*, 107, 169-177.
9. Gonçalves-Ruiz, P.M.; Passos, L.M.F.; Ribeiro, M.F.B. (2005). Lack of infectivity of a Brazilian *Anaplasma marginale* isolate for *Boophilus microplus* ticks. *Vet Parasitol* 128, 325-331
10. Kieser, S.T.; Eriks, I.S.; Palmer, G.H. (1990). Cyclic ricketsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infect Immun.*, 58, 117-119.
11. Kocan, K.M.; Ewing, S.A.; Hair, J.A.; Barron, S.J. (1984). Demonstration of the inclusion appendage of *Anaplasma marginale* in nymphal *Dermacentor andersoni*. *Am. J. Vet. Res.*, 45, 1800-1807.
12. Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M. (2004). MEGA 3: integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis sequence alignment. *Brief. Bioinform.*, 5, 150-163.

13. Kuttler, K.L.; Winnward, L.D. (1984). Serologic comparisons of four *Anaplasma* isolates as measured by complement-fixation test. *Vet. Microbiol.*, 9, 181-186.
14. Munderloh, U.G.; Liu, Y.; Wang, M.; Chen, C.; Kurtti, T.J. (1994). Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*. *J. Parasitol.*, 80, 533-543.
15. Munderloh, U.G.; Blouin, E.F.; Kocan, K.M.; Ge, N.L.; Edwards, W.L.; Kurtti, T.J. (1996). Establishment of the tick (Acari: Ixodidae)-borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in tick cell culture. *J. Med. Entomol.*; 33, 656-664.
16. Ribeiro, M.F.B.; Reis, R. (1981). Exposição natural de bezerros em áreas endêmicas de *Anaplasma marginale* de Minas Gerais. *Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais*, 33, 63-66.
17. Ribeiro, M.F.B.; Lima, J.D. (1996). Attempted transmission of *Anaplasma marginale* by infected *Boophilus microplus*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 48, 397-402.
18. Ribeiro, M.F.B.; Passos, L.M.F.; Guimarães, A.M. (1997). Ultrastructure of *Anaplasma marginale* with an inclusion appendage, isolated in Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 70, 271-277.
19. Ristic, M.; Carson, C.A. (1977). Methods of immunoprophylaxis against bovine anaplasmosis with emphasis on use of the attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. In: Miller, L.H.; Pino, J.A.; McKelvey, J.J. (eds) *Immunity to blood parasites of animal and man: advances in experimental medicine and biology*. New York: Plenum Publishing Corp., 151-188.
20. Smith, R.; Levy, M.G.; Kuhlenschmidt, M.S.; Adams, J.H.; Rzechula, D.G.; Hardt, T.A.; Kocan, K.M. (1986). Isolate of *Anaplasma marginale* not transmitted by ticks. *Am. J. Vet. Res.*, 47, 127-129.
21. Tebele, N.; McGuire, T.C.; Palmer, G.H. (1991). Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infect. Immun.*, 59, 3199-3204.
22. Wanduragala, L.; Ristic, M. (1993). Anaplasmosis. In: Woldehiwet Z. and Ristic M. (eds) *Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals*. Oxford: Pergamon Press, 65-88.
23. Wickwire, K.B.; Kocan, K.M.; Barron, S.J.; Ewing, S.A.; Smith, R.D. (1987). Infectivity of three *Anaplasma marginale* isolates for *Demarcentor andersoni*. *Am. J. Vet. Res.*, 48, 96-99.
24. Zwegarth, E.; Josemans, A.I.; Spickett, A.M.; Steyn, H.C.; Putterill, J.; Troskie, P.C.; Mtshali, M.S.; Bell-Sakyi, L.; Shkap, V.; Fish, L.; Kocan, K.M.; Blouin, E.F. (2006). In vitro cultivation of a South African isolate of an *Anaplasma* sp. in tick cell cultures. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 73, 251-255.

5.2) Protection in the absence of exclusion between two Brazilian isolates of *Anaplasma marginale* in experimentally infected calves.

BASTOS C.V.¹, PASSOS L.M.F.^{2,3}, FACURY-FILHO E.J.⁴, RABELO E.M.¹,
DE LA FUENTE J.^{5,6}, RIBEIRO M.F.B.^{1*}

1. Departamento de Parasitologia, ICB–UFMG, C.P.486, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil.
2. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária – UFMG
3. Institute for Comparative Tropical Medicine and Parasitology, LMU, Munich, Germany.
4. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária – UFMG
5. Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC (CSIC-UCLM-JCCM), 13005 Ciudad Real, Spain.
6. Department of Veterinary Pathobiology, Center for Veterinary Health Sciences, Oklahoma State University, Stillwater, OK 74078, USA.

*Corresponding Author: Tel: +55 31 3409-2842 Fax: +55 31 3409-2970

E-mail address: mucioibr@icb.ufmg.br (M.F.B. Ribeiro)

Submetido ao *The Veterinary Journal*

Abstract

Two groups of five Friesian calves each were inoculated with a low-pathogenicity *A. marginale* isolate (UFMG1). The UFMG1 isolate was inoculated through intravenous injections of either *A. marginale*-infected tick cell cultures (group 1) or blood stabilates (group 2). A third group injected with saline served as controls. Seventy five days after the UFMG1 inoculation, all animals were inoculated with a blood stabilate containing a high pathogenicity *A. marginale* isolate (UFMG2). After infection with UFMG2, animals in groups 1 and 2 presented low rickettsemia, but clinical signals or PCV reductions were not observed. Control animals became sick, with high rickettsemia (16% infected erythrocytes) and reduction in PCV (71%), resulting in 60% (3/5) of death. The major surface protein 1a gene (*msp1a*) was used as a marker to differentiate between the two *A. marginale* isolates throughout the experiment. Up to two weeks after the UFMG2 inoculation, all animals in groups 1 and 2 showed *msp1a* UFMG1 sequences. However, four weeks after UFMG2 inoculation, these animals showed UFMG2 sequences together with a new *msp1a* genotype sequence, closely related to the UFMG2 isolate. Control group animals showed *msp1a* UFMG2 sequences up to four weeks after inoculation with UFMG2. However, six weeks after UFMG2 inoculation they also presented the new *msp1a* genotype sequence. The origin of the new *A. marginale* genotype is presently unknown, but it may represent the first example of MSP1a antigenic variation in infected cattle. The results presented here, confirmed the low pathogenicity of the UFMG1 isolate, which provided clinical protection against the highly pathogenic *A. marginale* UFMG2 isolate. Moreover, infection with the first *A. marginale* isolate did not prevent the establishment of the second isolate and its

variant (new *msp1a* genotype), suggesting protection by UFMG1 isolate without exclusion of UFMG2 isolate.

Key words: *Anaplasma marginale*, protection, infection-exclusion

1. Introduction

Anaplasma marginale, a tick-borne pathogen, is an intra-erythrocytic rickettsia responsible for important economic loss in cattle production in tropical and subtropical areas throughout the world, including Latin America (Harrus and Baneth, 2005). Worldwide, several isolates of *A. marginale* differ in biology, morphology, protein sequence and antigenic characteristics (reviewed by de la Fuente *et al.*, 2002a; 2004; 2007). In particular, the presence of an inclusion appendage of *A. marginale* isolates has been reported to be responsible for serological and immunological differences (Kuttler and Winnward, 1984). Only one isolate with an appendage (UFMG1) has, until the moment, been described among different *A. marginale* isolates from Brazil (Ribeiro *et al.*, 1997). This appendage isolate has been linked with decreased pathogenicity and previous antigenic and transmission studies proved that this isolate is not transmitted by ticks (Gonçalves-Ruiz *et al.*, 2002; 2005). The UFMG1 *A. marginale* isolate was successfully established and maintained *in vitro* in a tick cell line (IDE8) (Bastos *et al.*, 2009), representing a new source of material for vaccine development. Major surface proteins (MSPs) have been characterized in *A. marginale* (Palmer and McGuire, 1984; Tebele *et al.*, 1991). The molecular weight of MSP1a, encoded by the *msp1a* gene, varies among isolates of *A. marginale* due to the presence of a domain containing different numbers of tandem repeats (Allred *et al.*, 1990; de la Fuente *et al.*, 2007). Moreover, this protein is well conserved

within isolates and the sequence does not vary in persistently infected cattle, tick salivary glands or tick cell cultures (Barbet *et al.*, 1999). For these reasons the MSP1a protein is a useful tool to differentiate between isolates with different sequences and numbers of tandem repeats.

Studies suggest that in endemic areas different genotypes of *A. marginale* are maintained within a herd, although each host is infected with only one genotype (Palmer *et al.*, 2001; Almazán *et al.*, 2008). This phenomenon, described as ‘infection exclusion’, has been observed in naturally infected ticks, and also in cattle and cultured tick cells (de la Fuente *et al.* 2002; 2003a). However, superinfection with strains of *A. marginale* with markedly distinct genotypes occurred in naturally (Palmer *et al.*, 2004) and experimentally infected cattle (Leverich *et al.*, 2008).

In this research we rationalized whether an infection using a low pathogenicity isolate, as the one with appendage (UFMG1), could protect calves from being infected by a pathogenic *A. marginale* isolate (UFMG2). It was shown clinical protection despite of the absence of infection exclusion caused by simultaneously *A. marginale* isolates.

2. Materials and Methods

2.1. *Anaplasma marginale* isolates

Two *A. marginale* isolates from Minas Gerais State, Brazil were used in this study. *Anaplasma marginale* UFMG1, isolated from a naturally-infected calf (Ribeiro *et al.*, 1997), has an appendage and produces high peaks of rickettsemia in splenectomized animals without death. *Anaplasma marginale* UFMG2, isolated from a naturally-infected

calf in 2005, does not have an appendage and induces high morbidity and mortality in susceptible intact and splenectomized cattle. Both isolates have been stored cryopreserved in liquid nitrogen at the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). In order to generate sufficient quantities of blood stabilates, each isolate was inoculated into individual splenectomized calves; blood samples were collected into EDTA at peak rickettsemia and cryopreserved in liquid nitrogen using DMSO.

2.2. Tick cell cultures

The IDE8 cell line, originally derived from embryonic *Ixodes scapularis* ticks (Munderloh *et al.*, 1994), was maintained at the UFMG, following standard procedures. Confluent monolayers of IDE8 cells (passage 97) were infected with blood stabilate of *A. marginale* UFMG1 isolate as previously described (Bastos *et al.*, 2009). Infected IDE8 cells were maintained at 34°C with weekly medium changes. Four-week-old cultures containing approximately 2×10^7 *A. marginale* corpuscles were cryopreserved in liquid nitrogen with 6% DMSO until used for inoculations.

2.3. Experimental animals and infections

Fifteen Friesian male calves, with ages between one and 2 weeks and kept free of ticks and flies, were fed with powdered milk, commercial ration and water *ad libitum*. Before the start of the experiment, all calves were determined to be free of *A. marginale* infection by PCR.

Calves were randomly divided into three groups: calves in group 1 were inoculated intravenously with 1.8 ml containing approximately 3.6×10^7 corpuscles of *A. marginale* UFMG1 in IDE8 cells, which had been cryopreserved. Calves in group 2 were inoculated

intravenously with 1.2 ml of blood stabilate containing approximately 2×10^7 *A. marginale* UFMG1-infected erythrocytes, which had been also cryopreserved. Calves in group 3 were inoculated intravenously with 1.2 ml of saline and served as controls. After 75 days all calves received a new inoculation with 1.8 ml of blood stabilate, intravenously, containing 5×10^7 *A. marginale* UFMG2-infected erythrocytes.

Throughout the experimental period, all animals were clinically examined and monitored daily by measuring rectal temperature and packed cell volume (PCV) and examination of Giemsa-stained blood smear. In addition, EDTA blood samples were collected weekly for DNA extractions, which were carried out using the Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA). All the experimental procedures for this study were approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG), protocol number 41/2006.

2.4. Molecular analysis

The *msp1a* gene, coding for MSP1a, was amplified from DNA samples by PCR as described previously (de la Fuente *et al.*, 2001a). Ten pmol of each primer, MSP1aP (5-GCATTACAACGCAACGCTTGAG-3) and MSP1a3 (5-GCTTTACGCCGCCGCTTGCGCC-3) were used in a 50 µl-volume mixture (1.5 mM MgSO₄, 0.2 µM deoxynucleoside triphosphate, 5X avian myeloblastosis virus reverse transcriptase-*Thermus flavus* reaction buffer, 5 U of *Thermus flavus* DNA polymerase) using the Access RT-PCR system (Promega). Reactions were performed in a DNA thermo cycler Techne (Cambridge, UK) PCR machine (model TC-512) with the following cycling conditions: 5 minutes at 94°C and 35 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 64°C, and

2,5 minutes at 68°C, followed by 5 minutes at 68°C. Control samples with no DNA added were included in all experiments. PCR products were analyzed on 1% ethidium bromide (EtBr)-stained agarose gels to check the sizes of the amplified fragments by comparison to a DNA molecular weight marker.

PCR products from samples collected from animals in groups 1 and 2 on days 38, 75, 90, 104 and 116 after the first inoculation were analyzed by *Hind* III-restriction fragment length polymorphism (RFLP) assay (de la Fuente *et al.*, 2002). The same procedure was carried out for samples from group 3 (control) taken on days 90, 104 and 116. Five µl of each MSP1a PCR product was mixed with 0.5µl of *Hind* III (Fermentas) and incubated for 30 minutes at 37°C. The reaction mixture was analyzed on 1% EtBr-stained agarose gel as described above. MSP1a PCR samples were purified using the MultiScreen® PCRµ96 Plate (Millipore Corp.) and the DNA sequencing was performed at the Unidad de Biología Molecular of the Universidad de Alcalá Henares, Spain.

The *msp1a* sequences of both isolates, UFMG1 (Genbank accession number EU676176) and UFMG2 (Genbank accession number EU676175) were also analyzed.

2.5. Statistical analysis

Laboratory parameter comparisons among animal groups were carried out using *chi*-square test, with a 95.0% interval of confidence, based on Sampaio (2002).

3. Results

The identification of the *A. marginale* isolates in animal blood samples was based on the sequence of *msp1a* gene, which varies among different geographic isolates (de la Fuente *et*

al., 2007). Both isolates used in this work (UFMG1 and UFMG2) were characterized by sequencing and identification of typical nucleotide repeats in the MSP1a variable region, so samples collected from animals in the three groups could be compared throughout the experimental period. The UFMG1 MSP1a contains four tandem repeats (13-42-13-18), encoded by *msp1a*, while the UFMG2 MSP1a contains three repeats (13-27-27).

In the present study, the percentage of rickettsemia and decrease of PCV values were the two laboratory parameters considered to evaluate the development of clinical protection, in addition to clinical signs. After the UFMG1 inoculation, animals in groups 1 and 2 developed rickettsemia, resulting in reductions of PCV values between 55% and 64% when compared to controls (Table 1). However, these animals showed only mild clinical signs, with spontaneous recovery, and did not require any treatments. After the UFMG2 inoculation, none of the animals in groups 1 and 2 showed clinical signs, and the peak rickettsemias and decreases of PCV were significantly lower than after the first inoculation ($p < 0.05$). In contrast, animals in the control group showed a significantly greater reduction in PCV (71%) ($p < 0.05$), higher rickettsemias (15.6%) and a shorter prepatent period (13 days) after UFMG2 inoculation (Table 1). Moreover, three animals in the control group died with severe anaplasmosis.

The molecular analysis of *msp1a* genotypes showed that all animals in groups 1 and 2 had only the UFMG1 isolate up to day 75 after the UFMG1 inoculation by both sequence and RFLP analyses of PCR amplicons. As expected, all calves in the control group presented negative PCR results until day 75. Two weeks after the UFMG2 inoculation (day 90), animals in groups 1 and 2 remained showing the UFMG1 *msp1a* genotype, while at the same period animals in the control group showed only the UFMG2 *msp1a* genotype (Fig.

1). This was the only genotype identified in control animals until four weeks after the UFMG2 inoculation (day 104). However, at day 104, from 10 sequences of groups 1 and 2, two animals presented a new *msp1α* genotype (Figs. 1 and 2). Surprisingly, on day 116 only the new *msp1α* genotype was detected in animals of the three groups. This new genotype has high similarity to UFMG2 (99%) at the amino acid sequence level. The new *A. marginale msp1α* genotype retained the first repeat of the UFMG2 isolate but repeats 2 and 3 had an E x D amino acid change that resulted in different repeat sequences in the new genotype (Table 2).

4. Discussion

The control of bovine anaplasmosis remains a problem for the cattle industry in tropical and subtropical regions of the world. In countries where the *A. centrale* vaccine has not been approved, commercial alternatives for the immunoprophylaxis of bovine anaplasmosis do not exist (Kocan *et al.*, 2003). Therefore, the search for vaccines to efficiently control bovine anaplasmosis is a priority for the cattle industry worldwide.

In the experiments reported herein, animals that received the first *A. marginale* isolate (UFMG1) either as infected tick cells or as blood stabilates were protected against bovine anaplasmosis after the pathogenic UFMG2 inoculation. The protection against bovine anaplasmosis was confirmed by clinical and laboratorial parameters in comparison with control animals (group 3) that did not receive the UFMG1 inoculation and developed severe disease due to infection with the UFMG2 isolate.

These results represent the first step towards the development of an effective vaccine produced in cultured tick cells for the control of bovine anaplasmosis. A similar approach

has been proposed and tested in Mexico but they obtained protection against challenge with the vaccine isolate only, a result that would limit the application of the vaccine to areas where the homologous (vaccine) isolate is prevalent (Ocampo Espinoza *et al.*, 2006). The results obtained here suggest the possibility of using the UFMG1 isolate for vaccination against heterologous isolates, therefore supporting the use of the vaccine in areas where different *A. marginale* isolates exist as it is common in most endemic areas of the world (de la Fuente *et al.*, 2007). Most similar to the present study, the *A. centrale* strain is a low pathogenicity strain of *A. marginale* that is widely used as a vaccine in countries such as Argentina, Australia, Brazil, South Africa and Uruguay. However, field and laboratory failures of *A. centrale* vaccines have been reported (Revised by Kocan *et al.*, 2003) and an *A. marginale* strain of low pathogenicity conferring protection could become a good alternative to the development of effective vaccines.

Previous studies with experimentally and naturally *A. marginale*-infected cattle have indicated that animals become infected with only a single *msp1 α* genotype (Palmer *et al.*, 2001; de la Fuente *et al.*, 2002; de la Fuente *et al.*, 2003b). This infection-exclusion phenomenon has been described also in ticks and tick cells (de la Fuente *et al.*, 2002; de la Fuente *et al.*, 2003a). Furthermore, *Anaplasma ovis*-infected tick cultures excluded subsequent infections of two different isolates of *A. marginale*, suggesting that this phenomenon is maintained among *Anaplasma* species (de la Fuente *et al.*, 2002). However, a study identified five cattle carrying two strains of *A. marginale* with markedly distinct genotypes in a herd located in Kansas. The authors observed that the genotypes in individual animals belonged to different families, based on the sequence of the *msp1 α* repeats (Palmer *et al.*, 2004). A recent study indicates that a genetically distinct *A.*

marginale strain capable of superinfecting the mammalian host can also subsequently be cotransmitted and become established within the host population, despite the presence of an existing established strain (Leverich *et al.*, 2008).

The interaction among *A. marginale* isolates and the reasons to explain why some isolates may exclude others are unknown. The two *A. marginale* strains detected in five animals in a herd located in Kansas had genotypes of different families (Palmer *et al.*, 2004) and the distant relationship among the strains could explain the absence of infection-exclusion. The presence of different *msp1α* genotypes in an individual animal has later been associated with a totally different repertoire of *msp2* pseudogenes (Rodríguez *et al.*, 2005). Even though the strains of *A. marginale* used in the present study seem to have closely related *msp1α* genotypes, the infection-exclusion did not occur. Further studies should be carried out to characterize other proteins of these Brazilian isolates, as MSP2, considering that difference of a single *msp2* gene can allow superinfection with more than one strain (Futse *et al.*, 2008)

If the infection exclusion occurs between species of *Anaplasma*, the *A. centrale* infection should prevent a subsequently infection with *A. marginale*. However, within a region where the *A. marginale* is endemic, 64% of cattle that received *A. centrale* vaccine were naturally infected with *A. marginale*, becoming hosts of both organisms (Shkap *et al.*, 2002). Another study detected the concomitant infection of *A. marginale* and *A. central*, persisting for at least three months after the cross-inoculation in calves (Shkap *et al.*, 2008). The co-infection confirmed the previous findings (Shkap *et al.*, 2002) and the authors concluded that there is no infection exclusion between *A. centrale* and *A. marginale*. One more study

confirmed these results considering that *A. centrale* vaccinated animals were carrying *A. marginale* as result of a natural infection (Molad *et al.*, 2006).

The appearance of the new *A. marginale msp1a* genotype in all cattle infected with the UFMG2 isolate is difficult to explain. One possibility is the presence of low levels of this genotype in the original UFMG2 stock. However, the analysis of the UFMG2 original stock and blood samples collected 4 weeks after UFMG2 inoculation did not show the presence of the new genotype. Nevertheless, it is possible that the levels of the *A. marginale* new genotype increased to allow detection by PCR only after multiplication in infected cattle, a fact that may indicate a selective advantage of the new genotype.

Alternatively, these results may constitute the first example of MSP1a antigenic variation in infected cattle, a mechanism that could explain, at least in part the generation of *A. marginale* genetic diversity in endemic regions. Furthermore, this result suggested a new mechanism by which new *A. marginale* genotypes evolve in the absence of slipped-strand mispairing (de la Fuente *et al.*, 2001b). However, these results may be taken with caution as they could represent a unique situation derived from unknown factors that condition the relationship and evolution of *A. marginale* genotypes.

These results showed that there is no exclusion-infection although the protection against bovine anaplasmosis in cattle inoculated with the low pathogenicity UFMG1 isolate and challenged-infected with the pathogenic UFMG2 isolate. These results also suggested that more research is needed to study the generation and evolution of *A. marginale* genetic diversity and the interaction between *A. marginale* isolates in infected hosts.

Acknowledgements

This research was supported by FAPEMIG (Brazil), the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain (project BFU2008-01244/BMC) and scholarships provided by CAPES and CNPq. We thank Maria das Mercês Cota Vasconcelos (UFMG), Victoria Naranjo (IREC), Eliane Esteves (USP) and Lívio Martins Costa-Jr (UFMG) for technical assistance, and U. G. Munderloh for providing the IDE8 cells.

References

- Allred, D.R., McGuire, T.C., Palmer G.H., Leib, S.R., Harkins T.M., McElwain T.F., Barbet, A.F., 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.
- Almazán C., Medrano, C., Ortiz, M., de la Fuente, J., 2008. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains from an acute bovine anaplasmosis outbreak within a herd in an endemic area. Vet. Parasitol. 158: 103-109.
- Barbet, A.F., Blentlinger, R., Jooyoung Yi., Lundgren, A.M., Blouin, E.F., Kocan, K.M. 1999. Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture, tick salivary glands, and cattle. Infect. Immun., 67, 102-107.
- Bastos, C.V., Passos, L.M.F., Vasconcelos, M.M.C., Ribeiro, M.F.B., 2009. *In vitro* establishment and propagation of a Brazilian strain of *Anaplasma marginale* with appendage in IDE8 (*Ixodes scapularis*) cells. Braz. J. Microbiol. (in Press).

de la Fuente, J., Van Den Bussche, R.A., Kocan, K.M., 2001a. Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). *Vet. Parasitol.* 97:65–76.

de la Fuente, J., Garcia Garcia, J.C., Blouin, E.F., Rodríguez, S.D., Garcia, M.A., Kocan, K.M., 2001b. Evolution and function of tandem repeats in the major surface protein 1a of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Anim. Health Res. Rev.* v. 2, 163–173.

de la Fuente, J., García-García, J.C., Blouin, E.F., Saliki, J.T., Kocan, K.M., 2002. Infections of tick cells and bovine erythrocytes with one genotype of intracellular ehrlichia *Anaplasma marginale* excludes infection with other genotypes. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9:658-668.

de la Fuente, J., Blouin, E.F., Kocan, K.M., 2003a. Infection exclusion of rickettsial pathogen, *Anaplasma marginale*, in tick vector, *Dermacentor variabilis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10:182-184.

de la Fuente, J., Van Den Bussche, R.A., Prado, T.M., Kocan, K.M., 2003b. *Anaplasma marginale msp1a* genotypes evolved under positive selection pressure but are not markers for geographic isolates. *J. Clin. Microbiol.* 41:1609–1616.

de la Fuente, J., Passos, L.M., Van Den Bussche, R.A., Ribeiro, M.F., Facury-Filho, E.J., Kocan, K.M., 2004. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.* 121:307-316.

de la Fuente, J., Ruybal, P., Mtshali, M.S., Naranjo, V., Shuqing, L., Mangold, A.J., Rodríguez, S.D., Jiménez, R., Vicente, J., Moretta, R., Torina, A., Almazán, C., Mbat,

P.M., Torioni de Echaide, S., Farber, M., Rosario-Cruz, R., Gortazar, C., Kocan, K.M., 2007. Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. *Vet. Microbiol.* 119: 382-390.

Futse, J.E., Brayton, K.A., Dark, M.J., Knowles, D.P.Jr., Palmer, G.H. 2008. Superinfection as a driver of genomic diversification in antigenically variant pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:2123–2127.

Gonçalves-Ruiz, P.M., Passos, L.M.F., Martins, M.S., Patarroyo, J.H., Ribeiro, M.F.B., 2002. Antigenic characterization of morphologically distinct *Anaplasma marginale* isolates using a panel of monoclonal antibodies. *Vet. Parasitol.* 107:169–177.

Gonçalves-Ruiz, P.M., Passos, L.M.F, Ribeiro, M.F.B., 2005. Lack of infectivity of a Brazilian *Anaplasma marginale* isolate for *Boophilus microplus* ticks. *Vet. Parasitol.* 128:325-331.

Kocan, K.M., de la Fuente, J., Guglielmo, A.A., Meléndez, R.D. 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin. Microbiol. Rev.*16: 698-712.

Kuttler, K.L., Winnward, L.D. 1984. Serologic comparison of four *Anaplasma* isolates as measure by complement-fixation test. *Vet. Microbiol.*, 9, 181-186.

Leverich, C.K., Palmer G.H., Knowles Jr, D.P., Brayton, K.A. 2008. Tick-borne transmission of two genetically distinct *Anaplasma marginale* strains following superinfection of the mammalian reservoir host. *Infect. Immun.*, 76, 4066-4077.

Molad, T., Mazuz, M.L., Fleiderovitz, L., Fish, L., Savitskya, I., Krigel, Y., Leibovitz, B., Molloy, J., Jongejan, F., Shkap, V., 2006. Molecular and serological detection of *A. centrale* and *A. marginale*-infected cattle grazing within an endemic area. *Vet. Microbiol.* 113:55–62.

Munderloh, U.G., Blouin, E.F., Kocan, K.M., Ge, N.L., Edwards, W., Kurtti, T.J., 1996. Establishment of the tick (Acari: Ixodidae)-borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in tick cell culture. *J. Med. Entomol.* 33:656–664.

Ocampo Espinoza, V., Vázquez, J.E., Aguilar, M.D., Ortiz, M.A., Alarcón, G.J., Rodríguez S.D., 2006. *Anaplasma marginale*: lack of cross-protection between strains that share MSP1a variable region and MSP4. *Vet Microbiol.* 114:34-40.

Palmer, G.H., McGuire, T.C., 1984. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *J. Immunol.* 133:1010-1015.

Palmer, G.H., Rurangirwa, F.R., McElwain, T.F., 2001. Strain composition of the ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a mammalian reservoir for tick transmission. *J. Clin. Microbiol.* 39:631–635.

Palmer, G.H., Knowles, D., Rodríguez, J., Gnad, D., Hollis, L., Marston, T., Brayton, K., 2004. Stochastic transmission of multiple genotypically distinct *Anaplasma marginale* strains in a herd with high prevalence of *Anaplasma* infection. *J. Clin. Microb.* 42:5381-5384.

Ribeiro, M.F.B., Patarroyo, J.H., Santos, J.L., 1984. Epidemiologia da anaplasmoze bovina no estado de Minas Gerais. I. Prevalência de anticorpos aglutinantes e fluorescentes na Zona da Mata. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 36:425-432.

Ribeiro, M.F.B., Passos, L.M.F., Guimarães, A.M., 1997. Ultrastructure of *Anaplasma marginale* with an inclusion appendage, isolated in Minas Gerais State, Brazil. Vet. Parasitol. 70:271-277.

Rodríguez, S.J., Palmer, G.H, Knowles, D.P. Jr, Brayton, K.A, 2005. Distinctly different *msp2* pseudogene repertoires in *Anaplasma marginale* strains that are capable of superinfection. Gene. 361:127–132.

Sampaio I.B.M., 2002. Estatística aplicada à experimentação animal. FEPMVZ, Belo Horizonte, 265pp.

Shkap, V., Molad, T., Fish, L., Palmer, G.H., 2002. Detection of the *Anaplasma centrale* vaccine strain and specific differentiation from *Anaplasma marginale* in vaccinated and infected cattle. Parasitol. Res. 88:546–552.

Shkap, V., Leibovitz, B., Krigel, Y., Molad, T., Fish, L., Mazuz, M., Fleiderovitz, L., Savitsky, I., 2008. Concomitant infection of cattle with the vaccine strain *Anaplasma marginale* ss *centrale* and field strains of *A. marginale*. Vet. Microbiol. 130:277-284.

Figure 1: Dynamic of experimental *Anaplasma marginale* infections in cattle. The first UFMG1 inoculation was carried out on day zero (white arrow head) and the UFMG2 inoculation on day 75 (black arrow head). Only the UFMG1 genotype was presented in animals from groups 1 and 2, up to day 75 (A and B); only UFMG1 genotype was identified two weeks after the UFMG2 inoculation (day 90) (C); 4 weeks after the UFMG2 inoculation (day 104), animals in groups 1 and 2 showed either the UFMG1 genotype or a new *msp1a* genotype, while only the UFMG2 genotype was present in animals of group 3 (D); six weeks after the UFMG2 inoculation (day 116), all animals in groups 1, 2 and 3 had the new *msp1a* genotype (E).

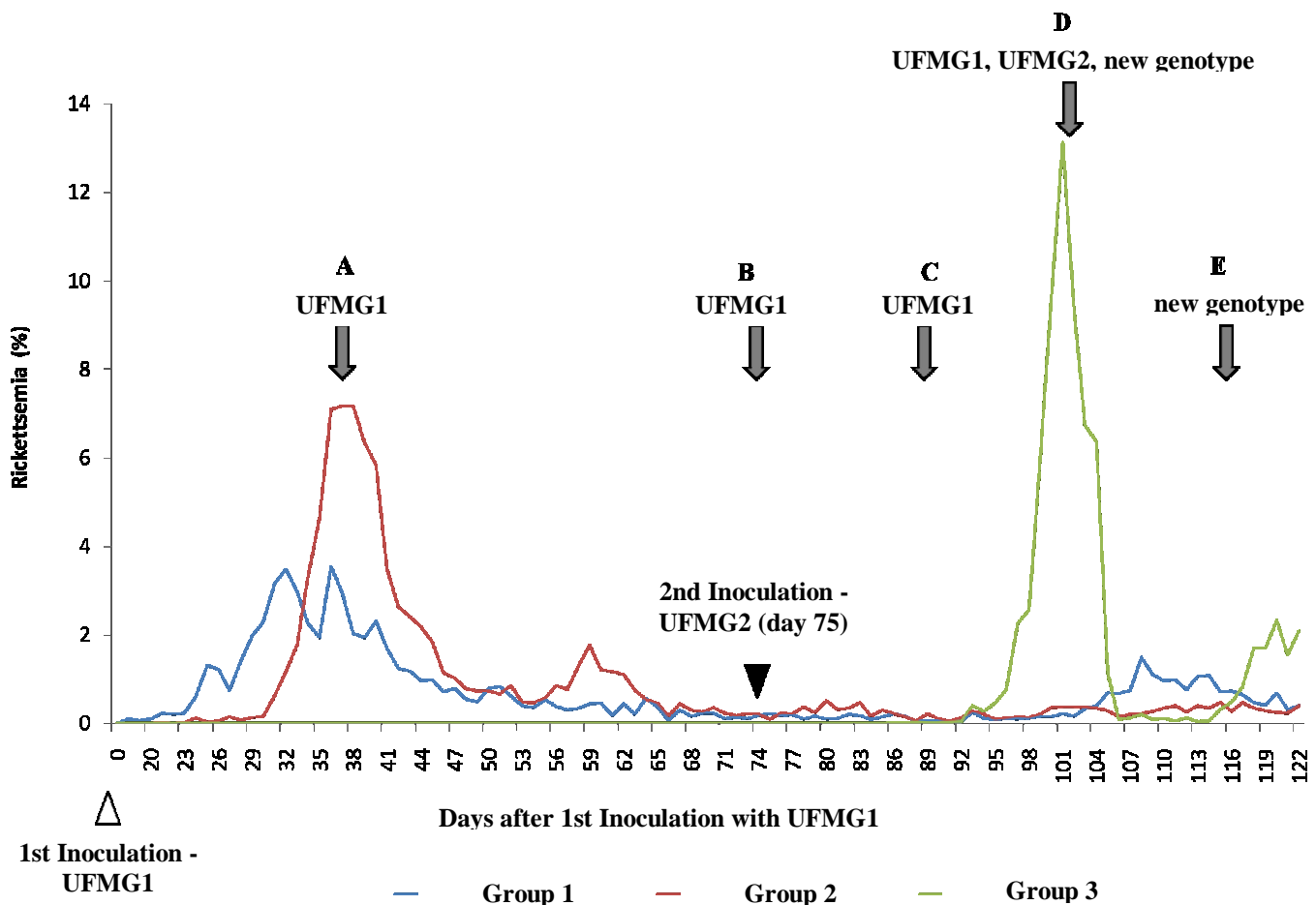


Figure 2. Identification of the *m*sp1 α genotype of UFMG1, UFMG2 and the new genotype by PCR (lines 1, 3 and 5, respectively) and *Hind* III-RFLP (lines 2, 4 and 6, respectively).

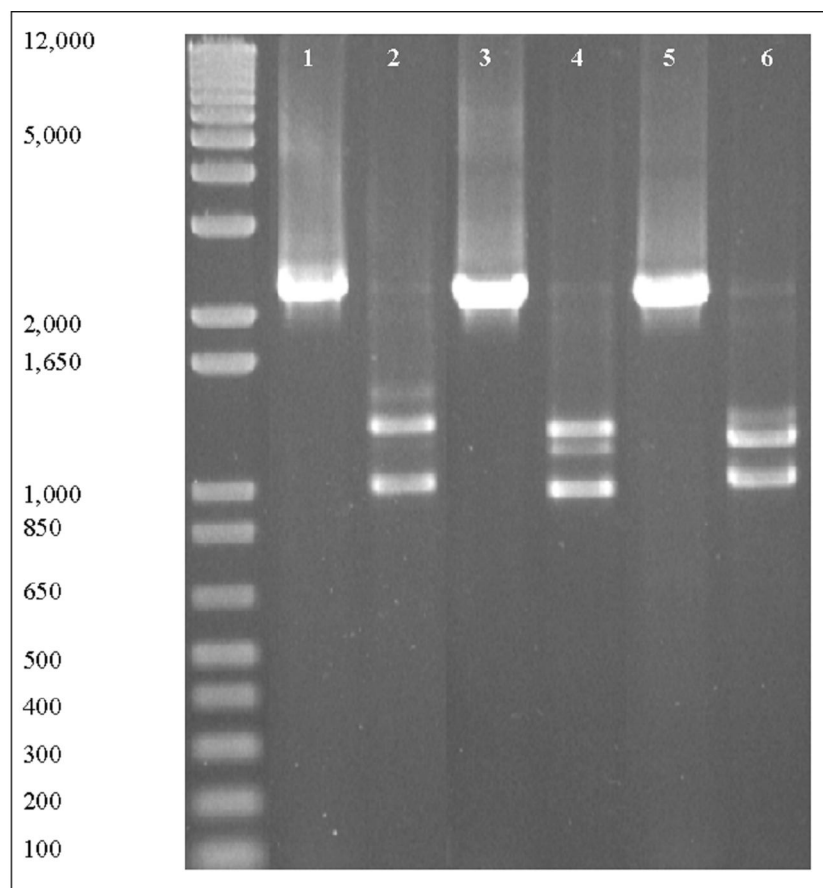


Table 1. Means and standard errors of clinical and laboratory parameters of cattle after inoculation with a low pathogenicity isolate UFMG1 and inoculation with a high pathogenicity isolate UFMG2 of *A. marginale*. PCV reduction was determined with respect to the controls. Peak rickettsemia was expressed as percent infected erythrocytes.

	Groups		
First inoculation (UFMG1 isolate)	1	2	3 (Control)
PCV (%) (Day 0)	34 ±8	35±6	33±4
PCV reduction (%)	55±5	63±3	-
Prepatent period (days)	20±1	24±3	-
Peak rickettsemia (%)	5±4	10±2	-
Treatment/total number (%)	0/5 (0)	0/5 (0)	-
Re-inoculation (UFMG2 isolate)	1	2	3 (Control)
PCV (%) (Day 75)	29±5	26±4	35±3
PCV reduction (%)	28	15	71±1
Prepatent period (days)	-	-	13±2
Peak rickettsemia (%)	2±1	1±1	16±3
Death/total number	0/5 (0)	0/5 (0)	3/5 (60)

Table 2. MSP1a repeat sequence comparison between UFMG2 isolate and the new genotype of *A. marginale*. The MSP1a tandem repeats were numbered after de la Fuente *et al.* (2007) and Ruybal *et al.*, unpublished.

<i>A. marginale</i> genotype	Encoded sequence	Repeat No.
	DDSSASGQQQESSVSSQSE-ASTSSQLG--	A
UFMG2	T*****L***DQ***** A*****L***DQ***** A*****L***DQ*****	13 27 27
New genotype	T*****L***DQ***** AE*****L***DQ***** AE*****L***DQ*****	13 54 54

5.3) Estudo da resposta imune celular na infecção e re-infecção experimental de bovinos com isolados heterólogos de *Anaplasma marginale*

BASTOS C.V.¹, PASSOS L.M.F.^{2,3}, FACURY-FILHO E.J.⁴, RIBEIRO M.F.B.^{1*}

1. Departamento de Parasitologia, ICB–UFMG, C.P.486, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil.

2. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária – UFMG

3. Institute for Comparative Tropical Medicine and Parasitology, LMU, Munich, Germany.

4. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária – UFMG

*Corresponding Author: Tel: +55 31 3409-2842 Fax: +55 31 3409-2970

E-mail address: muciobr@icb.ufmg.br (M.F.B. Ribeiro)

Não submetido

Resumo

A anaplasmosose é uma importante doença causada pela rickettsia *A. marginale* afetando ruminantes em todo o mundo, incluindo os da América do Sul. No presente estudo, variações de linfócitos TCD4+, citocinas produzidas IL-4 e INF γ e linfócitos B (CD21+) foram avaliadas, por meio de imunofenotipagem, do sangue total de bovinos experimentalmente inoculados com isolado de *A. marginale* de baixa patogenicidade (UFMG1) e posteriormente desafiados com um isolado de alta patogenicidade (UFMG2). Os animais pré-inoculados com isolado UFMG1 apresentaram resposta mais efetiva, predominantemente Th1, quando comparados com o grupo controle, inoculado apenas com

isolado UFMG2 e que teve morte de 60% dos seus animais. O presente trabalho demonstra que animais imunizados e desafiados com isolados brasileiros heterólogos de *A. marginale* desenvolveram uma resposta imune celular eficiente.

Palavras-chaves: Linfócitos T CD4+, INF γ , IL-4, Linfócitos B CD21, *Anaplasma marginale*.

1. Introdução

A anaplasmoze bovina é uma doença infecciosa causada pela rickétisia *Anaplasma marginale*, caracterizada pelo desenvolvimento de anemia hemolítica progressiva. Na América Latina, esta enfermidade causa impacto econômico significativo devido à elevada morbidade, mortalidade e redução na produção de carne e leite (Montenegro-James, 1992; Harrus e Baneth, 2005).

A resposta protetora contra *A. marginale* depende da indução de imunidade humoral e celular. Apesar da importância dos anticorpos na proteção contra *A. marginale*, estes não são capazes isoladamente de proteger os animais do agente da anaplasmoze (Brown *et al.*, 2001). Em infecções intracelulares, a participação da resposta mediada por células geralmente envolve macrófagos, células *natural killer* (NK) e linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1) (revisado por Garfias *et al.*, 2003). Linfócitos Th1, quando estimulados, produzem interferon gama (INF γ), citocina que participa da ativação de macrófagos, aumentando a produção de óxido nítrico, substância tóxica para rickétssias (Palmer *et al.*, 1999). A produção de INF γ também estimula a expressão de receptores e fusão de fagossomos e lisossomos (Brown *et al.*, 1998b). Durante a ativação de células B, a presença de INF γ

promove a mudança de isotipo para IgG2. Esta subclasse de imunoglobulina está associada ao aumento da atividade de fagocitose do material opsonizado (Estes *et al.*, 1994).

Palmer *et al.* (1999) enfatizaram a necessidade de identificação de mecanismos imunológicos efetores envolvidos no controle de *A. marginale*, bem como seus epitopos alvos, com o objetivo de desenvolver uma vacina estável e segura. A imunofenotipagem é uma metodologia que pode auxiliar neste tipo de pesquisa, pois permite a análise de populações de células sanguíneas distintas, identificadas a partir da expressão de antígenos de superfície específicos marcados com anticorpos fluorescentes (Roitt *et al.*, 1999).

Este trabalho analisa alterações na cinética de linfócitos B e linfócitos TCD4+, bem como a proporção de células CD4+ que produzem IL-4 ou INF γ em amostras sanguíneas de bovinos que desenvolveram proteção clínica contra um isolado altamente patogênico de *A. marginale* após serem previamente infectados com outro isolado de baixa patogenicidade.

2. Material e Métodos

2.1 Isolados de *Anaplasma marginale*

Dois isolados de *A. marginale* de Minas Gerais, Brasil foram usados neste estudo. O isolado UFMG1 (número de acesso no *GenBank* EU676176), obtido de um bezerro naturalmente infectado (Ribeiro *et al.*, 1997), possui apêndice e produz altos picos de ricketsemia em bezerros esplenectomizados sem levá-los à morte. O isolado UFMG2 (número de acesso no *GenBank* EU676175), não possui apêndice e induz a alta mortalidade de bezerros esplenectomizados ou não (Ribeiro, 2005 – Comunicação Pessoal). Ambos os isolados estão armazenados em nitrogênio líquido na Universidade Federal de Minas Gerais

(UFMG) utilizando solução de DMSO como crioconservante. No início do experimento, os isolados foram inoculados intravenosamente em bezerros esplenectomizados, livres de hemoparasitos e ectoparasitos, que, após atingirem alto pico de ricketsemia, tiveram amostras de sangue colhidas em tubos com EDTA e criopreservadas com DMSO (10%) em nitrogênio líquido.

O isolado UFMG1 foi mantido também em cultivo em células de carrapato IDE8, conforme Bastos *et al.* (2009) e as células infectadas foram criopreservadas em solução com DMSO (6%) em nitrogênio líquido.

2.2 Infecções experimentais

Quinze bezerros holandeses machos com idades entre uma e duas semanas de vida foram mantidos livres de carrapatos e moscas, alimentados com leite em pó, ração comercial e água *ad libitum*. Cinco bezerros (Grupo 1) receberam, por via intravenosa, 1,8 ml de cultivo de células de carrapatos IDE8 contendo aproximadamente $3,6 \times 10^7$ corpúsculos do isolado UFMG1 de *A. marginale*. Outros cinco animais (Grupo 2) foram inoculados intravenosamente com 1,2 ml de sangue contendo aproximadamente 2×10^7 eritrócitos infectados também com o isolado UFMG1 de *A. marginale*. O grupo 3, composto de cinco animais, recebeu 1,2 ml de solução salina, constituindo o Grupo controle. Após 75 dias das primeiras inoculações, todos os grupos receberam por via intravenosa 1,8 ml de sangue contendo 5×10^7 eritrócitos infectados com o isolado UFMG2 de *A. marginale*.

Os animais foram acompanhados diariamente por temperatura retal, exames clínicos e laboratoriais, como volume globular (VG) e ricketsemia.

Os procedimentos experimentais deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG – N° Protocolo 41/2006).

2.3 Avaliação de imunidade celular

Para avaliação da ativação de linfócitos, alíquotas de 10 ml de sangue foram colhidas em tubos heparinizados aos 0, 38, 46, 53, 60, 67, 94, 102, 109 e 116 dias após a inoculação primária e processadas para análise em citometria de fluxo realizada de acordo com Reis (2001), com algumas modificações.

Resumidamente, alíquotas de 500 µl sangue total de cada animal em cada ponto de coleta foram incubadas com 500 µl de meio de cultura RPMI-1640 contendo 10 µl de Brefeldina-A (BFA) (1mg/ml) por quatro horas, em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Para estimular a produção de citocinas, as culturas foram incubadas, em duplicatas, com 25 µl de Phorbol Myristate Acetate (PMA) (25ng/ml) e 1 µl de Ionomicina (1ng/ml). Ao final da incubação, 110 µl de EDTA (20nM) foram acrescentadas às amostras e estas novamente incubadas por mais 15 min.

Ao final da incubação foi adicionado 6ml de PBS-W (PBS 0,015 M pH 7,4 contendo 0,5% de SFB e 0,1% de azida sódica) a cada frasco de cultura e o conteúdo foi centrifugado a 600g por 10 min. a 18°C. O sedimento celular foi ressuspenso em 400µl de PBS-W e 15µl de anticorpos anti-CD4 bovino (1:240 – Serotec) ou anti-CD21 bovino (1:200 – Serotec), conjugados a Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), foram adicionados às suspensões. As amostras foram incubadas por 30 min., à temperatura ambiente (T.A.) e ao abrigo da luz. Posteriormente, 3ml de solução de lise eritrocitária (BD Facs™ Lise Solution - BD) foram adicionados a cada amostra e estas incubadas por 10 min. à T.A., ao abrigo da

luz. Em seguida, as amostras contendo anticorpos anti-CD4 foram centrifugadas a 600g por 10 min. a 18°C, o sobrenadante aspirado, as células ressuspensas em 0,5ml de PBS-W e o volume completado com 3ml de PBS-P (PBS 0,015 M pH 7,4 contendo 0,5% de SFB, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina). Após incubação por 10 min. à T.A. ao abrigo da luz, a suspensão de células foi lavada por duas vezes e o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 40µl de PBS-W. Para cada amostra de suspensão celular foram adicionados 20µl dos anticorpos monoclonais anti- $\text{INF}\gamma$ ou anti-IL-4 conjugados com Ficoeritrina (PE) incubando-se por 30 min., à T.A., ao abrigo da luz. Posteriormente, as amostras foram lavadas com 120µl de PBS-P e todas ressuspensas em 200µl de PBS-W para realização das leituras.

As soluções celulares foram analisadas em citômetro de fluxo (FACSCalibur – Becton Dickinson USA). A identificação das populações celulares de linfócitos, bem como a determinação do valor percentual de populações e subpopulações celulares, foram realizadas em computador acoplado ao citômetro, utilizando-se o programa Cell-Quest.

2.4 Análise estatística

Os cálculos estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do software Prism 5.0, sendo utilizado o teste de *Kolmogorov-Smirnov* (KS), para conferência de normalidade, seguido da análise de variância (ANOVA) com correção do teste de *Bonferroni*, que realiza comparação em pares com intervalo de confiança de 95%. Foi também utilizado o teste de *t* de Student para comparações entre dois parâmetros.

3. Resultados

Os animais do Grupo 1 apresentaram ricketsemia de *A. marginale* (isolado UFMG1) atingindo seu ponto máximo (5,4%) no dia 32 pós-infecção (pi), enquanto que, no Grupo 2 o pico foi de 10,4% ocorrendo no dia 37 pi (Figura 1). As reduções máximas no percentual de VG foram de 55% e 63%, respectivamente, entretanto, todos os animais recuperaram os valores normais de volume globular sem necessidade de medicação (Figura 2). O Grupo 3, controle, se manteve livre de *A. marginale* até o dia da inoculação com o isolado UFMG2 (dia 75).

Após o desafio com o isolado altamente patogênico, os animais do Grupo 3 apresentaram ricketsemia de 16% (dia 102 pi), redução máxima de VG de 71% e três dos cinco animais vieram a óbito. Os animais dos Grupos 1 e 2 apresentaram aumento discreto da ricketsemia (2% e 1%, respectivamente) após desafio com UFMG2, aproximadamente entre os dias 105 e 116 pi. Quanto ao volume globular, os grupos 1 e 2 apresentaram pequena redução após o desafio, sem mortalidade. A dinâmica da ricketsemia e do VG dos três grupos ao longo das duas inoculações pode ser observada nas Figuras 1 e 2.

Após inoculação com o isolado UFMG1, os percentuais de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-4 no sangue periférico dos animais dos Grupos 1, 2 e 3 (sendo o Grupo 3 inoculado com salina) não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). O desafio dos animais dos diferentes grupos experimentais com o isolado UFMG2 resultou em discreto aumento da proporção de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-4 no sangue dos animais do Grupo 3 no dia 102, enquanto que, nos animais dos Grupos 1 e 2, o percentual desta população manteve-se relativamente estável até o final do experimento, dia 116 (Figura 3). Esta elevação de células CD4⁺ foi temporalmente relacionada com o pico de ricketsemia provocada por UFMG2.

Quanto aos linfócitos T CD4⁺ produtores de INF γ , foi verificado que os animais dos Grupos 1 e 2 apresentaram proporção aumentada destas células no sangue periférico durante a fase de elevação da ricketsemia por UFMG1 (46 dias pi), porém as diferenças não foram significativas ($p>0,05$). Após serem desafiados com o isolado UFMG2, os animais do Grupo 2 apresentaram elevação significativa da proporção de CD4⁺ INF γ no dia 116 em relação aos dias 0 e 38 ($p<0,05$). Os animais do Grupo 3 apresentaram valores significativamente maiores no dia 102 em relação ao dia 38, coincidindo com o pico de ricketsemia deste grupo ($p<0,05$) (Figura 4).

A razão entre linfócitos T CD4⁺ produtores de INF γ e produtores de IL-4 não alterou significativamente ($p>0,05$) entre os Grupos e tempos experimentais, porém os animais do Grupo 1 apresentaram aumento da razão INF γ /IL-4 no dia 67 até atingir pico no dia 109, já depois do desafio. Animais do Grupo 2 apresentaram pico da razão INF γ /IL-4 no dia 67, ainda antes do desafio, mantendo-se alto o nível de INF γ /IL-4 com novo pico, porém menor, no dia 116. Animais do Grupo 3 apresentaram razão entre INF γ e IL-4 estável após inoculação com solução salina, porém houve aumento desta proporção a partir do dia 94, atingindo pico no dia 102, discreta queda no dia 109 e novo pico, maior, no dia 116.

Houve aumento significativo na proporção de células CD21⁺ ($p<0,05$) no dia 38 nos animais dos Grupos 1 e 2, coincidente com o aumento da ricketsemia. Os níveis de CD21 mantiveram-se altos durante o período experimental, com elevação significativa ($p<0,05$) aos 116 dias, quando houve novo aumento da ricketsemia. O Grupo 3 apresentou elevação progressiva de linfócitos B após o dia 94, sendo significativamente maior no dia 116 ($p<0,05$) (Figura 6).

4. Discussão

Patógenos intracelulares são eliminados somente pela modificação ou destruição da célula hospedeira. Linfócitos T CD8+, ativados em ambiente Th1, se diferenciam em linfócitos citotóxicos, sendo capazes de matar células alvos que apresentam peptídeos antigênicos do patógeno na superfície celular por meio do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) de classe I (Wang *et al.*, 2001). Entretanto, *A. marginale* é um patógeno intracelular obrigatório, infectando apenas eritrócitos, que são incapazes de apresentar moléculas pelo MHC de classe I ou II necessários para destruição da célula infectada por linfócito T CD8+. Por esta razão, linfócitos T CD8+ recebem pouco destaque em estudos imunológicos de anaplasnose.

Brown *et al.* (1998a) demonstraram, em infecções em bovinos, que a comparação relativa dos níveis de IL-4, citocina de resposta Th2, e INF γ , citocina de resposta Th1, pode indicar o predomínio de resposta do tipo 1 ou 2, respectivamente. Isto permite que o paradigma Th1/Th2 possa ser aplicado em ruminantes no caso de estudos que quantificam estas citocinas (Meeus, 2002).

No presente estudo, as populações de CD4+ não apresentaram diferença entre os grupos imunizados e o grupo controle indicando uma provável relocação destes linfócitos para órgãos linfóides secundários, como baço e linfonodos, estimulada por células apresentadoras de antígenos. O mesmo evento foi observado em estudo realizado com imunização e desafio com amostras homólogas de *A. marginale* no México (Garfias *et al.*, 2003). O isolado UFMG1 estimulou uma resposta imune celular discreta nas infecções primárias nos animais dos Grupos 1 e 2, enquanto que o isolado UFMG2 estimulou uma

resposta exacerbada, nos animais do Grupo 3, os quais foram infectados pela primeira vez com este isolado. Apesar do isolado UFMG2 ter produzido resposta imune mais evidente, esta parece ter sido pouco efetiva, pois os animais do Grupo 3 apresentaram sinais clínicos severos e 60% (3/5) de mortalidade, contrastando com os animais previamente imunizados com o isolado UFMG1.

Em relação à citocina IL-4, podemos observar que os animais imunizados com UFMG1 (Grupos 1 e 2), apresentaram elevação de IL-4 ao serem desafiados com o isolado UFMG2 e mantiveram a resposta Th2 mais constante até o final do experimento. O Grupo 3 também apresentou elevação dos níveis de IL-4 coincidindo com o pico de ricketsemia por UFMG2, porém o nível desta citocina não se manteve.

A proporção de linfócitos T CD4⁺/INF γ no sangue dos animais do Grupo 1 e 2 cresceu no período da ricketsemia de UFMG1, sendo ainda maior após a inoculação com o isolado heterólogo UFMG2. Esta mesma dinâmica foi observada por Garfias *et al.* (2003), os quais verificaram crescentes níveis de INF γ após a primeira infecção, atingindo níveis máximos após a reinfecção com amostra homóloga. Apesar dos isolados UFMG1 e UFMG2 serem heterólogos, houve aumento da proporção de células que produzem INF γ após o desafio com aparente proteção dos animais previamente imunizados. A queda do INF γ nos animais do Grupo 3, aproximadamente no dia 109, sugere comprometimento da manutenção de uma resposta imune efetiva ou evasão do parasito.

A proporção de linfócitos T CD4⁺ produtores de INF γ em relação aos produtores de IL-4 é de aproximadamente 1:1 ao longo da infecção primária com UFMG1. A partir do dia 67, esta proporção aumenta, mostrando uma resposta predominantemente Th1, principalmente

nos animais dos Grupos 1 e 2 após a infecção do isolado UFMG2. Esse achado confirma que UFMG1 é pouco imunogênico. Isto reforça também que, linfócitos CD4⁺ são importantes na resposta imune de *A. marginale* produzindo INF γ , que amplifica a síntese de IgG2 e a concomitante ativação de macrófagos, responsáveis pela fagocitose, fusão do fagolisossomo e produção de óxido nítrico para a destruição intracelular do parasito (Palmer *et al.*, 1999). A proteção contra *A. marginale* requer indução de opsonização por IgG2 contra epitopos da membrana de superfície (McGuire *et al.*, 1979), coordenada com ativação de macrófagos para fagocitose e destruição da rickétsia (Palmer e McElwain, 1995).

A proporção de linfócitos B (CD21⁺) se mostrou crescente durante a infecção com o isolado UFMG1 e atingiu pico após desafio com o UFMG2, sugerindo uma intensa estimulação da resposta humoral. A participação de anticorpos na resposta protetora de animais infectados por *A. marginale* é controversa (Brown *et al.*, 2001). A transferência de altos níveis de anticorpos contra esta rickétsia não foi capaz de alterar a infecção ou o curso desta (Gale *et al.*, 1992). Entretanto, em outros modelos de infecções intracelulares, a produção de anticorpos específicos pode neutralizar o patógeno impedindo a transferência de uma célula para outra, controlando sua expansão. Além disto, patógenos opsonizados ativam a fagocitose e a fusão do fagosomo e do lisosomo (Li *et al.*, 2002). No caso de *A. marginale*, existe evidências de que a indução de IgG2 participe no processo de neutralização da infectividade de corpúsculos iniciais (Tuo *et al.*, 2000). Especula-se que IgG2 possa ter participação no seu presente trabalho, considerando-se o aumento da proporção de CD21⁺ e INF γ .

Na patofisiologia da anemia desenvolvida na anaplasnose, considera-se o envolvimento do sistema imune. Tem sido constatado aumento dos títulos de IgM e IgG coincidindo com os picos de anemia (Morris *et al.*, 1971). Giardina *et al.* (1993) demonstraram que soros de vacas infectadas com *A. marginale* reagiram com a membrana de eritrócitos bovinos infectados com *A. marginale*, mas também com eritrócitos não infectados. Os autores propõem que, durante seu ciclo, o *A. marginale* causa modificações estruturais e bioquímicas na membrana plasmática dos eritrócitos, o que explicaria a fagocitose como resposta imune contra as próprias células. Meléndez (2005) também comprovou que eritrofagocitose em bovinos infectados com *A. marginale* ocorre por um mecanismo anticorpo-dependente. Soros de animais imunizados contra a rickettsia também aumentam o processo de fagocitose em testes *in vitro*. Em animais com anaplasnose observa-se aumento de oito a dez vezes na taxa de fagocitose de células infectadas e não infectadas, ocasionando a anemia (Erp e Fahrney, 1976; Kocan *et al.*, 2000).

Ambos os isolados UFMG1 e UFMG2 foram responsáveis por queda de VG nos animais em suas infecções primárias. A ausência de sintomatologia e de anemia nos animais dos Grupos 1 e 2 após desafio com UFMG2 provavelmente se deve ao controle da ricketsemia pela resposta mais eficiente previamente adquirida na inoculação do isolado UFMG1. A maior imunopatologia gerada pelo isolado UFMG2 no Grupo 3 levou os animais a apresentarem alta ricketsemia e anemia severa (fatal para 60% dos animais). Não foi possível neste trabalho comprovar o papel dos anticorpos na anemia observada no Grupo 3, entretanto, IgG1 e IgG2, provavelmente geradas pela inoculação de UFMG2, podem ter contribuído para a ocorrência de uma anemia auto-imune.

Os dados apresentados no presente experimento mostraram a proteção conferida a bovinos inoculados com isolado de *A. marginale* de baixa patogenicidade (UFMG1) e re-infectados com isolado heterólogo (UFMG2) de alta patogenicidade. A resposta imune, predominantemente Th1, contra UFMG2 foi mais efetiva após a imunização com o isolado de baixa patogenicidade UFMG1, sendo destacada a secreção de INF γ , citocina com papel fundamental na proteção de animais desafiados com isolados homólogos e heterólogos.

Agradecimentos

O presente trabalho foi financiado pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Bolsa de Doutorado). Agradecemos a Dra. Simone Magela Moreira, Dr. Evaldo Nascimento e Maria das Mercês Cota Vasconcelos pelo apoio técnico.

Referências

Bastos, C.V.; Passos, L.M.F.; Vasconcelos, M.M.C.; Ribeiro, M.F.B. *In vitro* establishment and propagation of a Brazilian strain of *Anaplasma marginale* with appendage in IDE8 (*Ixodes scapularis*) cells. **Braz. J. Parasitol.** v. 40, p. 399-403, 2009.

Brown, W.C.; Rice-Ficht, A.C.; Estes, D.M. Bovine type 1 and type 2 responses **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 63, p. 45-55, 1998a.

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. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 5406-5413, 1998b.

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. *Infect. Immun.*, v. 69, p. 6853-6862, 2001.

Erp, E.; Fahrney, D. Changes in serum concentration of phagocytosis-stimulating factor in experimental induce bovine anaplasmosis: preliminary findings. *Am. J. Vet. Res.*, v. 37, p. 607-609, 1976.

Estes, D.M.; Closser, N.M.; Allen, G.K. IFN-gamma stimulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti-mu and mitogen. *Cell Immunol.*, v.154, p. 287-295, 1994.

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 *Parasitol. Res.*, v.78, p. 410-415, 1992.

Garfias, C.R.B.; Alva, G.P.; Azoulay, Y.R.; Fernández, J.O. Study of the humoral and cellular immune response in the experimental infection and reinfection of bovines with *Anaplasma marginale*. *Vet. Méx.*, v. 34, p. 248-259, 2003.

Giardina, S.; Aso, P.M.; Bretaña A. Antigen recognition on *Anaplasma marginale* and bovine erythrocytes: an electron microscopy study. *Vet. Immun. Immunopathol.*, v. 38, p. 181-191, 1993.

Harrus, S.; Baneth, G. Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. *Int. J. Parasitol.*, v. 35, n.11-12, p. 1309-1318, 2005.

Kocan, K.M.; Blouin, E.F.; Barbet, A.F. Anaplasmosis control: past, present and future. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 916, p. 501-509, 2000.

Li, J.S.; Chu, F.; Reilly, A.; Winslow, G.M. Antibodies highly effective in SCID mice during infection by the intracellular bacterium *Ehrlichia chaffeensis* are of picomolar affinity and exhibit preferential epitope and isotype utilization. *J. Immunol.*, v. 169, p. 1419-1425, 2002.

McGuire, T.C.; Musoke, A.J.; Kurtti, T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils, and skin. *Immunol.*, v. 38, p. 249–256, 1979.

Meeus, P.F.M. Genetic variation of the major surface protein 3 in *Anaplasma marginale*. University of Florida, 2002 (Thesis).

Meléndez, R.D. Phagocytosis of *Anaplasma marginale* infected and uninfected erythrocytes by bovine peripheral blood leucocytes. *Rev. Cient FCV-LUZ*, v.15, p. 305-309, 2005.

Montenegro-James, S. Prevalence and control of babesiosis in the Americas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 87, Suppl 3, p. 27-36, 1992.

Morris, H.; Ristic, M.; Lyckins, J. Characterization of opsonins eluted from erythrocytes of cattle infected with *Anaplasma marginale*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 32, p. 1221-1228, 1971.

Palmer, G.H.; McElwain, T.F. Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Vet. Parasitol.*, v. 57, p.233–253, 1995.

Palmer G.H.; Rurangirwa F.R.; Kocan K.M.; Brown W.C. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitol. Today* v.15, p. 281-286, 1999.

Reis, A.B. Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção. 2001. 176p. (Tese, Doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte

Ribeiro, M.F.B., Passos, L.M.F., Guimarães, A.M., Ultrastructure of *Anaplasma marginale* with an inclusion appendage, isolated in Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.70, p. 271-277, 1997.

Roitt, M. I.; Brostoff, J.; Male, K. D. **Imunologia**. São Paulo: Manole, 1999. 424p.

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*. *Infect Immun.*, v.68, p.270-280, 2000.

Wang, B.; Norbury, C.C.; Greenwood, R.; Bennink, J.R.; Yewdell, J.W.; Frelinger, J.A. Multiple paths for activation of naive CD8⁺ T cells: CD4-independent help *J. Immunol.*, v. 167, p. 1283-1289, 2001.

Figura 1: Dinâmica da média de ricketsemia de *Anaplasma marginale* em bovinos inoculados com isolado UFMG1 (baixa patogenicidade) produzido *in vitro* (Grupo 1) ou *in vivo* (Grupo 2) e posteriormente desafiados (dia 75) com o isolado UFMG2 (alta patogenicidade) produzido *in vivo*. Um terceiro grupo (controle) foi desafiado com o isolado UFMG2 sem inoculação prévia com o isolado UFMG1.

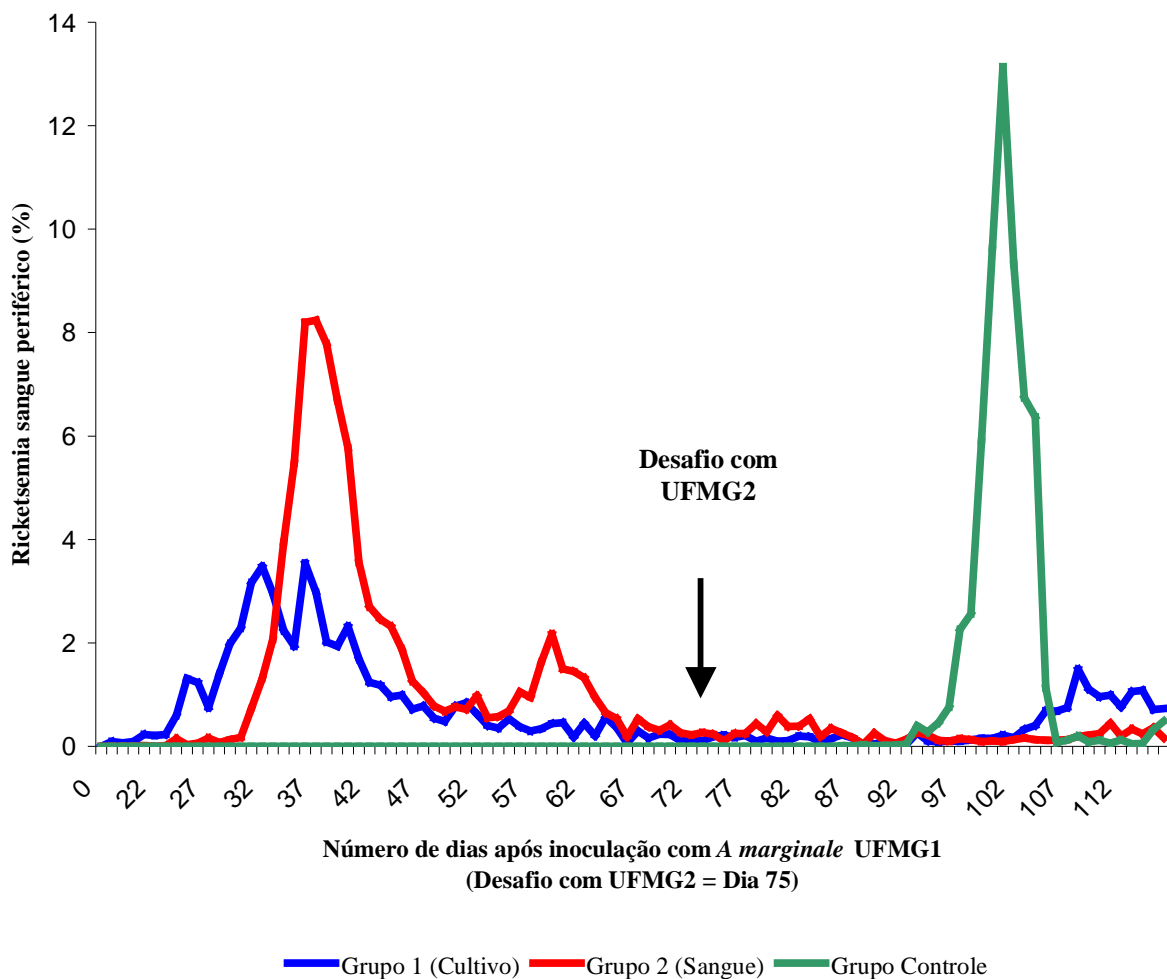


Figura 2: Dinâmica da média do volume globular (VG) em bovinos inoculados com *Anaplasma marginale*, isolado UFMG1 (baixa patogenicidade) produzido *in vitro* (Grupo 1) ou *in vivo* (Grupo 2) e posteriormente desafiados (dia 75) com o isolado UFMG2 (alta patogenicidade) produzido *in vivo*. Um terceiro grupo (controle) foi desafiado com o isolado UFMG2 sem inoculação prévia com o isolado UFMG1.

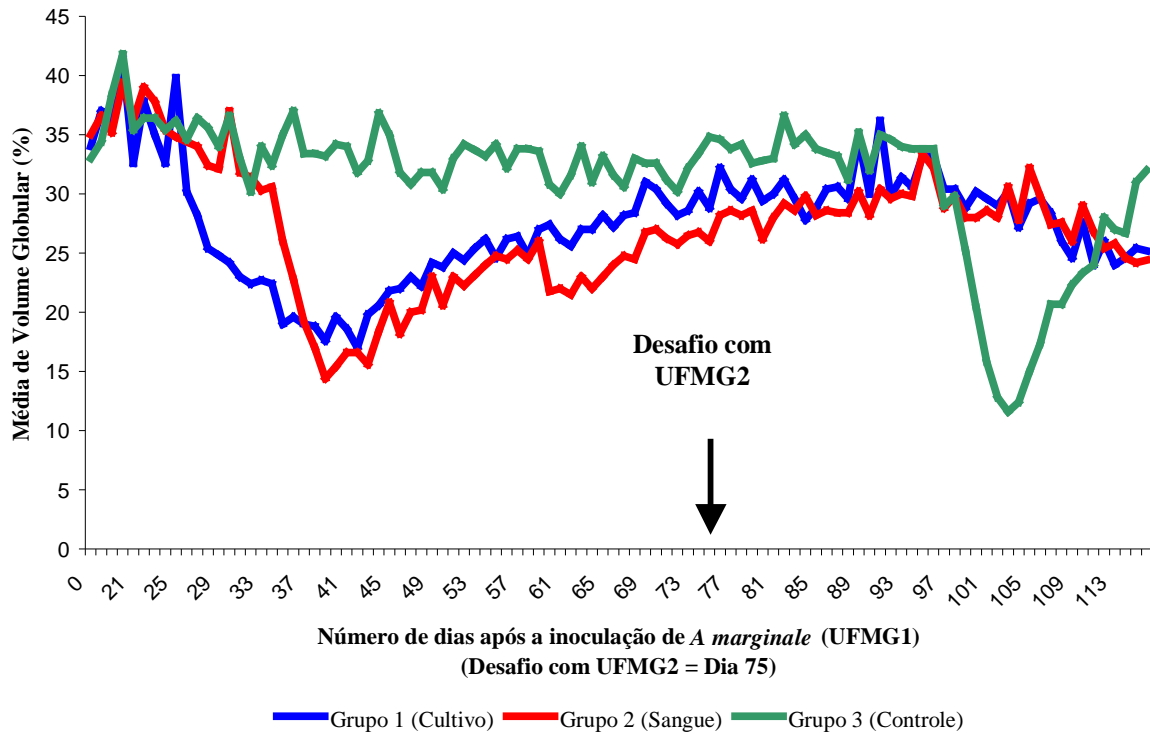


Figura 3: Percentual de Linfócitos CD4+/IL-4 em bovinos infectados com *Anaplasma marginale* (isolado UFMG1) e re-infectados no dia 75 com *A. marginale* (isolado UFMG2).

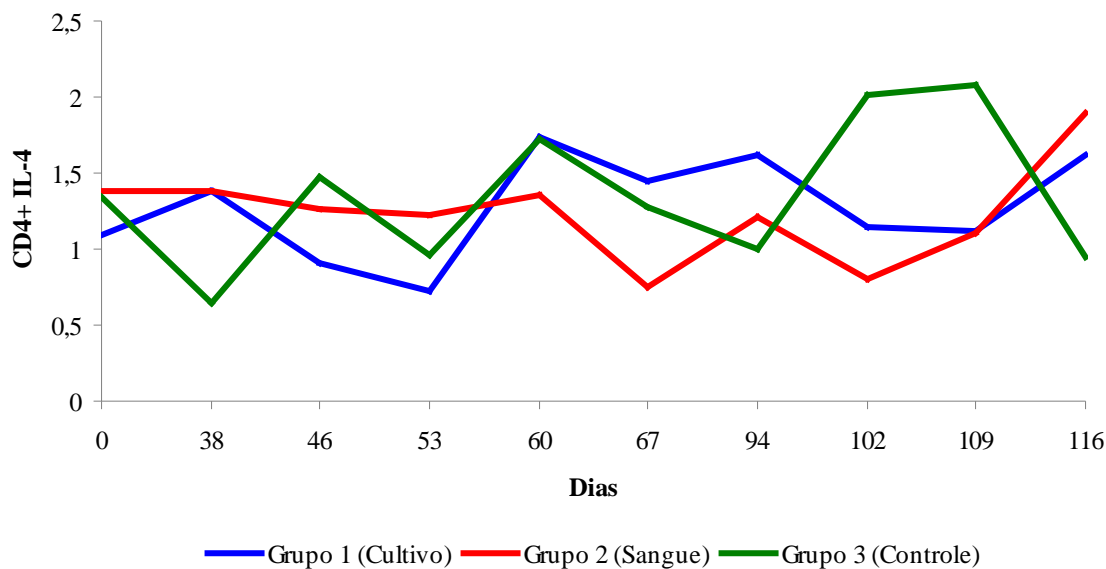
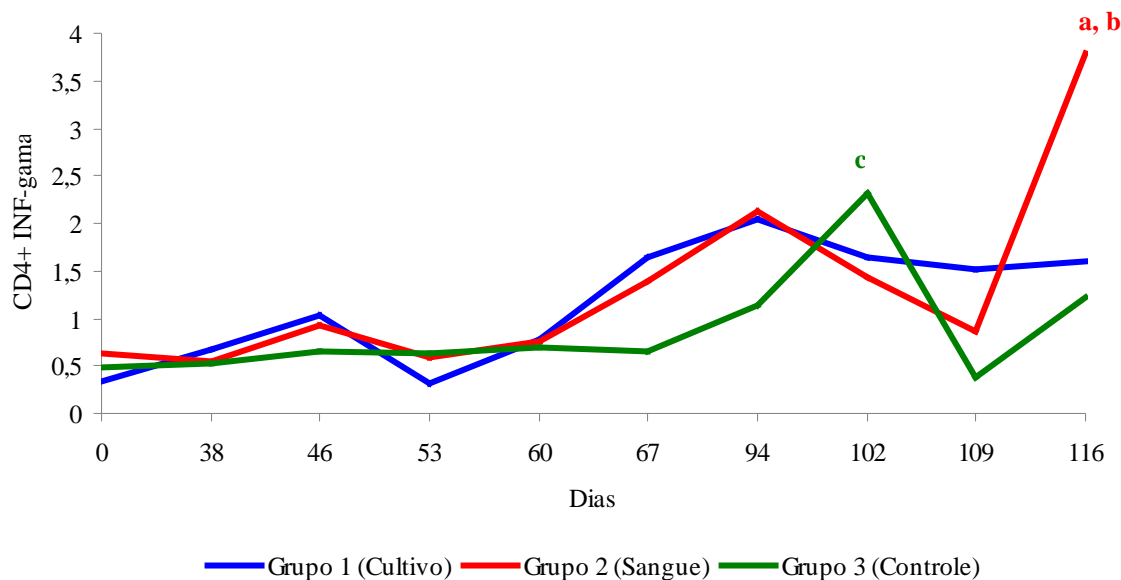


Figura 4: Percentual de Linfócitos CD4+/INF γ em bovinos infectados com *Anaplasma marginale* (isolado UFMG1) e re-infectados no dia 75 com *A. marginale* (isolado UFMG2). As letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$).



a = diferença significativa em relação ao Grupo 2 no dia 0
 b = diferença significativa em relação ao Grupo 2 no dia 38
 c = diferença significativa em relação ao Grupo 3 no dia 38

Figura 5: Razão entre CD4+ INF γ e CD4+ IL-4 em bovinos infectados com *Anaplasma marginale* (isolado UFMG1) e re-infectados no dia 75 com *A. marginale* (isolado UFMG2).

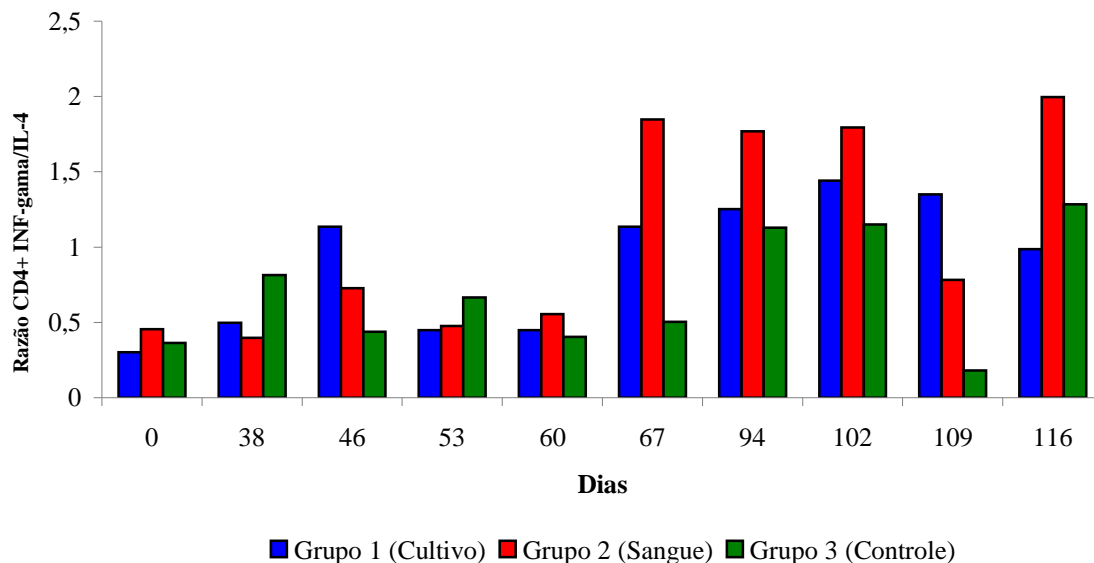
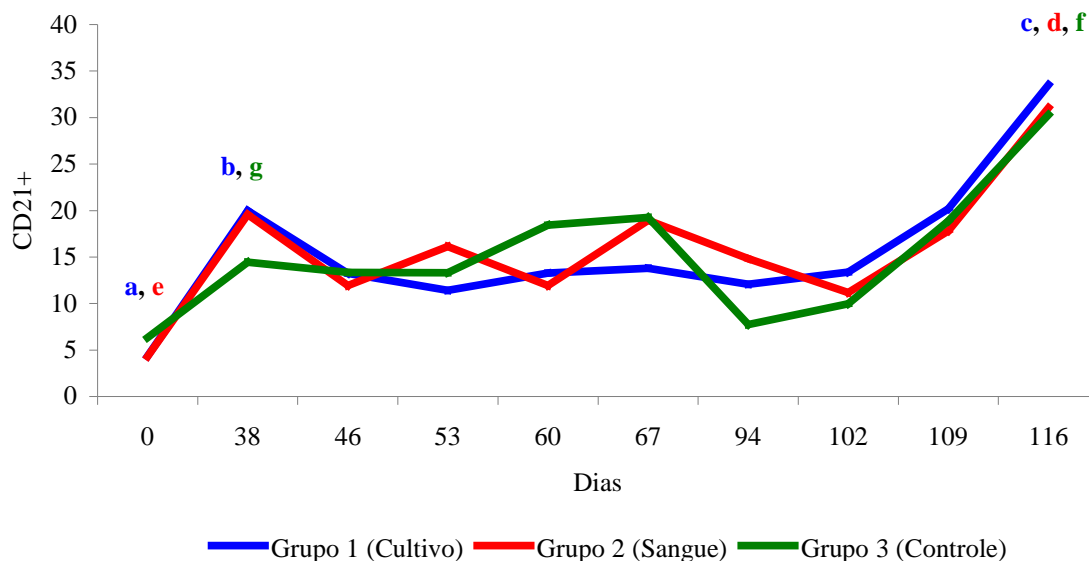


Figura 6: Percentual de Linfócitos CD21 bovinos infectados com *Anaplasma marginale* (isolado UFMG1) e re-infectados no dia 75 com *A. marginale* (isolado UFMG2). As letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$).



- a = diferença significativa em relação ao Grupo 1 nos dias 38 a 116
- b = diferença significativa em relação ao Grupo 1 nos dias 0, 53, 60, 94 e 116
- c = diferença significativa em relação ao Grupo 1 nos dias 0 a 109
- d = diferença significativa em relação ao Grupo 2 nos dias 0 a 109, exceto 38, 53, 67
- e = diferença significativa em relação ao Grupo 2 nos dias 38, 94, 109 e 116
- f = diferença significativa em relação ao Grupo 3 nos dias 0 a 102, exceto dia 60
- g = diferença significativa em relação ao Grupo 1 no dia 38

CONSIDERAÇÕES GERAIS

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

6.1) Produção do isolado de *A. marginale* de baixa patogenicidade em células IDE8 (UFMG1)

O cultivo *in vitro* de isolados de *A. marginale* é importante para o desenvolvimento de estudos da anaplasnose, principalmente em áreas endêmicas. A manutenção de *A. marginale* em cultivo de eritrócitos de ovinos e bovinos já foi descrito (Kessler e Ristic, 1979), entretanto, apesar da possibilidade de cultivo por período prolongado, este sistema apresenta grandes limitações na produção de imunógenos (Araújo *et al.*, 2003). Como o Brasil é uma área endêmica de anaplasnose bovina, há necessidade de se criar e manter os animais sem o contato com carrapatos e moscas hematófagas. Além disso, a inoculação de eritrócitos pode induzir a formação de iso-anticorpos, causando intensa anemia e mortalidade (Dennis *et al.*, 1970).

Sistemas de cultivo de células de carrapatos têm demonstrado resultados promissores por apresentarem menores custos de manutenção quando comparados à infecção experimental de animais susceptíveis. Além disso, enquanto o material obtido a partir de infecções *in vivo* apresenta riscos de contaminações com outros patógenos, o cultivo fornece material antigênico livre de componentes do hospedeiro e de patógenos (Kocan *et al.*, 2001).

O cultivo em células de carrapato *I. scapularis*, IDE8, produz organismos de *A. marginale* infectantes para bovinos e carrapatos (Munderloh *et al.*, 1996; Blouin *et al.*, 1998) livres de outros patógenos ou células de animais (Kocan *et al.*, 2001), além de conservar as seis proteínas de superfície (MSPs) encontradas no *A. marginale* proveniente de eritrócitos bovinos (Barbet *et al.*, 1999).

O sucesso no desenvolvimento da amostra brasileira de *A. marginale* com apêndice (UFMG1) em células de carrapato *I. scapularis* (IDE8) foi demonstrado neste trabalho. A microscopia óptica e eletrônica comprovou que a rickétsia se desenvolveu de forma crescente após fagocitose realizada pelas células do cultivo, conforme a descrição da primeira infecção de *Anaplasma* nesta linhagem celular (Blouin *et al.*, 2000). Houve infecções múltiplas com vacúolos que, provavelmente, se uniram no citoplasma das células gerando grandes colônias de *A. marginale* no evoluir das infecções.

Desde o seu estabelecimento, o isolado com apêndice (UFMG1) vem sendo cultivado continuamente na UFMG por meio de passagens em células IDE8 livres, evidenciando sua completa adaptação neste sistema de cultivo.

Esse isolado, descrito pela primeira vez por Ribeiro *et al.* (1997), tem sido alvo de vários estudos em nosso grupo de pesquisa. Inicialmente foi feita a caracterização morfológica do isolado, por meio de microscopia eletrônica, evidenciando-se a presença do apêndice (Ribeiro *et al.*, 1997). Posteriormente, Gonçalves-Ruiz *et al.* (2005) demonstraram que esse isolado não se desenvolveu em células intestinais de fêmeas de *B. microplus* alimentadas em bezerro experimentalmente infectado. Também não foi possível a observação de transmissão transtadial ou intraestadial. Esses resultados sugerem que esse isolado brasileiro de *A. marginale* com apêndice não seja transmitido por *R. (B.) microplus*.

Blouin *et al.* (2002a) descreveram que isolados que não são transmitidos por carrapatos também não propagam *in vitro* em células de carrapatos. Essas informações permitem concluir que o isolado brasileiro com apêndice, por não ser transmitido por *R. (B.) microplus*, e muito menos por *I. scapularis*, não poderia se desenvolver em cultivo de

IDE8. Entretanto, o presente trabalho demonstrou sucesso na propagação *in vitro* desse isolado em células IDE8. Uma explicação para esse fato poderia ser a diferença de sensibilidade da microscopia eletrônica utilizada por Gonçalves-Ruiz *et al.* (2005) comparada à sensibilidade do cultivo *in vitro* na visualização de estágios de desenvolvimento de *A. marginale*. Isso faz do cultivo de IDE8 uma importante ferramenta para o estudo do desenvolvimento desta riquétsia, assim como o estudo da sua interação com células de carrapatos. A presença de semelhanças morfológicas e similaridades no ciclo de *A. marginale* cultivado em IDE8 e de isolados encontrados em carrapatos naturalmente infectados nos Estados Unidos, facilitam o entendimento do ciclo biológico do *A. marginale* (Blouin e Kocan, 1998).

O seqüenciamento do gene da MSP1a do isolado brasileiro com apêndice após cultivo em IDE8 se mostrou sem alterações ao ser comparado com a seqüência original obtida no animal naturalmente infectado com o isolado. Esse achado confirma que o gene *m脾1a* é estável, mesmo após passagem por carrapatos, animais ou mesmo cultivo *in vitro* (Munderloh *et al.*, 1996; Blouin e Kocan, 1998; Barbet *et al.*, 1999). Bowie *et al.* (2002) também reportaram que a seqüência da MSP1a do isolado de Oklahoma não se alterou após passagem *in vitro* ou após transmissão por *Dermacentor variabilis*.

A padronização, facilidade e questões éticas do uso de animais na produção de antígenos vêm tendo destaque nos dias atuais. O cultivo do isolado brasileiro de *A. marginale* com apêndice se constitui um avanço para os estudos da anaplasnose no Brasil. O estabelecimento desta importante ferramenta de pesquisa possibilitará estudos de interação biológica entre *A. marginale* e carrapatos, estudos de testes de novas drogas para o

tratamento de bovinos, além da produção de antígenos com maior padronização para diagnóstico e desenvolvimento de vacinas sem o uso de animais.

6.2) Inoculação de bezerros com isolado de baixa patogenicidade: avaliação de proteção ao desafio com isolado de alta patogenicidade e ocorrência de exclusão entre os isolados.

As medidas recomendadas para o controle da anaplasmoze bovina são o uso de acaricidas, a administração de antibióticos e o uso de vacinas (Kocan *et al.*, 2000). Sabe-se que o controle de carrapatos confere uma prevenção parcial, já que há outras formas de transmissão da doença. O uso de quimioterapia é de alto custo, leva ao risco de resistência, além de necessitar do conhecimento da epidemiologia local. Hoje, em países tropicais e subtropicais, onde o controle da anaplasmoze continua um problema na indústria leiteira e de corte, estudos relativos à produção de novas vacinas têm sido prioridade na busca de medidas de controle eficiente.

A inoculação do isolado de baixa patogenicidade, UFMG1, protegeu os animais dos grupos 1 e 2 contra manifestações clínicas ao serem desafiados com o isolado UFMG2, constituindo-se o primeiro passo para o desenvolvimento de uma vacina brasileira efetiva produzida em células de carrapatos. Utilizando *A. marginale* cultivado em IDE8, Blouin *et al.* (1998) também foram capazes de imunizar bezerros, porém o grande avanço da imunização com UFMG1 foi justamente a capacidade de proteger contra um isolado heterólogo. Ocampo Espinoza *et al.* (2006) demonstraram proteção após imunização com amostra viva de *A. marginale* no México, entretanto essa proteção era limitada às áreas

onde os isolados homólogos são prevalentes. Vacinas comerciais usadas nos Estados Unidos que apresentam eficiência em animais jovens e adultos a campo (Luther *et al.*, 1989; Luther, 2005) falharam na proteção de animais desafiados com isolados mexicanos em condições experimentais (CONASA, 1995) e a campo (Figueroa-Millán *et al.*, 1999). A importância da proteção conferida por UFMG1 a um isolado heterólogo atinge maiores proporções quando observamos a diversidade genotípica e fenotípica que vem sendo reportada entre isolados de *A. marginale* em todo o mundo (de la Fuente *et al.*, 2001a; 2002c; 2007).

Estudos anteriores demonstraram, em condições naturais e experimentais, que bovinos são infectados com apenas um único genótipo de *mspl* α de *A. marginale* (Palmer *et al.*, 2001; de la Fuente *et al.*, 2002a, 2003b). Para explicar esta situação foi levantada a hipótese de exclusão, que consiste em afirmar que um animal se infecta com apenas um genótipo de *A. marginale*. O Fenômeno de Exclusão é descrito também em carrapatos e em células de carrapatos (de la Fuente *et al.*, 2002a; 2003a). de la Fuente *et al.* (2002a) afirmaram que a exclusão ocorre também entre diferentes espécies de *Anaplasma*, quando demonstraram que *A. marginale* não foi capaz de infectar células de carrapatos já infectadas com *Anaplasma ovis*. Além disto, a exclusão se confirmou em carneiros na tentativa frustrada de Stuen *et al.* (2005a; 2005b) de infectá-los com diferentes isolados de *Anaplasma phagocytophilum*.

O presente trabalho, por meio de infecções experimentais em bovinos, constatou ausência de exclusão entre os isolados de *A. marginale* em bovinos. Palmer *et al.* (2004) trabalhando com bovinos naturalmente infectados nos Estados Unidos, detectaram mais de um isolado desta ricketsia em alguns animais. Rodríguez *et al.* (2005) justificaram que a co-infecção

ocorreu neste caso pelos isolados possuírem repetições de MSP1a pertencentes a famílias diferentes, sendo estas famílias relacionadas a diferentes repertórios de pseudogenes de *msp2*.

Outros trabalhos demonstraram que é possível a co-infecção entre *A. marginale* e outras espécies de *Anaplasma*. Shkap *et al.* (2002b) passaram a considerar que não há exclusão entre *A. marginale* e *A. centrale* após observarem que 64% dos bovinos de um rebanho vacinado com *A. centrale* foram naturalmente infectados com *A. marginale*, tornando-se hospedeiros de ambos os agentes. Molad *et al.* (2006) também demonstraram co-infecção em 71% dos animais de um rebanho que recebia vacinação contendo *A. centrale* em área endêmica de *A. marginale* em Israel. Para confirmar esses achados, pesquisadores infectaram bovinos com as duas espécies de *Anaplasma* e detectaram persistência da co-infecção por pelo menos três meses (Shkap *et al.*, 2008). Co-infecções também foram descritas entre *A. marginale* e *A. phagocytophilum* em bovinos (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2004) e cervos (de la Fuente *et al.*, 2005).

O novo genótipo de MSP1a foi detectado tanto nos animais que foram imunizados com UFMG1 e desafiados com UFMG2 (grupos 1 e 2) quanto naqueles que apenas receberam UFMG2 sem imunização prévia (grupo 3). A diferença no seqüenciamento de MSP1a do isolado UFMG2 e do novo genótipo é de apenas dois aminoácidos na segunda e terceira repetições. Descarta-se a possibilidade de erro no seqüenciamento, já que a presença do novo genótipo ocorreu em vários animais de todos os grupos experimentais. Na procura de possível explicação deste fato, suspeitou-se da presença do novo genótipo no inóculo original do isolado UFMG2. Neste caso, com o decorrer da infecção nos animais, esse novo genótipo poderia ter se sobressaído, sendo detectado ao final do experimento. Sendo essa

hipótese verdadeira, a ausência de exclusão continuaria confirmada, já que o inóculo original, possivelmente com dois genótipos de *A. marginale*, foi obtido de um bezerro naturalmente infectado. Por fim, essa hipótese foi definitivamente eliminada por seqüenciamento de DNA que não detectou o novo genótipo no inóculo original do isolado UFMG2.

Apesar da proteína MSP1a ser descrita como estável após passagem por IDE8, carrapatos e bovinos (Bowie *et al.*, 2002), outra hipótese para o surgimento de um novo genótipo em animais que receberam UFMG1 e UFMG2, ou apenas UFMG2, seria por variação da proteína MSP1a do isolado UFMG2 ao longo da infecção experimental em bovinos.

A evolução da MSP1a é provavelmente influenciada pela pressão seletiva gerada pela resposta imune do hospedeiro, interações com receptores e outros fatores relacionados à sobrevivência do parasito. de la Fuente *et al.* (2001b) sugeriram que as variações de repetições em tandem da MSP1a entre os diversos isolados de *A. marginale* ocorram por meio de mutações (deleções) e pelo mecanismo *slipped-strand mispairing* (SSM). SSM é um processo relacionado ao despareamento das fitas de DNA durante a replicação (Henderson *et al.*, 1999; Levinson e Gutman, 1987). Regiões genômicas susceptíveis a este processo são as que apresentam curtas seqüências de DNA com repetições de seis pares de base ou menos, microsátélites ou repetições em tandem de número variável (Field e Wills, 1998; van Belkum *et al.*, 1998). Ocorrências do processo SSM têm sido descritas em *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori* e *Neisseria meningitidis* (revisado por Torres-Cruz e van der Woude, 2003). Aparentemente, *Escherichia coli* não se mostrava susceptível a variação por SSM, entretanto, observou-se que seqüências que causavam variação por SSM em *H. influenzae* também foram capazes de causar variação quando

introduzidas no cromossomo de *E. coli*. Portanto, a aparente ausência de influência do processo SSM em *E. coli* não ocorre por limitações mecânicas (Torres-Cruz e van der Woude, 2003). Regiões promotoras do gene *msp1a* em rickétsias são similares a estruturas do promotor em *E. coli* (Hawley e McClude, 1983), o que poderia induzir que o processo de SSM seja responsável pelo surgimento do novo genótipo a partir da variação das repetições em tandem do isolado UFMG2. Entretanto, se o novo genótipo representa realmente uma variação antigênica de MSP1a, o processo SSM parece não estar envolvido (de la Fuente, 2009 – comunicação pessoal).

A variação das repetições em tandem hipoteticamente ocorrida entre o isolado UFMG2 e o novo genótipo aumenta sua importância quando levamos em consideração que repetições influenciam nas propriedades adesivas da MSP1a do *A. marginale*. Foi demonstrado, por meio de proteínas mutantes, que as repetições da MSP1a são necessárias e suficientes para mediar a adesão em células de carrapatos e eritrócitos bovinos, um pré-requisito para infecção de células hospedeiras e transmissão (de la Fuente *et al.*, 2003c). Além disso, outro estudo demonstrou que árvores filogenéticas construídas a partir da primeira e da última repetições tendem a aproximar isolados pela região geográfica, enquanto que análises envolvendo apenas a segunda repetição apresentaram árvores filogenéticas aproximando os isolados de *A. marginale* pela transmissibilidade por carrapatos (de la Fuente *et al.*, 2001b). Variações de repetições em tandem entre isolados e possivelmente dentro de uma mesma amostra de *A. marginale* podem alterar propriedades de adesão, invasão e transmissão por carrapatos dos isolados, influenciando as estratégias de controle e estudos de vacinas.

Os resultados mostram, definitivamente, que não ocorreu exclusão entre os isolados UFMG1 e UFMG2 de *A. marginale*, ainda que tenha sido comprovada a proteção devido à imunização com UFMG1, representando um isolado com potencial para a produção de uma vacina.

6.3) Avaliação de parâmetros da resposta imunológica (expressão de linfócitos TCD4+, produtores de IL-4 e INF γ e linfócitos B, por meio do marcador de superfície CD21) de bezerros imunizados com inóculo de *A. marginale* de baixa patogenicidade e desafiados com isolado de alta patogenicidade

A citometria de fluxo vem se tornando uma ferramenta importante na medicina veterinária (Faldyna *et al.*, 2001). A técnica é particularmente importante para pesquisas biológicas por permitir exames quantitativos e qualitativos de células e seus constituintes. Além disso, há uma gama de reagentes disponíveis comercialmente, assim como corantes e anticorpos monoclonais (Jaroszeski e Radcliff, 1999). É uma metodologia que utiliza sistema ótico eletrônico que avalia a emissão de fluorescência e dispersão de raio *laser* incidente sobre uma célula, permitindo a análise de três parâmetros celulares: intensidade relativa de fluorescência, tamanho (FSC – Forward Scatter) e granulosidade ou complexidade interna (SSC – Side Scatter). Os sinais óticos e elétricos são armazenados para posterior análise em software *Cell-Quest*.

Um bom candidato à vacina contra *A. marginale* deve incluir epitopos de células Th e B (Brown *et al.*, 2001). Um modelo para vacinas com indução de imunidade tem como objetivo a eliminação do patógeno por anticorpos contra epitopos em combinação com a

ativação de macrófagos para aumento da fagocitose e destruição intracelular do *A. marginale*.

O isolado UFMG1, mesmo sendo de baixa patogenicidade, foi capaz de estimular resposta imune nos animais experimentais, tanto naqueles inoculados com sangue infectado, quanto nos inoculados com material produzido em cultivo *in vitro* em células IDE8. *A. marginale* cultivado em IDE8 já foi previamente usado para imunizar bovinos e este sistema resultou no desenvolvimento de proteção imunológica sem sinais clínicos de anaplasnose após desafio com sangue ou carrapatos infectados (Kocan *et al.*, 2001; de la Fuente *et al.*, 2002b).

Animais dos Grupos 1 e 2 não apresentaram sinais clínicos de anaplasnose após desafio com UFMG2. Já o Grupo controle, sem inoculação prévia com o isolado UFMG1, desenvolveu alta ricketsemia e queda de VG, resultando na morte de 60% dos animais. O isolado altamente patogênico UFMG2 induziu resposta imune mais exacerbada em todos os grupos. Particularmente nos Grupos 1 e 2, o isolado UFMG2 fez com que a resposta imune adquirida após inoculação com UFMG1 não apenas fosse exacerbada, mas, também mantida até o final do experimento protegendo os animais de sinais clínicos, alterações hematológicas e morte por anaplasnose. Utilizando isolados homólogos, Brown *et al.* (1998) também demonstraram que, após o desafio, animais pré-imunizados apresentaram vigorosa resposta imune, mantida por muitas semanas pelas células T, protegendo assim os animais de sinais clínicos, de alta ricketsemia e de queda exacerbada de VG.

O presente estudo reforça a importância do linfócito CD4⁺ secretando INF γ na resposta imune contra *A. marginale*. A produção de citocina INF γ ativa macrófagos, aumentando a

produção de óxido nítrico, substância tóxica sobre rickétsia, estimulando a expressão de receptores de macrófagos e a fusão de fagossomos e lisossomos. $\text{INF}\gamma$ ainda atua na diferenciação de linfócitos B para produção de anticorpos, estimulando a produção de IgG2. IgG2 realiza opsonização, favorecendo a fagocitose por macrófagos (revisado por Araújo *et al.*, 2003). A citocina IL-4 também tem papel importante diferenciando linfócitos B por meio da regulação dos marcadores de superfície, induzindo positivamente a produção de IgG1, IgE e IgM (Estes *et al.*, 1995).

O estudo de Brown *et al.* (1998), consistindo de imunização e desafio com membranas externas de amostras homólogas de *A. marginale*, demonstrou envolvimento de células T CD4^+ produtoras de $\text{INF}\gamma$, protegendo clinicamente os animais. No presente estudo também se observou proteção contra *A. marginale*, porém a partir de inoculação e desafio com dois isolados heterólogos.

Em outro estudo, a porção C de MSP1a foi responsável por induzir resposta de linfócitos T CD4^+ a várias amostras de *A. marginale* em animais imunizados com a MSP1 do isolado Flórida (Brown *et al.*, 2001). Esta região em MSP1a, é altamente conservada entre amostras de *A. marginale*, enquanto que a porção N é composta de repetições em tandem que variam entre amostras da rickétsia (Allred *et al.*, 1990). Mesmo sendo a porção N mais variável, epítopos para linfócitos T CD4^+ também foram reconhecidos na região da MSP1a que contém repetições (Brown *et al.*, 2002). Além disto, esta porção está exposta na superfície da rickétsia, contendo também epítopos sensíveis à neutralização (Palmer *et al.*, 1987; de la Fuente *et al.*, 2001b).

García-García *et al.* (2004) identificaram maior parte dos epitopos de células B de bovinos na porção N da MSP1a de *A. marginale*. Sabe-se ainda que as repetições da porção N são necessárias e suficientes para adesão em eritrócitos bovinos e células de carrapatos (de la Fuente *et al.*, 2003c) e, portanto, anticorpos contra essa porção são capazes de inibir ligação e invasão aos eritrócitos (Palmer *et al.*, 1986; de la Fuente *et al.*, 2003c) e às células de carrapatos (Blouin *et al.*, 2003; de la Fuente *et al.*, 2003c). Foi demonstrado, então, que a porção N contendo repetições na MSP1a contém epitopos para resposta por células T e B, necessários para uma resposta imune protetora.

Peptídeos que foram reconhecidos por um *pool* de soros apresentavam seqüência semelhante dentro de suas repetições SSAGGQQQESS, onde poderiam estar os epitopos para células B (García-García *et al.*, 2004). No presente estudo, a seqüência SSASGQQQESS é coincidente entre os isolados utilizados (UFMG1 e UFMG2), diferindo, porém, da seqüência do estudo de García-García *et al.* (2004).

A ocorrência de proteção entre os isolados heterólogos utilizados no presente estudo pode ter ocorrido por compartilhamento de epitopos de células T CD4+ e células B. Da mesma maneira, a indução de proteção da vacina contendo *A. centrale* se deve à presença de epitopos imunodominantes semelhantes aos presentes no *A. marginale* (Shkap *et al.*, 2002a). Epitopos de CD4+ são conservados entre estas duas espécies, contribuindo para a proteção cruzada gerada pela vacina viva de *A. centrale* (Shkap *et al.*, 2002b).

O maior desafio para o desenvolvimento de vacinas contra *A. marginale* é o reconhecimento de epitopos pela resposta imune em amostras antigenicamente distintas (Brown *et al.*, 1998). Analisando este desafio, o isolado UFMG1 tem se mostrado um

isolado com potencial para uso em vacinas já que é de baixa patogenicidade, induz resposta imune em bovinos desafiados com isolado altamente patogênico e parece compartilhar, com outros isolados, epítopos de células CD4+ e células B, fundamentais para resposta e destruição do *A. marginale* no hospedeiro.

CONCLUSÕES

7. Conclusões

- O isolado de *A. marginale* UFMG1 pode ser cultivado *in vitro* em células de carrapato IDE8, o que determina maior padronização, segurança, menores custos e evita o uso de animais para a produção de inóculos;
- Não há exclusão entre os isolados UFMG1 (baixa patogenicidade) e UFMG2 (alta patogenicidade) em bezerros infectados experimentalmente;
- Houve ocorrência de proteção entre os isolados heterólogos UFMG1 e UFMG2 por provável compartilhamento de epitopos de células T CD4+ e células B, já que bezerros imunizados com o isolado UFMG1 adquiriram resposta imune eficiente contra o isolado altamente patogênico UFMG2.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Abdala, A.A.; Pipano, E.; Aguirre, D.H. *et al.* Frozen and fresh *Anaplasma centrale* vaccines in the protection of cattle against *Anaplasma marginale* infection. **Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.**, v. 43, p. 155-158, 1990.

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*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 3220–3224, 1990.

Alonso, M.; Arellano-Sota, C.; Cereser, V.H. *et al.*, Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean. **Vet. Sci. Tech. Off Int. Epiz.**, v. 11, p. 713-733, 1992.

Amerault, T.E.; Roby, T.O. A rapid card agglutination test for bovine anaplasmosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.153, p. 1828-1834, 1968.

Araújo, F.R.; Madruga, C.R.; Soares, C.O.; Kessler, R.H. Progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 23, p. 139-148, 2003.

Araújo, F.R.; Melo, V.S.P.; Ramos, C.A.N. *et al.* Development of enzyme-linked immunosorbent assays based on recombinant MSP1a and MSP2 of *Anaplasma marginale*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 765-769, 2005.

Barbet, A.F.; Blentlinger, R.; Jooyoung Yi,.; 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. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 102-107, 1999.

Bastos, C.V. Avaliação de condições de manutenção e criopreservação do cultivo *in vitro* de células IDE8. Escola de Veterinária da UFMG, 2005 (Dissertação de Mestrado).

Bastos, C.V.; Vasconcelos, M.M.C.; Ribeiro, M.F.B.; Passos, L.M.F. Use of refrigeration as a practical means to preserve viability of in vitro-cultured IDE8 tick cells. *Exp. Appl. Acarol.* v. 39, p. 347-352, 2006.

Bastos, C.V., Passos, L.M.F., Vasconcelos, M.M.C., Ribeiro, M.F.B. *In vitro* establishment and propagation of a Brazilian strain of *Anaplasma marginale* with appendage in IDE8 (*Ixodes scapularis*) cells. *Braz. J. Microbiol.* V. 40, p. 399-403, 2009.

Bell-Sakyi, L.; Zwegarth, E.; Blouin, E.F.; Gould, E.A.; Jongejan, F. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. *Trends Parasitol.*, v.23, p. 450-457, 2007.

Benavides, E.; Vizcaino, O.; Britto, C.M. Attenuated trivalent vaccine against babesiosis and anaplasmosis in Colombia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 916, p. 613-616, 2000.

Blouin, E.F.; Kocan, K.M. Morphology and development of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmatacea) in cultured *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) cell. *J. Med. Entomol.*, v. 35, p.788-797, 1998.

Blouin, E.F.; Saliki, J.T.; Kocan, K.M.; Rodgers, S.J. Evaluation of *Anaplasma marginale* from tick cell culture as an immunogen for cattle. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 847, p. 253-258, 1998.

Blouin, E.F.; Barbet, A.F.; Yi, J.; Kocan, K.M.; Saliki, J.T. Establishment and characterization of an Oklahoma isolate of *Anaplasma marginale* in cultured *Ixodes scapularis* cells. *Vet. Parasitol.*, v. 87, p. 301-313, 2000.

Blouin, E.F.; de la Fuente, J.; Garcia-Garcia, J.C. *et al.* Applications of a cell culture system for studying the interaction of *Anaplasma marginale* with tick cells. ***Anim. Health Res. Rev.***, v. 3, n. 2, p. 57-68, 2002a.

Blouin, E.F.; Kocan, K.M.; de la Fuente, J. *et al.* Effect of tetracycline on development of *Anaplasma marginale* in cultured *Ixodes scapularis* cells. ***Vet. Parasitol.***, v. 107, n. 1-2, p. 115-126, 2002b.

Blouin, E.F.; Saliki, J.T.; de la Fuente, J. *et al.* Antibodies to *Anaplasma marginale* major surface proteins 1a and 1b inhibit infectivity for cultured tick cells. ***Vet. Parasitol.***, v. 111, n. 2-3, p. 247-260, 2003.

Bock, R.E.; de Vos, A.J.; Kingston, T.G.; Caster, P.D. Assessment of a low virulence Australian isolate of *Anaplasma marginale* for pathogenicity, immunogenicity and transmissibility by *Boophilus microplus*. ***Vet. Parasitol.***, v.118, p.121-131, 2003.

Bowie, J.V.; de la Fuente, J.; Kocan, K.M.; Blouin, E.F.; Barbet, A.T. Conservation of major surface protein 1 genes of ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. ***Gene*** v. 282, p. 95-102, 2002.

Brown, C.G. Dynamic and impact of tick-borne diseases of cattle. ***Trop. Anim. Health Prod.***, v. 29, p. 1S-3S, 1997.

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. ***Infect. Immun.***, v. 66, p. 5406-5413, 1998.

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. *Infect. Immun.*, v. 69, p. 6853-6862, 2001.

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. *Infect. Immun.*, v. 70, p. 5521–5532, 2002.

Burgdorfer, W.; Hayes, S.F.; Mvros, A.J. Nonpathogenic rickettsiae in *Dermacentor andersoni*: a limiting factor for the distribution of *Rickettsia rickettsii*. In: Burgdorfer, W. and Anacker R.L.(ed) Rickettsiae and rickettsial diseases. Academic Press, New York, 1981, p.585-594.

Callow, L.L. Protozoan and rickettsial diseases. In: Australian Bureau of Animal Health. Animal Health in Australia, Vol. 5. Aust. Gov. Publishing Serv., Canberra, 1984, pp. 121-216.

Callow, L.L.; Rogers, R.J., de Vos, A.J. Standard diagnostic techniques for tick-borne diseases (babesiosis and anaplasmosis) of cattle in Australia. In: Australian Agricultural Council, Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases, Vol. 29. CSIRO, Canberra, 1986, pp. 1-29.

Carelli, G.; Decaro, N.; Lorusso, A.; Elia, G.; Mari, V.; Ceci, L.; Buonavoglia, C. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. *Vet. Microbiol.*, v. 124, p. 107-114, 2007.

CONASA, 1995. Análisis de la situación de las vacunas contra anaplasmosis y babesiosis. Conclusiones y recomendaciones presentadas por el Comité de enfermedades parasitarias. *Memoria de la IV Reunión Anual. México D.F.*, 14-17 de nov., pp. 79-81.

Coronado, A. Is *Boophilus microplus* the main vector of *Anaplasma marginale*?. *Technical Note. Rev. Cient. FCV-LUZ*, v. 11, p. 408-411, 2001.

de la Fuente, J.; van den Bussche, R.A.; Kocan, K.M. Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). *Vet. Parasitol.*, v. 97, p. 65-76, 2001a.

de la Fuente, J.; Garcia Garcia, J.C.; Blouin, E.F.; Rodríguez, S.D.; Garcia, M.A.; Kocan, K.M. Evolution and function of tandem repeats in the major surface protein 1a of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Anim. Health Res. Rev.* v. 2, 163-173, 2001b

de la Fuente, J.; Garcia-Garcia, J.C.; Blouin, E.F. *et al.* Infections of tick cells and bovine erythrocytes with one genotype of intracellular ehrlichia *Anaplasma marginale* excludes infection with other genotypes. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 9, p. 658-668, 2002a.

de la Fuente, J., Kocan, K.M., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., Claypool, P.L., Saliki, J.T. Vaccination of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture and bovine erythrocytes followed by challenge-exposure with infected ticks. *Vet. Microbiol.*, v.89, p. 239-251, 2002b.

de la Fuente, J., Van Den Bussche, R.A., García-García, J.C., Rodríguez, S.D., García, M.A., Guglielmono, A.A., Mangold, A.J., Passos, L.M.F, Blouin, E.F., Kocan, K.M. Phylogeography of NewWorld isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae) based on major surface protein sequences. *Vet. Microbiol.* v. 88, 275–285, 2002c.

de la Fuente, J.; Blouin, E.F.; Kocan, K.M. Infection exclusion of rickettsial pathogen, *Anaplasma marginale*, in tick vector, *Dermacentor variabilis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 10, p. 182-184, 2003a.

de la Fuente, J., Van Den Bussche, R.A., Prado, T.M., Kocan, K.M. *Anaplasma marginale msp1a* genotypes evolved under positive selection pressure but are not markers for geographic isolates. *J. Clin. Microbiol.* v. 41:1609–1616, 2003b.

de la Fuente, J.; García-García, 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. *Vet. Microbiol.*, v. 91, p. 265-283, 2003c.

de la Fuente, J., Naranjo, V., Ruiz-Fons, F., Höfle, U., Fernández de Mera, I. G., Villanúa, D., Almazán, C., Torina, A., Caracappa, S., Kocan, K.M., Gortázar, C. Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in central Spain. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* v. 5, p. 390–401, 2005.

de la Fuente, J., Ruybal, P., Mtshali, M.S., Naranjo, V., Shuqing, L., Mangold, A.J., Rodríguez, S.D., Jiménez, R., Vicente, J., Moretta, R., Torina, A., Almazán, C., Mbatia, P.M., Torioni de Echaide, S., Farber, M., Rosario-Cruz, R., Gortazar, C., Kocan, K.M.

Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. *Vet. Microbiol.* v. 119: 382-390, 2007.

Dennis R.A.; O'Hara P.J.; Young M.F.; Dorris K.D. Neonatal immunohemolytic anemia and icterus of calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v. 156, p.1861-1869, 1970.

Dikmans, G. The transmission of anaplasmosis. *Am. J. Vet. Res.*, v. 38, p. 5-16, 1950.

Edds, G.T.; Simpson, C.F.; Neal, F.C.; White, F.H. Irradiation of *Anapalsma marginale* for vaccine production. In: PANAMERICAN CONGRESS OF VETERINARY MEDICINE, 5, 1966 *Proc.*, 1966. p. 241-251.

Eriks, I.S.; Palmer, G.H.; McGuire, T.C. *et al.* Detection and quantification of *Anaplasma marginale* in carrier cattle using a nucleic acid probe. *J. Clin. Microbiol.*, v. 27, p. 279-284, 1989.

Estes, D.M.; Closser, N.M.; Allen, G.K. IFN-gamma stimulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti-mu and mitogen. *Cell Immunol.*, v.154, p. 287-295, 1994.

Estes, D.M.; Hirano, A.; Heussler, V.T.; Dobbelaere, D.A.E.; Brown, W.C. Expression and biologic activities of bovine interleukin 4: Effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell proliferation *in vitro*. *Cell Immunol.*, v. 163, p. 268-279, 1995.

Ewing, S.A. Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. In: NATIONAL ANAPLASMOSIS CONFERENCE, 7, 1981, Mississippi State University, MS. *Proc.* Mississippi State University: 1981. p. 395-423.

Faldyna, M.; Levá, L.; Knötigová, P.; Toman, M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dog – a flow cytometric study. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 82, p. 23-37, 2001.

Field, D., Wills, C. Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 95, p. 1647–1652, 1998.

Figueroa, J.V.; Chieves, L.P.; Johnson, G.S.; Buening, G.M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet. Parasitol.*, v. 50, p. 69-81, 1993.

Figueroa J.V.; Alvarez, J.A.; Ramos, J.A. *et al.* Bovine Babesiosis and anaplasmosis follow-up on cattle relocated in an endemic area for hemoparasitic diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 847, p. 1-10, 1998.

Figueroa-Millán, J.V., Cantó-Alarcón, G.J., Ramos-Aragón, J.A., Rojas-Ramírez, E.E., Santiago-Valencia, C., Granjeno-Colín, G., García-Ortiz, M.-A., Parrodi, F. Evaluación en condiciones de campo de la vacuna inactivada de *Anaplasma marginale* denominada Plazvax. *Vet. Mex.* v. 30, 221–225, 1999.

Freshney, R.I. *Animal cell culture: a practical approach*. Oxford: IRL PRESS, 1986. P. 248.

Foil, L.D. Tabanids as vectors of diseases agents. *Parasitol. Today*, v. 5, p. 88-96, 1989.

García-García, J.C.; de la 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. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 98, p. 137-151, 2004.

Ge, N.K.; Kocan, K.M.; Blouin, E.F.; Murphy, G.L. Developmental studies of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) infected as adults using non-radioactive in situ hybridization. *J. Med. Entomol.*, v. 33, p. 911-920, 1996.

Gonçalves-Ruiz P.M.G., Passos L.M.F., Ribeiro M.F.B. Lack of infectivity of a Brazilian *Anaplasma marginale* isolate for *Boophilus microplus* ticks. *Vet Parasitol* v. 128, p. 325-331, 2005.

Guglielmone, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.*, v. 57, p. 109-120, 1995.

Harrus, S.; Baneth, G. Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. *Int. J. Parasitol.*, v. 35, n.11-12, p. 1309-1318, 2005.

Hawley, D.K.; McClure, W.R. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* v. 11, p. 2237–2255, 1983.

Henderson, I. R., Owen, P., Nataro, J. P. Molecular switches - the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol. Microbiol.* v. 33, p. 919–932, 1999.

Hofmann-Lehmann, R., Meli, M.L., Dreher, U.M., Gönczi, E., Deplazes, P., Braun, U., Engels, M., Schüpbach, J., Jörger, K., Thoma, R., Griot, C., Stärk, K.D.C., Willi, B., Schmidt, J., Kocan, K.M., Lutz, H. Concurrent infections with vector-borne pathogens

associated with fatal hemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* v. 42, p. 3775–3780, 2004.

Jaroszeski, M.J.; Radcliff, G. Fundamentals of flow cytometry. *Mol. Biotechnol.*, v. 11, p. 37-53, 1999.

Karpf, A.R.; Lenches, E.; Strauss, E.G.; Strauss, J.H.; Brown, D.T. Superinfection exclusion of alphaviruses in three mosquito cell lines persistently infected with Sindbis virus. *J. Virol.*, v. 71, p. 7119-7123, 1997.

Kessler, R.; Ristic, M. *In vitro* cultivation of *Anaplasma marginale*: invasion of and development in noninfected erythrocytes. *Am. J. Vet. Res.*, v. 40, p. 1774-1776, 1979.

Kieser, S.T.; Eriks, I.S.; Palmer, G.H. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infect. Immun.*, v.58, p. 117-119, 1990.

Kocan, K.M. Development of *Anaplasma marginale* Theiler in ixodid ticks: coordinated development of a rickettsial organism and its tick host. In: Sauer, J.R.; Hair, J.A. (eds) *Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1986. p. 472-505.

Kocan, K.M.; Stiller, D.; Goff, W.L. *et al.* Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from parasitemic to susceptible cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v.53, n. 4, p.499-507, 1992a.

Kocan, K.M.; Goff, W.L.; Stiller, D. *et al.* Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae)

transferred successively from infected to susceptible calves. *J. Med. Entomol.*, v. 29, p. 657-668, 1992b.

Kocan, K.M.; Blouin, E.F.; Barbet, A.F. Anaplasmosis control: past, present and future. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 916, p. 501-509, 2000.

Kocan, K.M.; Halbur, T.; Blouin, E.F. *et al.* Immunization of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture. *Vet. Parasitol.*, v.102, n. 1-2, p. 151-161, 2001.

Kocan, K.M.; de la Fuente, J.; Guglielmono, A.A.; Meléndez, R.D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 16, n. 4, p. 698-712, 2003.

Kuttler, K.L. *Anaplasma* infections in wild and domestic ruminants: a review. *J. Wildl. Dis.*, v. 20, p. 12-20, 1984.

Kuttler, K.L.; Zaugg, J.L. Characteristics of an attenuated *Anaplasma marginale* of deer origin as an anaplasmosis vaccine. *Trop. Anim. Health Prod.*, v. 20, p. 85-91, 1988.

Leverich, C.K.; Palmer G.H.; Knowles Jr, D.P.; Brayton, K.A. Tick-borne transmission of two genetically distinct *Anaplasma marginale* strains following superinfection of the mammalian reservoir host. *Infect. Immun.*, v. 76, p. 4066-4077, 2008.

Levinson, G., Gutman, G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* v. 4, p. 203–221, 1987.

Lignières, J. Sur la vaccination des bovides contre la piroplasmose, le babesiellose et l'anaplasmosse. Comparaison des procedes employes en Argentine et en Algerie. *Bull. Soc. Pathol.*, v. 21, p. 371-378, 1928.

Luther, D.G., Anaplasmosis vaccine is available from University of Louisiana; <http://www.anaplasmosisvaccine.com/pages/415169/>, 2005.

Luther, D.G., Hart, L.T., Todd, W.J., Morris, N.G., Taylor, N.D., McRae, J.W., 1989. Field studies of an experimental anaplasmosis vaccine on pregnant cows and neonatal isoerythrolysis. In: Proceedings of Eight National Veterinary Hemoparasite Disease Conference, St. Louis, MO, pp. 559–562.

Madruga, C.R.; Marques, A.P.C.; Leal, C.R.B. *et al.* Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detection antibodies against *Anaplasma marginale*. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 20, p. 109-112, 2000.

McGarey, D.J.; Allred, D.R. Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface polypeptides 1^a and 1b. *Infect. Immun.*, v. 62, p. 4587-4593, 1994.

Meléndez, R.D. Future perspectives on veterinary hemoparasitic research in the tropics at the start of this century. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 916, p. 253-258, 2000.

Molad, T., Mazuz, M.L., Fleiderovitz, L., Fish, L., Savitskya, I., Krigel, Y., Leibovitz, B., Molloy, J., Jongejan, F., Shkap, V. Molecular and serological detection of *A. centrale* and *A. marginale*-infected cattle grazing within an endemic area. *Vet. Microbiol.* v. 113, p.55–62, 2006.

Montenegro-James, S. Prevalence and control of babesiosis in the Americas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 87, Suppl 3, p. 27-36, 1992.

Munderloh, U.G.; Wang, Y.L.M.; Chen, C.; Kurtti, T.J. Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*. *J. Parasitol.*, v. 80, p. 533-543, 1994.

Munderloh, U.G.; Blouin, E.F.; Kocan, K.M. *et al.* Establishment of the tick (Acari: Ixodidae)-borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in tick cell culture. *J. Med. Entomol.*, v. 33, p. 656-664, 1996.

Norton, J.H.; Parker, R.J.; Forbes-Faulkner, J.C. Neonatal anaplasmosis in a calf. *Aust. Vet. J.*, v. 60, p. 348, 1983.

Ocampo Espinoza, V., Vázquez, J.E., Aguilar, M.D., Ortiz, M.A., Alarcón, G.J., Rodríguez S.D. *Anaplasma marginale*: lack of cross-protection between strains that share MSP1a variable region and MSP4. *Vet Microbiol.*, v. 114, p. 34-40, 2006.

Palmer, G.H. *Anaplasma* vaccines. In: Wright I.G. (Ed.) *Veterinary Protozoan and Hemoparasite Vaccines*. CRC Press, Boca Raton, USA, 1989, pp. 1-29.

Palmer, G.H.; McGuire, T.C. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *J. Immunol.*, v. 133, p. 1010-1015, 1984.

Palmer, G.H., Barbet, A.F., Davis, W.C., McGuire, T.C., Immunization with an isolate-common surface protein protects cattle against anaplasmosis. *Science* v. 231, p. 1299–1302, 1986.

Palmer, G.H.; Waghela, S.D.; Barbet, A.F.; Davis, W.C.; McGuire, T.C. Characterization of a neutralization sensitive epitope on the AM 105 surface protein of *Anaplasma marginale*. *Int. J. Parasitol.*, v. 17, p. 1279–1285, 1987.

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. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, p. 631-635, 2001.

Palmer, G.H., Knowles, D., Rodríguez, J., Gnad, D., Hollis, L., Marston, T., Brayton, K. Stochastic transmission of multiple genotypically distinct *Anaplasma marginale* strains in a herd with high prevalence of *Anaplasma* infection. *J. Clin. Microb.*, v. 42, p. 5381-5384, 2004.

Payne, R.C.; Osório, O.; Ybañez, A. Tick-borne diseases of cattle in Paraguay. II. Immunisation against anaplasmosis and babesiosis. *Trop. Anim. Health Prod.*, v. 22, p. 101-108, 1990.

Potgieter, F.T.; Sutherland, B.; Biggs, H.C. Attempts to transmit *Anaplasma marginale* with *Hippobosca rufipes* and *Stomoxys calcitrans*. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v. 48, p. 119-122, 1981.

Ribeiro, M.F.B.; Reis, R.; Patarroyo, J.H. Avaliação da vacina atenuada de *Anaplasma marginale* em bezerros mantidos em piquetes. *Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais*, v. 32, p. 251-258, 1980.

Ribeiro, M.F.B.; Reis, R. Prevalência da anaplasmosose em quatro regiões do estado de Minas Gerais. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, v.33, n.1. p.57-62, 1981a.

Ribeiro, M.F.B.; Reis, R. Exposição natural de bezerros em áreas endêmicas de *Anaplasma marginale* de Minas Gerais. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, v.33, p. 63-66, 1981b.

Ribeiro, M.F.B.; Lima, J.D.; Guimarães, A.M.; Scatamburlo, M.A.; Martins, N.E. Transmissão congênita da anaplasmosose bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 47, n. 3, p. 297-304, 1995.

Ribeiro, M.F.B.; Lima, J.D. Morphology and development of *Anaplasma marginale* in midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.*, v. 61, n. 1-2, p. 31-39, 1996.

Ribeiro M.F.B.; Lima J.D; Salcedo J.H.P. Attempted transmission of *Anaplasma marginale* by infected *Boophilus microplus*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 48, p. 397-402, 1996.

Ribeiro, M.F.B., Passos, L.M.F., Guimarães, A.M., Ultrastructure of *Anaplasma marginale* with an inclusion appendage, isolated in Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.70, p. 271-277, 1997.

Richey, E.J. Bovine anaplasmosis. In: Howard, J.R. (ed) Current veterinary therapy food animal practice, Philadelphia: The W.B. Saunders Co., 1981. p. 767-772.

Ristic, M. Anaplasmosis. *Adv. Vet. Sci.* v. 6, p. 111-192, 1960.

Ristic, M. A capillary-tube agglutinin test for anaplasmosis: a preliminary report. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 141, p. 588-594, 1962.

Ristic, M.; Watrach, A.M. Anaplasmosis. VI. Studies and a hypothesis concerning the cycle of development of the causative agent. *Am. J. Vet. Res.*, v. 24, p. 267-276, 1963.

Ristic, M.; Sibinovic, S.; Welter, C.J. An attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. In: ANNUAL MEETING OF THE UNITED STATES LIVESTOCK SANITARY ASSOCIATION, 72, 1968. p. 56-69.

Ristic, M.; Carson, C.A. Methods of immunoprophylaxis against bovine anaplasmosis with emphasis on use of the attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. In: Miller, L.H.; Pino, J.A.; McKelvey, J.J. (eds) *Immunity to blood parasites of animal and man: advances in experimental medicine and biology*. New York: Plenum Publishing Corp., 1977. p. 151-188.

Rodgers, S.J.; Welsh, D.; Stebbins, M.E. Seroprevalence of bovine anaplasmosis in Oklahoma from 1977 to 1991. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 6, p. 200-206, 1994.

Rodgers, S.J.; Saliki, J.T.; Blouin, E.F.; Kocan, K.M. The development of a semi-automated latex agglutination test for the detection of antibodies to *Anaplasma marginale*. *Ann. NY Acad. Sci.*, v. 847, p. 282-292, 1998.

Rodríguez, S.D.; García Ortiz, M.A.; Hernández Salgado, G. *et al.* *Anaplasma marginale* inactivated vaccine: dose titration against a homologous challenge. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 23, p. 239-252, 2000.

Rodríguez, S.D.; Palmer, G.H.; Knowles, D.P Jr; Brayton, K.A. Distinctly different *msp2* pseudogene repertoires in *Anaplasma marginale* strains that are capable of superinfection. *Gene*, v. 361, p. 127-132, 2005.

Rogers, R.J.; Shiels, I.A. Epidemiology and control of anaplasmosis in Austrália. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, v. 50, p. 363-366, 1979.

Rogers, R.J.; Dimmock, C.K.; De Vos, A.J.; Rodwell, B.J. Bovine leucosis virus contamination of a vaccine produced *in vitro* against bovine babesiosis and anaplasmosis. *Aust. Vet. J.*, v. 65, p. 285-287, 1988.

Saliki, J.T.; Blouin, E.F.; Rodgers, S.J.; Kocan, K.M. Use of tick cell culture-derived *Anaplasma marginale* in a competitive ELISA for serodiagnosis of anaplasmosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 847, p. 273-281, 1998.

Schunter, C.A.; Leatch, G. Radioimmunoassay for *Anaplasma marginale* antibodies. *Am. J. Vet. Res.*, v. 49, p. 504-507, 1988.

Sharma, S.P.; Bansal, G.C. Immune responses in cattle vaccinated with gamma-irradiated *Anaplasma marginale*. *Indian J. Anim. Sci.*, v. 56, p. 490-493, 1986.

Shkap, V.; Bin, H.; Ungar-Waron, H.; Pipano, E. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale*. *Vet. Microbiol.*, v. 25, p. 45-53, 1990.

Shkap, V.; Pipano, E.; McGuire, T.C.; Palmer, G.H. Identification of immunodominant polypeptides common between *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 29, p. 31-40, 1991.

Shkap, V. Molad, T.; Brayton, K.A. *et al.* Expression of major surface protein 2 variants with conserved T-cell epitopes in *Anaplasma centrale* vaccinates. *Infect. Immun.*, v. 70, p. 642-648, 2002a.

Shkap, V. Molad, T.; Fish, L.; Palmer, G.H. Detection of the *Anaplasma centrale* vaccines strain and specific differentiation from *Anaplasma marginale* in vaccinated and infected cattle. *Parasitol. Res.*, v.88, p. 546-552, 2002b.

Shkap, V., Leibovitz, B., Krigel, Y., Molad, T., Fish, L., Mazuz, M., Fleiderovitz, L., Savitsky, I. Concomitant infection of cattle with the vaccine strain *Anaplasma marginale* ss *centrale* and field strains of *A. marginale*. *Vet. Microbiol.* v. 130, p.277-284, 2008.

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*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 50, p. 1377-1380, 1989.

Stuen, S., Dahl, H., Bergström, K., Moum, T. Unidirectional suppression of *Anaplasma phagocytophilum* genotypes in infected lambs. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* v. 12, p.1448–1450, 2005a.

Stuen, S., Whist, S.K., Bergström, K., Moum, T. Possible exclusion of genotypes in *Anaplasma phagocytophilum* infected lambs. *Vet Record.* v. 156, p.518-520, 2005b.

Tebele, N.; Palmer, G.H. Crossprotective immunity between the Florida and Zimbabwe stock of *Anaplasma marginale*. *Trop. Anim. Health Prod.*, v. 23, p. 197-202, 1991.

Tebele, N.; McGuire, T.C.; Palmer, G.H. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infect. Immun.*, v. 59, p. 3199-3204, 1991.

Theiler, A. *Anaplasma marginale* (gen. spec. nov.). The marginale points in the blood of cattle suffering from a specific disease. In: Theiler, A. (ed) *Report of the government veterinary bacteriologist, 1908-9*, Transvaal, South Africa, 1910. p. 7-64.

Theiler, A. Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. In: Theiler, A. (ed) *1st Report of the director of Veterinary Research*, Department of Agriculture of the Union of South Africa, 1911. p. 7-46

Torres-Cruz, J.; van der Woude, M.W. Slipped-Strand mispairing can function as a phase variation mechanism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* v. 185, p. 6990–6994, 2003.

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*. *Infect Immun.*, 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*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 9, p.417-424, 2002.

van Belkum, A.; Scherer, S.; van Alphen, L.; Verbrugh, H. Shortsequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 62, p. 275–293, 1998.

Varma, M.G.R.; Pudney, M.; Leaky, C.J. The establishment of three cell lines from the tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) and their infection with some arbovirus. *J. Med. Entomol.*, v.11, n. 6, p. 698-706, 1975.

Vidotto, O.; Marana, E.R.M. Diagnóstico em anaplasmosse bovina. *Ciência Rural*, v. 31, p. 361-368, 2001.

Visser, E.; McGuire, T.; Palmer, G.; Davis, W.; Shkap, V.; Pipano, E.; Knowles, D. The *Anaplasma marginale msp5* gene encodes a 19-KD protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. ***Infect. Immun.***, v. 60, p. 5139-5144, 1992.

Wright, I.G. Immunodiagnosis of and immunoprophylaxis against the haemoprotozoa *Babesia* sp. and *Anaplasma* sp. in domestic animals. *Vet. Sci. Tech. O.I.E.*, v. 9, n.2, p. 345-356, 1990.

Zaugg, J.L. Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stages of gestation. ***Am. J. Vet. Res.***, v.46, p. 570-572, 1985.

Zaugg, J.L.; Kuttler, K.L. Bovine anaplasmosis: in utero transmission and the immunologic significance of ingested colostrum antibodies. ***Am. J. Vet. Res.***, v. 45, p.440-443, 1984.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Verificar se há exclusão quando bovinos são infectados com o isolado UFMG2 de *A. marginale* e posteriormente com o UFMG1;
- Caracterizar molecularmente as proteínas principais de superfície (MSPs) dos isolados de *A. marginale* brasileiros UFMG1 e UFMG2;
- Avaliar a dinâmica de produção e as classes e subclasses de imunoglobulinas dos bovinos infectados com os isolados UFMG1 e UFMG2;
- Imunizar animais a campo com o isolado UFMG1 de *A. marginale* e desafiá-los naturalmente.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)