



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

***Mycobacterium bovis* BCG EXPRESSANDO O ANTÍGENO Msp1A DE
Anaplasma marginale: UMA VACINA CANDIDATA CONTRA ANAPLASMOSE
BOVINA**

ANDRE MICHELON

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. Odir Antônio Dellagostin, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, para obtenção do título de Mestre em Ciências (M.Sc.).

**PELOTAS
Rio Grande do Sul – Brasil
Julho de 2005**

ANDRE MICHELON

***Mycobacterium bovis* BCG EXPRESSANDO O ANTÍGENO Msp1A DE
Anaplasma marginale: UMA VACINA CANDIDATA CONTRA ANAPLASMOSE
BOVINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, para obtenção do título de Mestre em Ciências (M.Sc).

Comitê examinador:

Prof. Odir Dellagostin, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Fábio Leivas Leite, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Telmo Vidor, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Fabrício Rochedo Conceição, Universidade Federal de Pelotas

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, pela oportunidade da vida e pelas oportunidades na vida!

Agradeço ao meu orientador Odir Antônio Dellagostin pela amizade, acima de tudo, e pelo exemplo profissional, dedicação e otimismo inesgotável.

Aos amigos do laboratório Alan, Cristina, Daiane, Fabiana, Fabrício, Francine, Gustavo, Luciano, Michel, Michele, Sandra, Sibebe, Suselaine, Reginaldo, Tessália e Valeska pela colaboração nos trabalhos e pelos momentos de amizade que passamos juntos.

À minha família, que sempre me apoiou, apesar da distância.

Aos amigos Luciane e Luciano, pela compreensão e apoio.

Ao meu irmão e amigo Marcelo pela paciência e companhia nesses anos todos.

Aos colegas, e amigos do Centro de Biotecnologia, pela amizade e apoio.

INDÍCE

SUMÁRIO.....	V
SUMMARY.....	VI
INTRODUÇÃO	1
1. A anaplasnose bovina.....	1
2. O agente etiológico <i>Anaplasma marginale</i>	2
3. Principais proteínas de superfície de <i>A. marginale</i>	4
4. Vacinas contra anaplasnose.....	7
4.1. Vacinas vivas	7
4.2. Vacinas inativadas.....	9
4.3. Desenvolvimento de novas vacinas	10
5. <i>Mycobacterium bovis</i> BCG	12
6. <i>Mycobacterium bovis</i> BCG recombinante.....	14
OBJETIVOS GERAIS.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
HIPÓTESE.....	20
MATERIAL E MÉTODOS.....	20
1. Cepas bacterianas	20
2. Animais experimentais.....	20
3. Clonagem de Msp1a nos vetores de expressão micobacteriana	20
4. Construção de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG Pasteur recombinante.....	21
5. Expressão de Msp1a em BCG	22
6. Expressão em <i>Escherichia coli</i> e purificação de Msp1a.....	23
7. Imunizações	24
8. Resposta imune estimulada por rBCG em camundongos.....	24
9. Análise estatística	26
RESULTADOS	27
1. Clonagem de <i>msp1a</i> nos vetores de expressão em micobacteria.....	27
2. Construção de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG Pasteur recombinante.....	28
3. Expressão em <i>Escherichia coli</i> e purificação de Msp1a.....	29
4. Resposta imune humoral estimulada por rBCG em camundongos....	31
5. Resposta imune celular estimulada por rBCG em camundongos	32
DISCUSSÃO	34
CONCLUSÕES	39
PERSPECTIVAS FUTURAS	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

SUMÁRIO

MICHELON, ANDRE. Universidade Federal de Pelotas, julho de 2005. ***Mycobacterium bovis* BCG expressando o antígeno Msp1a de *Anaplasma marginale*: uma vacina candidata contra anaplasmosse bovina.** Professor orientador: Odir Antônio Dellagostin.

A cepa vacinal *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur foi utilizada para expressar a proteína Msp1a de *Anaplasma marginale*. O gene *msp1a* foi amplificado por PCR, a partir de DNA de *A. marginale* extraído de eritrócitos bovinos, e clonado nos vetores pUS2000 e pMIP12, que, posteriormente foram utilizados para transformar BCG. Camundongos foram imunizados com BCG recombinante (rBCG), aos 0 e 21 dias de experimento, ficando os grupos distribuídos da seguinte maneira: salina (T1); BCG (T2); rBCG/pUS2000/*msp1a* (T3) e rBCG/pMIP12/*msp1a* (T4). Quarenta e dois dias após a 1ª inoculação (dpi), os camundongos dos tratamentos 3 e 4 desenvolveram resposta imune humoral contra o antígeno de Msp1a. Os resultados obtidos no ELISA demonstraram uma resposta de anticorpos máxima aos 63 dpi, sendo que o grupo 4 apresentou uma resposta maior que os demais grupos testados ($P < 0,001$). Da mesma forma, produção de interferon gama específica contra Msp1a foi detectada em células de baço de camundongos imunizados com rBCG aos 49 dpi, sendo que o grupo 3 apresentou maiores níveis dessa citocina em um ELISA. Anticorpos dos grupos T3 e T4 foram capazes de reconhecer Msp1a, na sua forma nativa, obtida de extrato de *A. marginale*, oriundo de eritrócitos de bovinos infectados com a riquetsia. Da mesma forma, o anticorpo monoclonal ANA22B1, específico para um epítipo de Msp1a, foi capaz de reconhecer rMsp1a, produzida por *Escherichia coli* e *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur. Apesar de não terem sido realizados testes em bovinos com essa vacina recombinante, rBCG, expressando Msp1a de *A. marginale* constitui-se numa potencial estratégia de imunização contra anaplasmosse bovina, motivando a continuidade dos estudos.

SUMMARY

MICHELON, ANDRE. Universidade Federal de Pelotas, julho de 2005. ***Mycobacterium bovis* BCG expressing Msp1a of *Anaplasma marginale*: a vaccine candidate against bovine anaplasmosis.** Professor orientador: Odir Antônio Dellagostin.

The vaccinal strain *Mycobacterium bovis* BCG was used to express Msp1a protein of *Anaplasma marginale*. The *msp1a* gene was amplified by PCR from *A. marginale* DNA extracted from bovine erythrocytes, cloned into pUS2000 and pMIP12 vectors, and then used to transform BCG. Mice were immunized with recombinant BCG on days 0 and 21 of the experiment. The groups were inoculated with saline solution (T1), BCG (T2), BCG/pUS2000/*msp1a* (T3) and BCG/pMIP12/*msp1a* (T4). Forty-two days post-inoculation (dpi), mice of treatment 3 and 4 developed humoral immune response against the Msp1a antigen. The ELISA showed an antibody response peak at 63 dpi. Mice of group 4 showed a higher immune response than other groups tested ($P < 0,001$). Specific interferon-gamma production against Msp1a was detected in splenocytes of mice immunized with rBCG at 49 dpi, and the group 4 showed the highest level of this cytokine in ELISA. Antibodies of groups 3 and 4 were able to recognize native Msp1a from erythrocyte extract from *A. marginale*. The monoclonal antibody ANA22B1, specific to a Msp1a epitope, was able to recognize rMsp1a, produced by *Escherichia coli* and BCG. The results obtained in this study places rBCG expressing Msp1a of *A. marginale* as a potential vaccine candidate against bovine anaplasmosis.

INTRODUÇÃO

1. A anaplasmosse bovina

A anaplasmosse bovina é uma doença hemolítica dos bovinos causada pela riquetsia *Anaplasma marginale* (*Rickettsiales: Anaplasmataceae*) (Kocan *et al.*, 2003; Dumler *et al.*, 2001; Kocan *et al.*, 2000) que se replica em eritrócitos bovinos e células de carrapato. A doença clínica é mais comum em bovinos, porém outros ruminantes incluindo búfalos, bisons e antílopes africanos podem ser infectados por *A. marginale* (Kuttler, 1984). Ocorre em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo sendo enzoótica na maioria das nações latino-americanas, com exceção de áreas desertas ou montanhosas como a região dos Andes (Guglielmone, 1995).

A doença causa importantes perdas econômicas em muitas nações, principalmente devido à alta morbidade e mortalidade em bovinos suscetíveis. As perdas são medidas através de vários parâmetros: diminuição do ganho de peso, redução na produção de leite, aborto, custo de medicamentos e mortalidade (McCallon, 1976).

A transmissão de *A. marginale* pode ocorrer mecanicamente através de picadas de insetos e fômites contendo sangue contaminado ou através de carrapatos, quando da hematofagia em animais portadores (Connell & Hall, 1972). Agulhas, equipamentos de descorna, instrumentos de castração e tatuagem são exemplos de fômites. Aproximadamente 20 espécies de carrapato têm sido incriminadas como vetores de transmissão (Dikmans, 1950), sendo que *Boophilus microplus* é uma das principais espécies. Transmissão mecânica por artrópodes hematófagos do gênero *Tabanus*, *Stomoxys* e mosquitos tem sido descrita. Esta forma é considerada a principal forma de transmissão mecânica de *A. marginale* em áreas da América do Sul, Central e África onde não existe a presença de carrapatos (Figueroa *et al.*, 1998). Também pode ocorrer transmissão transplacentária da fêmea para o feto (Zaugg & Kuttler, 1984; Zaugg, 1985).

A enfermidade se manifesta após um período de incubação de 20 a 40 dias, ocorrendo um incremento na riquetsemia onde os animais acometidos clinicamente podem apresentar quadros de anemia, perda de peso e letargia podendo, com o agravamento do quadro, evoluir para a morte. Isso se deve ao fato das infecções serem freqüentemente não diagnosticadas no período inicial e evoluírem rapidamente (Palmer *et al.*, 1986; Ristic, 1977). A infecção também pode induzir aborto em fêmeas gestantes (Fowler & Swift, 1975; Correa *et al.*, 2004). Bovinos que sobrevivem à infecção aguda desenvolvem infecção persistente caracterizada por riquetsemia intermitente (French *et al.*, 1999) (French *et al.*, 1998). Bovinos persistentemente infectados ou portadores têm imunidade duradoura e são resistentes à doença clínica ou ao desafio com cepas homólogas e parcialmente protegidos contra o desafio com cepas heterólogas (Kuttler *et al.*, 1984). Entretanto, esses animais servem como reservatório de *A. marginale*, já que tornam-se fontes de sangue contaminado para transmissão mecânica e por carrapatos (Abdala *et al.*, 1990; Agnirre *et al.*, 1998).

A soroprevalência de *A. marginale* varia muito entre as nações das Américas e sua variabilidade contribui para o desenvolvimento de regiões enzoóticas geograficamente instáveis ou estáveis.

2. O agente etiológico *Anaplasma marginale*

Anaplasma marginale é um parasita intraeritrocitário que se multiplica dentro de vacúolos ou colônias no citoplasma dos eritrócitos.

Este parasita foi inicialmente descrito na África do Sul por Theiler, em 1910, tendo o primeiro registro em continente americano sido realizado por Boynton no ano de 1928 num surto de bovinos no estado da Califórnia (EUA). Por vários anos, o *Anaplasma* foi discutido como sendo uma fase do ciclo de vida de organismos da família *Piroplasmidae*, produtos de reações ou corpos de Jolly, ou ainda como sendo organismos originais e individualmente classificados (Dias & Aragão, 1914).

O eritrócito é o único local de infecção de *A. marginale* em bovinos (Ristic & Watrach, 1963). Dentro dessas células, as inclusões na membrana (também chamados de corpúsculos iniciais) contém 4 a 8 riquetsias e 70% ou mais eritrócitos podem ser infectados durante a fase aguda (Richey, 1981). Os eritrócitos infectados são fagocitados pelas células reticuloendoteliais resultando no aparecimento de anemia leve a severa e icterícia sem hemoglobinemia e hemoglobinúria (Ristic, 1977).

Ao parasitar carrapatos, *A. marginale* desenvolve um complexo ciclo de desenvolvimento que é coordenado pelo ciclo de hematofagia através de picadas. Após a infecção das células intestinais do carrapato ocorre uma extensiva multiplicação da riquetsia dentro de colônias, nas quais o primeiro estágio é a forma reticulada, que se divide por fissão binária. As formas reticuladas subsequentemente mudam para as formas densas, que são o estágio infectivo e podem sobreviver extracelularmente. Após isso, o patógeno invade e se multiplica nas glândulas salivares de onde ocorre a transmissão através de picadas. A fêmea do carrapato *Dermacentor* é responsável pela infecção persistente por *A. marginale*, pois pode parasitar vários animais repetidamente (Kocan *et al.*, 1992).

Os organismos da ordem *Rickettsiales*, da qual pertence *A. marginale*, foram recentemente reclassificados baseados em características biológicas e análises genéticas dos genes do rRNA 16S, *groESL* e genes de proteínas de superfície – *major surface proteins* (MSP). Essas análises filogenéticas proporcionaram a formação de quatro distintos gêneros dentro da família *Anaplasmataceae*: (i) *Anaplasma*, com 96,1% de similaridade mínima; (ii) *Ehrlichia*, com 97,7%; (iii) *Wolbachia*, 95,6% e (iv) *Neorickettsia*, 94,9%. Organismos pertencentes à família *Rickettsiaceae* (gêneros *Rickettsia* e *Orientia*) são bactérias intracelulares obrigatórias que crescem livremente dentro do citoplasma de células eucarióticas. Os organismos da família *Anaplasmataceae* também são intracelulares obrigatórios e são encontrados exclusivamente dentro de vacúolos ligados a membrana no citoplasma das células hospedeiras. Além disso, muitos dos organismos dessa família multiplicam-se em vertebrados e invertebrados, principalmente carrapatos e trematódeos (Dumler *et al.*, 2001).

Existem três espécies de *Anaplasma* que infectam ruminantes: *A. marginale*, *A. marginale* subespécie *centrale* e *A. ovis*. A *centrale* é menos

patogênica para bovinos e tem sido usada como vacina viva em Israel, Austrália, África e América do Sul, sendo que, a infecção com este organismo pode, ocasionalmente, causar doença clínica. *A. ovis* é um patógeno de ovinos e não estabelece infecção persistente em bovinos (Dumler *et al.*, 2001).

O genoma de *A. marginale* é circular e seu tamanho está estimado em 1,2 a 1,6 Mb. Os estudos dos últimos 20 anos têm objetivado a identificação das proteínas de superfície de *A. marginale*. Seis MSP (principal proteína de superfície), MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5 já foram identificadas e a informação sobre a sequência dos genes, proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais e monoespecíficos, variabilidade dos isolados e possíveis usos em diagnóstico ou vacina já está disponível; (Alleman *et al.*, 1993; Meeus & Barbet, 2001).

3. Principais proteínas de superfície de *A. marginale*

Estudos demonstram que a expressão de proteínas de superfície pelas riquetsias varia de acordo com as condições ambientais e o tipo de célula hospedeira. Essas proteínas estão envolvidas na invasão da célula hospedeira e na geração de variantes antigênica, contribuindo para o estabelecimento de uma infecção persistente (Unver *et al.*, 2001; Unver *et al.*, 2002)

MSP1a, MSP4 e MSP5 são codificadas por um único gene, enquanto que MSP1b, MSP2 e MSP3 são codificadas por várias cópias de genes. Apenas uma cópia do gene *msp1a* foi encontrada no mesmo *locus* cromossomal de isolados testados em experimentos que investigaram a sua existência no genoma (Allred *et al.*, 1990).

MSP1a e MSP1b são dois polipeptídeos que contém pontes dissulfeto e ligações não covalentes (Arulkanthan *et al.*, 1999), formam o complexo MSP1, e são conservados em *A. marginale* derivados de eritrócitos bovinos e células de carrapato (Garcia-Garcia *et al.*, 2004b).

MSP1a possui massa molecular variável nos diferentes isolados geográficos devido a diferentes números de repetições de 28 ou 29 aminoácidos

na porção amino terminal da proteína (Allred *et al.*, 1990; de la Fuente *et al.*, 2003b; de la Fuente *et al.*, 2003c). Devido a variação dessa porção repetitiva, o gene *msp1a* tem sido usado como marcador de seleção genética estável para identificação de isolados de *A. marginale* (Allred *et al.*, 1990; de la Fuente *et al.*, 2001c) e se mantém conservado durante a multiplicação da riquetsia em carrapatos e eritrócitos bovinos (Bowie *et al.*, 2002).

Um epítipo neutralizado pelo anticorpo monoclonal Ana22B1 foi demonstrado na região repetitiva de MSP1a (Palmer *et al.*, 1987) e pareceu ser conservado entre diversos isolados de *A. marginale* (Palmer *et al.*, 1987; de la Fuente *et al.*, 2003b; de la Fuente *et al.*, 2001c). A estrutura mínima para ligar Ana22B1, definida por ELISA, foi uma sequência de 6 aminoácidos Gln – Ala – Ser – Thr – Ser – Ser ou Glu – Ala – Ser – Thr – Ser – Ser (Allred *et al.*, 1990).

Embora altamente carregado, o domínio repetitivo de MSP1a não contém aminoácidos positivos (Garnier *et al.*, 1978) e está composto por segmentos invertidos e enrolados com presenças de curtos epítipos hidrofílicos (Hopp & Woods, 1981). Isto contrasta com o restante do polipeptídeo que possui um alto conteúdo de conformação em hélice. Além disso, um pico de hidropaticidade (Kyte & Doolittle, 1982) revelou a presença de cinco regiões hidrofóbicas, sendo que as últimas quatro são suficientes em tamanho e hidrofobicidade para servir como domínio de transmembrana. Essa porção repetitiva é necessária e suficiente para se aderir a eritrócitos bovinos e células de carrapato (de la Fuente *et al.*, 2003b) e está envolvida na infecção e transmissão de *A. marginale* por carrapatos do gênero *Dermacentor* (de la Fuente *et al.*, 2001b) contribuindo com a imunidade de bovinos contra *A. marginale* (de la Fuente *et al.*, 2001b; Brown *et al.*, 2001a).

Estudos de hemaglutinação e ensaios de adesão em eritrócitos bovinos e cultivo de células de carrapato ou nativas utilizando *Escherichia coli* recombinante demonstraram que MSP1a funciona como adesina. Por sua vez, MSP1b tem função de adesina em eritrócitos bovinos e não provou possuir essa função em células de carrapato (McGarey & Allred, 1994a; McGarey *et al.*, 1994b; de la Fuente *et al.*, 2001a; de la Fuente *et al.*, 2003b).

Estudos recentes sugerem que a expressão de níveis diferentes de moléculas de adesão de *A. marginale* pode afetar a infectividade da riquetsia para

eritrócitos, e como MSP1a é uma adesina para células de carrapato e eritrócitos bovinos, esta expressão diferenciada pode influenciar na infectividade de *A. marginale* para essas células (Konkel & Tilly, 2000).

Contudo, bovinos imunizados com *A. marginale* obtidos de eritrócitos, desenvolveram uma resposta imune preferencialmente direcionada a MSP1a, enquanto que aqueles imunizados com cultivo celular de *A. marginale* responderam principalmente contra MSP1b. Além disso, a imunização com MSP1a recombinante, em combinação com o cultivo celular, estimulou a produção de altos títulos de anticorpos contra MSP1a (Garcia-Garcia *et al.*, 2004b). Estudos anteriores a esse demonstraram que os anticorpos contra MSP1a reduziram a infecção por *A. marginale* (de la Fuente *et al.*, 2003b) sugerindo que a resposta contra essa proteína de superfície pode ser importante no desenvolvimento de imunidade protetora e redução da infecção por carrapatos.

É possível que a associação entre MSP1a e MSP1b no complexo MSP1 permita ao parasita maior eficiência de ligação a eritrócitos ou componentes celulares de carrapatos. MSP1a pode ser uma subunidade essencial no reconhecimento dos receptores presentes nas células do carrapato, enquanto que a ligação ao receptor de eritrócitos poderia ser mediada primariamente por MSP1b ou por ambas as subunidades protéicas. Além disso, a associação entre MSP1a e MSP1b pode estabilizar e/ou permitir a correta conformação do complexo MSP1 (McGarey *et al.*, 1994b).

O controle coordenado de recombinação desses genes contribui para a evasão da resposta imune do hospedeiro pelo patógeno. Esse evento pode ocorrer espontaneamente e freqüentemente, permitindo a seleção de variantes que escapam do sistema imune. Os pseudogenes recombina no gene *msh2* gerando novas seqüências hipervariáveis e novas variantes antigênicas durante a multiplicação da bactéria (de la Fuente *et al.*, 2001a).

4. Vacinas contra anaplasmoses

As medidas de controle da anaplasmoses bovina não têm sofrido alterações marcantes nos últimos 60 anos. Elas variam de acordo com a localização geográfica e incluem o controle do artrópode pela aplicação de acaricidas, administração de antibióticos ou pela vacinação. O controle de artrópodes não é praticável em muitas áreas e pode somente prevenir parcialmente a transmissão de *A. marginale*, a qual ocorre pela transmissão mecânica de sangue infectado via insetos e fômites ou biológica via carrapato. A quimioterapia é muito dispendiosa e seu uso intensivo favorece o aparecimento de cepas resistentes da bactéria (Kocan *et al.*, 2000).

Imunidade mediada por anticorpos contra anaplasmoses é particularmente importante devido à falta de estágios parasitários suscetíveis a citotoxicidade mediada por células (Brayton *et al.*, 2002).

A vacinação tem sido a maneira mais econômica e efetiva para se controlar a anaplasmoses bovina em todo o mundo. As vacinas contra a anaplasmoses podem ser divididas em dois grupos principais: vivas e inativadas. Ambos os tipos induzem resposta imune protetora que reduz ou previne a doença clínica, mas estas vacinas não impedem que os animais tornem-se persistentemente infectados com *A. marginale*. Infecções persistentes em bovinos contribuem para a disseminação do patógeno, já que esses animais servem de reservatórios de infecção para a transmissão mecânica ou como fontes de infecção para carrapatos.

4.1. Vacinas vivas

O uso de vacinas vivas no controle da anaplasmoses foi iniciado por Sir Arnold Theiler, em 1900, e continua sendo a vacina de eleição em muitos locais do mundo (Palmer *et al.*, 1986). Essas vacinas envolvem a infecção de bovinos via inoculação de eritrócitos infectados com uma cepa menos patogênica de *A.*

marginale ou *A. centrale*. Para a produção da vacina, terneiros esplenectomizados experimentalmente inoculados com cepas definidas são mantidos sob condições de quarentena e servem como fonte de sangue infectado. Os animais vacinados desenvolvem infecções persistentes que provocam uma imunidade protetora de longo prazo, sendo que revacinações dificilmente são necessárias (Theiler, 1911; Abdala *et al.*, 1990). Estratégias de vacinação usando organismos vivos incluem (i) infecção e tratamento, (ii) vacinas vivas contendo cepas atenuadas de *A. marginale*, e (iii) vacinas vivas contendo *A. centrale*.

A. centrale, isolada por Theiler, é menos patogênica para bovinos que *A. marginale* e, os animais infectados com aquela cepa desenvolvem imunidade protetora contra infecção por *A. marginale*. Esta cepa de *A. centrale* continua sendo usada para a produção de vacinas em várias partes do mundo incluindo África, Austrália, Israel e América Latina. *A. centrale* e *A. marginale* compartilham epitopos imunodominantes que podem ser a chave do mecanismo de proteção induzido por *A. centrale* (Ristic & Carson, 1977). Estudos têm demonstrado que a variação antigênica de MSP2 ocorre durante a infecção persistente de *A. centrale* de maneira similar àquela descrita para *A. marginale*. Além disso, epitopos de células T CD4⁺ são conservados entre essas duas espécies, os quais contribuem para a reação cruzada estimulada pelas vacinas vivas baseadas em *A. centrale* (Shkap *et al.*, 1991).

Outros estudos sugerem que bovinos são infectados por somente um genótipo de *A. marginale* (Shkap *et al.*, 2002; de la Fuente *et al.*, 2003c). Usando o genótipo de *msh1a* como marcador, somente um genótipo por animal foi encontrado em raças de bovinos oriundos de áreas endêmicas onde muitos genótipos foram detectados (Shkap *et al.*, 2002). Esse fenômeno de exclusão de infecção foi demonstrado em outro experimento no qual bovinos que foram inoculados simultaneamente com dois isolados de *A. marginale* tornaram-se infectados por somente um isolado, aparentemente excluindo o outro (Palmer *et al.*, 2001). Esse mesmo fenômeno foi demonstrado em cultivo de células de carrapato infectadas com *Anaplasma* e carrapatos naturalmente infectados. Inoculação de células cultivadas com dois isolados de *A. marginale* resultou no estabelecimento de somente um dos isolados. Entretanto, outros experimentos

demonstraram que bovinos vacinados com *A. centrale* tornaram-se, mais tarde, infectados com *A. marginale*, sugerindo que o fenômeno de exclusão da infecção não ocorre em todas as espécies de *Anaplasma spp.* ou ocorre em animais infectados por isolados da mesma espécie. O mecanismo de exclusão da infecção de isolados de *A. marginale* ainda não está completamente elucidado e pode ser diferente em bovinos infectados e carrapatos (de la Fuente *et al.*, 2002a).

4.2. Vacinas inativadas

As vacinas inativadas continuam sendo testadas e ainda são usadas em muitas regiões. Elas têm algumas vantagens sobre as vacinas vivas. Baixo risco de contaminação com agentes infecciosos indesejáveis; baixo custo de armazenamento; e reações de pós-inoculação de baixa relevância clínica são algumas delas. As desvantagens das vacinas inativadas incluem a necessidade de revacinações, o alto custo de purificação de *A. marginale* a partir de eritrócitos bovinos e a falta de proteção cruzada entre os isolados de regiões geográficas distantes. Além disso, a imunidade protetora estimulada por essas vacinas é geralmente menor que aquela estimulada pelas vacinas vivas. A primeira vacina inativada comercializada para o controle da anaplasmoze utilizou *A. marginale* obtido de eritrócitos hemolizados em um antígeno que foi liofilizado e combinado com um adjuvante oleoso, no momento da inoculação (de la Fuente *et al.*, 2003a).

Porém, essa vacina apresentou alguns problemas como contaminação com estroma de eritrócitos que levou a formação de isoanticorpos eritrocíticos e, conseqüentemente, anemia hemolítica nos animais que ingeriram colostro de fêmeas com altos títulos desses anticorpos (Brock *et al.*, 1965). Essa vacina foi retirada do mercado em 1999.

Recentemente, um sistema de cultivo celular de *A. marginale* foi desenvolvido onde a riquetsia é propagada numa cultura contínua da linhagem celular IDE8, derivada do embrião do carrapato *Ixodes scapularis* (Lohr *et al.*, 2002). O ciclo de desenvolvimento da bactéria foi similar aquele encontrado em carrapatos infectados naturalmente (Munderloh *et al.*, 1996). *A. marginale* obtido

do cultivo celular permaneceu infectivo para bovinos e carrapatos (Lohr *et al.*, 2002). As seis MSPs caracterizadas em *A. marginale* a partir de eritrócito bovino permaneceram conservadas no cultivo celular e a composição antigênica permaneceu a mesma após sucessivas passagens nesse cultivo ou após a passagem em carrapatos (Blouin & Kocan, 1998; Barbet *et al.*, 1999; Barbet *et al.*, 2001).

Esse sistema se baseia na infecção e transformação de IDE8, com posterior crescimento de grandes colônias de *A. marginale*, que são liberadas e invadem as células vizinhas. Após vários ciclos de infecção, as bactérias são novamente liberadas e o fenômeno citopático torna-se aparente. Após a liberação de todas as riquetsias, a cultura acaba por ser destruída (Munderloh *et al.*, 1996; Lohr *et al.*, 2002).

Entretanto, apesar dos avanços no desenvolvimento de vacinas e da introdução das vacinas derivadas de cultivo celular, este procedimento requer uma investigação mais detalhada para avaliar o efeito da sua combinação com antígenos recombinantes, visando melhorar a eficácia desta vacina no que diz respeito a conferir proteção contra a infecção por *A. marginale* e o bloqueio da transmissão biológica do patógeno.

4.3. Desenvolvimento de novas vacinas

O sucesso das novas vacinas contra anaplasmoses usando a tecnologia molecular vai depender da sua habilidade em mimetizar ou redirecionar a resposta do hospedeiro durante infecções naturais ou bloqueio da infecção (Kocan *et al.*, 2003).

Proteínas de membrana externa do estágio eritrocítico de *A. marginale* tem sido o foco das pesquisas com vacinas contra anaplasmoses bovina. A razão para este fato é que as proteínas externas são expostas na superfície, facilmente acessadas pelo sistema imune e essenciais a sobrevivência do parasita no hospedeiro (Arulkanthan *et al.*, 1999). Esses resultados reforçam a hipótese de que essas proteínas podem ser usadas como componentes de vacinas recombinantes visando o controle de *A. marginale*.

Um modelo de vacina proposto induz imunidade protetora na qual a remoção do patógeno é realizada por anticorpos contra epitopos de superfície em combinação com ativação de macrófagos para otimização da fagocitose. A peça central deste modelo são as células T CD4⁺ expressando interferon gama, as quais aumentam a síntese de imunoglobulina G (IgG), subclasse IgG2, e concomitantemente, ativam macrófagos fazendo aumentar a expressão de receptores, fagocitose, fusão fagolisossômica e liberação de óxido nítrico. Esse estudo demonstrou que a indução dessas respostas usando proteínas de membrana purificadas preveniram riquetsemia em experimentos de desafio (de la Fuente *et al.*, 2001a). MSP1a também foi reconhecida por linfócitos T CD4⁺. A região carboxi-terminal dessa proteína, que é conservada entre os isolados de *A. marginale*, foi preferencialmente reconhecida por essas células do sistema imune. Entretanto, embora as células T CD4⁺ sejam importantes, a resposta humoral parece ser essencial (Brown *et al.*, 1998).

Contudo, os mecanismos de imunidade protetora contra anaplasmoose bovina ainda não são completamente entendidos. Porém, sabendo-se que *A. marginale* é um hospedeiro intraeritrocítico, o envolvimento de moléculas de MHC classe I restritas a respostas de linfócitos T citotóxicos na proteção é improvável já que eritrócitos maduros não expressam moléculas de MHC. Entretanto, conforme demonstrado para outros parasitas, incluindo *Plasmodium spp.*, *Leishmania major* e *Toxoplasma gondii*, linfócitos T auxiliar, especialmente aqueles que produzem citocinas tipo II, podem ser importantes na eliminação da infecção por *A. marginale*, através da ativação de macrófagos e aumento da síntese de óxido nítrico (Liew, 1993).

Testes vacinais tem sido conduzidos com MSPs recombinantes (Palmer & McElwain, 1995; Camacho-Nuez *et al.*, 2000) e vacina de DNA (Arulkanthan *et al.*, 1999). Apenas proteção parcial tem sido obtida com a utilização desses antígenos recombinantes, indicando que uma combinação de vários antígenos poderá ser a estratégia para o estímulo de uma resposta imune protetora eficaz.

Outros testes demonstraram que a infecção de células de carrapato por *A. marginale* foi inibida por anti-soro bovino ou de coelho contra MSP1a e MSP1b recombinantes. Apesar do anti-soro de coelho ter sido produzido utilizando MSPs desnaturadas, a infecção das células de carrapatos foram inibidas em níveis

similares àqueles obtidos com o soro bovino contra proteínas recombinantes ou nativas. Estes resultados sugerem que a conformação dessas proteínas não é essencial para a formação de anticorpos neutralizantes (Blouin *et al.*, 2003).

A vacina ideal para anaplasmosse bovina deveria prevenir a riquetsemia, bem como, induzir imunidade protetora. As vacinas atuais não previnem a infecção e os animais persistentemente infectados aparecem como principais reservatórios de *A. marginale*, servindo como fonte de infecção para transmissão mecânica e biológica por carrapatos. Portanto, o bloqueio da transmissão biológica de *A. marginale* é uma importante característica de uma vacina contra anaplasmosse. Resultados de estudos *in vitro* sugerem que anticorpos contra MSP1a recombinante reduzem a infectividade por *Dermacentor variabilis* (Kocan *et al.*, 2003).

5. **Mycobacterium bovis BCG**

Em 1906, na França, Albert Calmette e Camille Guérin, iniciaram experimentos com o objetivo de atenuar uma cepa virulenta de *Mycobacterium bovis*. Após 13 anos de estudos onde realizaram 230 passagens sucessivas em meio com batata, glicerina e bile, esses pesquisadores observaram uma mudança morfológica na cultura e a partir desse momento, passaram a testar a virulência dessa cepa. Subseqüentes estudos utilizando camundongos, macacos, cobaios e bovinos, demonstraram a manutenção da capacidade de infecção, porém total atenuação dessa cepa. Em 1921, a cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* foi administrada oralmente a uma criança em Paris. A criança vacinada permaneceu livre de tuberculose, apesar do alto risco de contrair a doença de seus familiares. Após isso, o bacilo atenuado continuou sendo administrado experimentalmente a seres humanos, sendo que em 1928 o *Mycobacterium bovis* Bacilo de Calmette - Guérin (BCG) foi oficialmente recomendado pela liga das Nações como uma vacina contra tuberculose humana, constituindo-se da vacina viva mais administrada a humanos (Lugosi, 1992).

Desde 1921, várias cepas derivaram da vacina *M. bovis* BCG original e foram denominadas pelo país ou laboratório de onde foram propagadas. Mais de 50 sub-cepas de BCG são conhecidas, mas somente seis estão atualmente em uso como vacina: BCG Connaught, BCG Glaxo, BCG Moreau, BCG Pasteur, BCG Tokyo, BCG Danish (Milstien & Gaido, 1989; Lagranderie *et al.*, 1996; Bloom & Fine, 1994).

BCG é a única vacina comercial e oficialmente disponível contra a tuberculose. Estima-se que cerca de 3 bilhões de pessoas tenham sido vacinadas com BCG em todo o mundo desde 1928, constituindo-se na vacina viva atenuada mais administrada a humanos. BCG apresenta várias vantagens que o habilitam a ser usado como uma vacina: pode ser administrado em qualquer momento após o nascimento, pois não sofre a interferência de anticorpos maternos; uma única administração induz uma imunidade de longa duração; BCG é uma das vacinas vivas mais estáveis; é segura; e BCG apresenta baixo custo de produção quando comparado com outras vacinas vivas. Entretanto, apesar de inúmeras vantagens, a eficácia do BCG contra tuberculose permanece uma questão de intenso debate (Hart & Sutherland, 1977).

Estudos de observação têm demonstrado que BCG confere, em média, 50% de proteção contra tuberculose humana. Porém, este índice oscila grandemente, variando de 75% no Japão e Inglaterra (Hart *et al.*, 1977) à total ausência de proteção na Argentina e Colômbia. No Brasil, a eficiência do BCG no combate a tuberculose humana varia de 25 a 90% (Rodrigues & Smith, 1990). Uma imunidade protetora contra tuberculose implica necessariamente na ativação de linfócitos CD4⁺ com produção de interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- α), portanto, uma resposta do tipo T auxiliar 1 (Chan & Kaufmann, 1994) . Entretanto, alguns indivíduos vacinados com BCG desenvolvem uma resposta do tipo T auxiliar 2, com produção de IL-4 e supressão da resposta T auxiliar 1. Esta observação explica, em parte, as falhas do BCG em conferir uma melhor proteção contra tuberculose em alguns indivíduos (Bloom *et al.*, 1992; Chan *et al.*, 1994).

A vacinação com BCG geralmente induz a um estado de hipersensibilidade a antígenos micobacterianos solúveis, o qual é demonstrado através do teste de tuberculina (PPD). O teste de tuberculina vem sendo utilizado como uma forma de

detectar indivíduos vacinados com BCG, ou diagnosticar prévio contato com antígenos micobacterianos em indivíduos não vacinados. Todavia, não há evidências associando hipersensibilidade à tuberculina com proteção contra tuberculose (Mogues *et al.*, 2001).

6. *Mycobacterium bovis* BCG recombinante

Nos últimos anos, muitos avanços têm sido feitos no que diz respeito à manipulação genética de micobactérias. Estes incluem o estabelecimento de protocolos de transformação em micobactérias, geração de vetores bifuncionais (shuttle vectors) para uso em *E. coli* e micobactéria, desenvolvimento de vários sistemas de expressão, incluindo diferentes promotores e sistemas de apresentação de antígenos (Hart *et al.*, 1967; Jacobs, Jr. *et al.*, 1987; Husson *et al.*, 1990; Matsuo *et al.*, 1990). Isso permitiu a avaliação de BCG recombinante como veículo de apresentação de antígenos heterólogos. Vários estudos já demonstraram a viabilidade de BCG em expressar antígenos heterólogos de bactérias, vírus, parasitas e de toxinas com bastante êxito (Snapper *et al.*, 1988).

Uma grande variedade de proteínas de vírus, bactérias ou de parasitas tem sido expressa por BCG recombinante induzindo forte resposta imune humoral e celular contra vários antígenos, com respostas proliferativas específicas e produção de citocinas, em camundongos, após a imunização oral e sistêmica (Ohara & Yamada, 2001).

Em um trabalho pioneiro, pesquisadores introduziram DNA exógeno em micobactérias. Neste estudo, seqüências de DNA do micobacteriófago TM4, isolado de *M. avium*, foram ligadas a um cosmídio de *E. coli*. A referida molécula recombinante foi introduzida em *E. coli*, BCG e *M. smegmatis* onde foi demonstrada a sua replicação na forma de cosmídio em *E. coli* e na forma de bacteriófago em micobactérias. Este trabalho demonstrou a possibilidade de introduzir DNA exógeno e expressar genes heterólogos em micobactérias (Jacobs *et al.*, 1987a). Desde então, diversos grupos têm trabalhado e refinado a tecnologia de expressar antígenos heterólogos em micobactérias (Dellagostin *et al.*, 1993). Em outro trabalho, foi desenvolvido um sistema para expressão e

secreção de antígenos heterólogos em micobactérias usando o promotor e sequência sinal do gene do antígeno α do *M. kansasii* (Jacobs *et al.*, 1987b). A construção de vetores plasmidiais para expressão heteróloga em micobactérias usando os elementos de replicação do pAL5000 isolado de *M. fortuitum* foi relatada em outro trabalho (Stover *et al.*, 1991). Um sistema de expressão integrativo contendo duas cópias da sequência de inserção IS900 flanqueando um gene de resistência a canamicina em vetor suicida também foi desenvolvido (Aldovini & Young, 1991). Outros sistemas de expressão têm sido desenvolvidos utilizando promotores e seqüências sinais específicos de micobactérias (Connell *et al.*, 1993; Langermann *et al.*, 1994).

A expressão da proteína OspA de *Borrelia burgdorferi* na superfície de BCG produziu uma vacina que induziu imunidade humoral e levou a proteção contra desafio subsequente em camundongos (Edelman *et al.*, 1999).

A indução de resposta imune após inoculação com BCG recombinante (rBCG) foi primeiramente relatada por Stover *et al.* (1991) e Aldovini & Young (1991). No primeiro trabalho foram desenvolvidos dois sistemas para expressão heteróloga em BCG, um sistema plasmidial multicópias e outro integrativo. Utilizando estes dois sistemas, os genes da β -galactosidase, toxina tetânica e transcriptase reversa, *gag*, *env* e *pol* do HIV-1 foram expressos em BCG sob o controle dos promotores dos genes *hsp60* e *hsp70* de micobactéria. No outro trabalho, foi utilizado um sistema plasmidial multicópias para expressar em BCG os genes *gag*, *pol* e *env* do HIV-1 sob controle do promotor do gene *hsp70* de micobactéria. Ambos estudos relatam o desenvolvimento de imunidade humoral e celular contra os antígenos heterólogos em camundongos imunizados com rBCG. Da mesma forma, outros grupos de pesquisadores tem relatado a indução de resposta imune contra antígenos heterólogos após imunização com rBCG (Winter *et al.*, 1991b; Streit *et al.*, 2000).

A primeira evidência de imunidade protetora induzida por rBCG foi demonstrada por Stover *et al.* (1993). Neste estudo, uma resposta imune humoral protetora foi desencadeada em camundongos imunizados com rBCG expressando o antígeno OspA de *Borrelia burgdorferi*. Subseqüentemente, outros estudos foram publicados demonstrando o desenvolvimento de imunidade

protetora após inoculação com rBCG (Aldovini *et al.*, 1991; Winter *et al.*, 1991b; Ohara *et al.*, 2001).

A característica de BCG de induzir reação positiva ao teste de tuberculina em indivíduos vacinados tem desencorajado o uso desta bactéria como uma vacina recombinante em animais. Entretanto, o recente desenvolvimento de mutantes auxotróficos que não induzem reação positiva à tuberculina reacendeu o interesse sobre esta micobactéria atenuada abrindo possibilidades para seu uso em animais (Chambers *et al.*, 2000). Além disso, a descoberta de antígenos presentes em BCG nativo, e ausentes na cepa vacinal têm permitido a diferenciação entre animais vacinados e naturalmente infectados. Entre esses antígenos, destacam-se MPB59, MPB64, MPB70, MPB83, ESAT-6, CFP-10, Acr1, e PstS-1. Um estudo verificou um aumento na resposta imune contra o antígeno MPB83 após tuberculinização do rebanho, porém, houve uma correlação negativa com a proteção induzida por BCG, permitindo a diferenciação entre animais vacinados daqueles que não receberam a vacina.

Portanto, apesar de BCG não poder ser utilizada como vacina em rebanhos bovinos brasileiros pelo fato de induzir reação positiva à tuberculinização, caracterizando o animal como portador da micobactéria, levando-o ao abate, estudos vêm abrindo possibilidades que podem tornar possível a utilização dessa vacina no futuro. Assim sendo, a estratégia de imunização utilizando BCG expressando antígeno de *A. marginale*, aqui apresentada, pode, no futuro, tornar-se uma alternativa no controle da anaplasmoze bovina.

OBJETIVOS GERAIS

- Expressar o antígeno Msp1a, de *Anaplasma marginale*, em *Escherichia coli* e *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur;
- Analisar a resposta imune humoral e celular em camundongos imunizados com BCG expressando Msp1a;
- Avaliar a capacidade dos anticorpos estimulados por BCG em reconhecer Msp1a na sua forma nativa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar e expressar Msp1a em BCG;
- Demonstrar a expressão de MSP1a em BCG;
- Avaliar a resposta imune humoral e celular dos camundongos imunizados com rBCG expressando Msp1a;
- Avaliar a capacidade de reconhecimento de Msp1a nativa pelos anticorpos estimulados por rBCG expressando Msp1a.

HIPÓTESE

Mycobacterium bovis BCG Pasteur expressando Msp1a de *Anaplasma marginale* é capaz de estimular uma resposta imune humoral e celular específica em camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Cepas bacterianas

Escherichia coli cepa JM109 (Promega) e DH5 α (Life Technologies) foram crescidas em meio Luria Broth (Difco) a 37 °C sob agitação de 250 rpm. *Mycobacterium bovis* BCG cepa Pasteur 1173P2 foi crescida em frascos de cultivo de 25 cm² sem agitação a 37 °C em meio líquido Middlebrook 7H9 (Difco) suplementado com 10% de complexo de enriquecimento albumina-dextrose (ADC), 0,05% Tween 80 e 0,2% de glicerol. Os cultivos de *E. coli* foram suplementados com 50 μ g/ml de canamicina e os de micobactéria com 25 μ g/ml do mesmo antibiótico.

2. Animais experimentais

Camundongos BALB/c fêmeas (4 semanas de idade), adquiridos do Biotério da Universidade de São Paulo (USP) foram usados neste estudo. Os animais foram alojados no Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPeI) durante todo o experimento.

3. Clonagem de Msp1a nos vetores de expressão micobacteriana

Dois diferentes plasmídios de expressão micobacteriana foram usados: pMIP12 e pUS2000. Ambos são de expressão citoplasmática, contêm um sítio de múltipla clonagem, origens de replicação em *E. coli* e micobactéria e gene de resistência a canamicina, diferindo apenas nos promotores, sendo que pMIP12 possui promotor do gene da β -lactamase de *Mycobacterium fortuitum* (pBlaf*) e pUS2000 promotor da proteína de 18 kDa de *Mycobacterium leprae*. Para detectar a expressão da proteína recombinante foi utilizado o anticorpo

monoclonal (MAb) Ana22B1 (Department of Veterinary Microbiology and Pathology, Washington State University) que reconhece uma região de 28 aminoácidos repetitiva localizada na extremidade N-terminal de Msp1a. Para clonagem, DNA de *A. marginale* isolado de campo foi extraído com kit Puregene (Gentra, USA) conforme instruções do fornecedor. O gene *msp1a*, com 1959 pb, foi amplificado utilizando os seguintes oligonucleotídeos: (5'-CGTTAATCGATCGATTACCT-3') e (5'-TATCGTAGTCAGTACGTAGCGG-3'). A clonagem em pMIP12 foi realizada utilizando os oligonucleotídeos *forward* e *reverse* contendo sítios para as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I, respectivamente, sendo que para o vetor pUS2000 utilizou-se a enzima *Bam*HI. As reações de PCR foram realizadas com enzima *Taq* DNA polimerase (Gibco-BRL) e DNA de *A. marginale* como molde, em termociclador (Perkin Elmer 2400) usando 30 ciclos de 1 min de desnaturação (94 °C), 1 min de anelamento (55 °C) e 2 min de extensão (72 °C). Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose e as bandas de tamanho esperado foram purificadas do gel através do GFXTM PCR and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences), sendo então digeridas por 2h a 37 °C com as enzimas acima citadas. Após a digestão, *msp1a* foi clonado no vetor pCR2.1-TOPO (Invitrogen), seguido de sub-clonagem nos vetores previamente estabelecidos. Após isso, *E. coli* competente foi transformada com esses vetores recombinantes e os clones foram confirmados através de digestão e seqüenciamento. Os vetores recombinantes foram transformados em *M. bovis* BCG através de eletroporação, sendo que todas as manipulações de DNA foram realizadas conforme descrito por Sambrook & Russell, 2001.

4. Construção de *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur recombinante

Culturas de BCG foram crescidas até atingirem densidade ótica de 600 nm (DO₆₀₀) a 0.6, centrifugadas duas vezes a 4000 x *g* e ressuspensas em 1/20 do volume original em glicerol 10%. Uma alíquota de 200 µl dessas células foi misturada com 2 µl (300 µg) de DNA plasmidial em cubetas de eletroporação 0.2 cm (Bio-Rad). As micobactérias foram transformadas com os plasmídios recombinantes usando Gene Pulser (Bio-Rad) a 2.5 kV, 1000 Ω e 25 µF. Após a

transformação, 800 µl de meio de cultura Middlebrook 7H9 suplementado de 10% de complexo de enriquecimento albumina-dextrose (ADC), 0,05% Tween 80 e 0,2% de glicerol foram adicionados às células. Essa mistura foi incubada por 24h a 37 °C, 250 rpm. Posteriormente, as bactérias foram plaqueadas em meio sólido com 25 µg/ml de canamicina e incubadas por 21 dias a 37 °C. Colônias individuais, resultantes do crescimento em meio sólido, foram transferidas para meio líquido com o objetivo de avaliar a expressão de Msp1a.

5. Expressão de Msp1a em BCG

A expressão de Msp1a em BCG foi demonstrada através de Western blot (WB). Cinco mililitros de cada cultura de BCG recombinante foram coletados quando a DO₆₀₀ da cultura atingiu 0.6 através de dupla centrifugação a 4000 x g por 15 min, e ressuspendidas 0,05 M Tris-HCl pH7,4. Posteriormente, rompeu-se a parede micobacteriana utilizando ribolizador (Hybaid) e pérolas de vidro por 45 seg na potência 5. Tampão de corrida 1 X foi adicionado aos extratos de BCG, os quais foram incubados a 100 °C por 10 min. Após isso, os extratos foram centrifugados a 13.000 x g por 1 min e o material foi mantido a -20 °C até a hora do uso. Um total de 20 µg de proteínas micobacterianas foram separadas em gel de acrilamida 10% e eletrotransferidas para membrana PVDF. As membranas foram bloqueadas com solução de 5% de leite desnatado por 1h a 37 °C. Soro de camundongos ou MAb anti-Msp1a foram utilizados para a realização de WB. Mab foi utilizado numa diluição de 1/250 enquanto que os soros dos animais experimentais foram utilizados nas diluições de 1/50 ou 1/20. Após isso, as membranas foram expostas a anticorpo anti-Ig total de camundongo conjugado com enzima peroxidase (Sigma) na diluição de 1/4000. Os ensaios foram desenvolvidos utilizando método quimioluminescente (ECLTM - Amersham Biosciences).

6. Expressão em *Escherichia coli* e purificação de Msp1a

Para que fosse possível a avaliação da resposta imune humoral através de ELISA foi necessário a expressão de rMsp1a em *E. coli*. rMsp1a foi obtida utilizando-se o plasmídeo pAE, que possui um resíduo de 6 histidinas a jusante do promotor T7, e a cepa de *E. coli* DE3 pLYsS (Invitrogen). pAE foi clivado com a enzima *Hind*III e submetido à reação com o fragmento Klenow da DNA polimerase I para adição dos nucleotídeos A e G, tornando essa extremidade compatível com *Xba*I. Posteriormente, pAE foi clivado com *Bam*HI. O vetor pUS2000/*msp1a*, previamente construído em nosso laboratório, foi utilizado como molde para amplificar o gene *msp1a* através de PCR com os primers Msp1aF (5'-GAAGATCTGGATCCGCAGAGTATGT-3') e Msp1aR (5'-GCTCTAGATCACCTAGTGTCCGAAGGCT-3'). A reação de PCR foi realizada em termociclador Perkin-Elmer 2400TM usando 35 ciclos de 1 min de desnaturação (95 °C), anelamento (65 °C) e extensão (72 °C). O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose e a banda de tamanho esperado foi purificada do gel através do GFXTM PCR and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences), sendo então digerida com *Xba*I. Posteriormente, os nucleotídeos C e T foram adicionados através de DNA polimerase de Klenow, e então o produto de PCR foi novamente clivado com *Bgl*II. pAE-*Bam*HI/*Hind*III+AG foi ligado a *msp1a*-*Bgl*II/*Xba*I+CT através de DNA ligase por 2 horas a 16 °C, gerando o plasmídeo pAE/*msp1a* que foi utilizado para transformar *E. coli* JM109 através de eletroporação, sendo os clones recombinantes selecionados através de digestão e seqüenciamento. Uma colônia oriunda de um clone recombinante foi expandida em meio LB líquido adicionado de ampicilina (50 µg/ml) e pAE/*msp1a* foi purificado através de kit GFXTM. O vetor purificado foi transformado em *E. coli* DE3 pLYsS que foram plaqueadas em meio sólido. Uma colônia foi selecionada, expandida em meio líquido e induzida com IPTG 1 mM visando a expressão de rMsp1a. Após centrifugação a 10000 rpm por 5 minutos a 4 °C, as células foram rompidas através de sonicação, novamente centrifugadas e o sobrenadante contendo rMsp1a foi submetido a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Frações do processo de purificação foram

separadas em gel de agarose 1,5% sendo que as amostras que continham rMsp1a foram quantificadas através de método de Bradford e congeladas a -70 °C com 20% de glicerol.

7. Imunizações

BCG não transformado e rBCG expressando Msp1a no citoplasma micobacteriano foram crescidos em meio de cultura 7H9 enriquecido com 10% de ADC com ou sem 25 µg/ml de canamicina, respectivamente. As bactérias foram quantificadas por espectrofotometria na DO₆₀₀, e inoculadas em camundongos. Quarenta fêmeas BALBc, com 4 semanas de idade, foram divididas em 4 tratamentos, 10 animais por tratamento, e imunizados com solução salina (T1), BCG não transformada (T2), BCG/pUS2000/*msp1a* (T3) e BCG/pMIP12/*msp1a* (T4) com duas doses, sendo a primeira no dia 0 e a segunda no dia 21 pós-inoculação. Os animais foram inoculados por via intraperitoneal (IP) com 10⁶ unidades formadoras de colônia (UFC) de BCG em 100 µl de PBS-Tween 0,05%. A expressão de MSP1a em BCG foi confirmada por Western Blot (WB) antes da inoculação nos animais.

8. Resposta imune estimulada por rBCG em camundongos

Após a imunização, a presença de anticorpos contra Msp1a no soro de camundongos foi analisada pelos ensaios de ELISA e WB. Para os ensaios de ELISA, placas de poliestireno foram sensibilizadas com 10 µg/ml de rMSP1a por 16 horas a 4 °C. Após isso, as placas foram lavadas 3 vezes com TNT (10 mM Tris-base, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) e o soro dos animais experimentais, diluído em TNT, foi adicionado na diluição de 1/50. As placas com os soros foram mantidas a 37 °C por 1 hora, sendo que, após esse período, novamente foram lavadas 3 vezes em TNT. Posteriormente, adicionou-se anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase na diluição 1/4000, em TNT e manteve-se as placas a 37 °C por 1 hora. Após isso, as placas foram lavadas 5 vezes em TNT e o

substrato (2 mg de OPD, 0,01 % peróxido de hidrogênio e 5 ml tampão citrato-fosfato pH 4,2) foi adicionado, seguindo-se incubação em câmara escura por 15 minutos. A leitura foi realizada em leitor de ELISA no comprimento de onda de 450 nm.

Para os ensaios de WB, 15-20 µg de rMsp1a ou 50 µg de extrato de *A. marginale* foram separados por eletroforese em gel de acrilamida 10% e eletrotransferidos para uma membrana de PVDF. Após saturação com 5% de leite desnatado, a membrana foi incubada com o soro dos animais experimentais diluídos 1/10 em TNT por 1 hora a 37 °C. Após lavagem em TNT, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com peroxidase ou fosfatase alcalina. Os complexos imunes foram revelados usando método quimioluminescente (ECLTM; Amersham Biosciences).

Para avaliação da resposta imune celular, esplenócitos dos camundongos vacinados foram isolados e avaliados por ELISA para detectar a produção de IFN-γ. Os animais foram sacrificados aos 49 e 72 dias pós-inoculação (dpi) e seus baços foram removidos assepticamente. Suspensão de células foram obtidas ao pressionar suavemente o tecido sobre uma tela de aço. As células foram então ressuspensas em 10 ml de PBS e centrifugadas 10 minutos a 2.000 rpm. Todas as centrifugações seguiram esse mesmo padrão. Posteriormente, as células foram novamente lavadas em 10 ml de PBS estéril, centrifugadas e ressuspensas em 40 ml de Tris-NH₄Cl, visando lisar hemácias. Após incubação de 10 minutos a 37 °C, as células foram novamente centrifugadas, sendo os esplenócitos contados e plaqueados na concentração de 10⁷ células/ml em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Difco). Os esplenócitos foram mantidos a 37 °C por 48h e, posteriormente, foram sensibilizados com 10, 50 ou 100 µg/ml de extrato total de *A. marginale* ou 10 µg/ml de LPS de *Leptospira spp.* Após incubação de 72 horas, os sobrenadantes foram coletados e a produção de IFN-γ foi determinada usando um kit de ELISA comercial de acordo com as instruções do fabricante.

9. Análise estatística

Os resultados dos ensaios sorológicos e da produção de IFN- γ em camundongos imunizados foram comparados utilizando o software Statistix 8.0. O valor de P menor que 0,05 foi considerado significativo.

RESULTADOS

1. Clonagem de *msp1a* nos vetores de expressão em micobactéria

O gene *msp1a* foi amplificado através de PCR e, posteriormente, foi purificado e digerido com as enzimas de restrição *Xba*I e *Pst*I para confirmar a presença do inserto. O produto de PCR foi ligado nos vetores de expressão em micobactéria pMIP12 e pUS2000, previamente digeridos com as enzimas *Bam*HI/*Kpn*I e *Bam*HI, respectivamente, originando pMIP12/*msp1a* e pUS2000/*msp1a*. O mapa desses vetores recombinantes e suas características estão demonstrados na figura 1. Após a ligação e transformação em *Escherichia coli* JM109, os vetores foram purificados, seqüenciados e utilizados para transformar células de *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur.

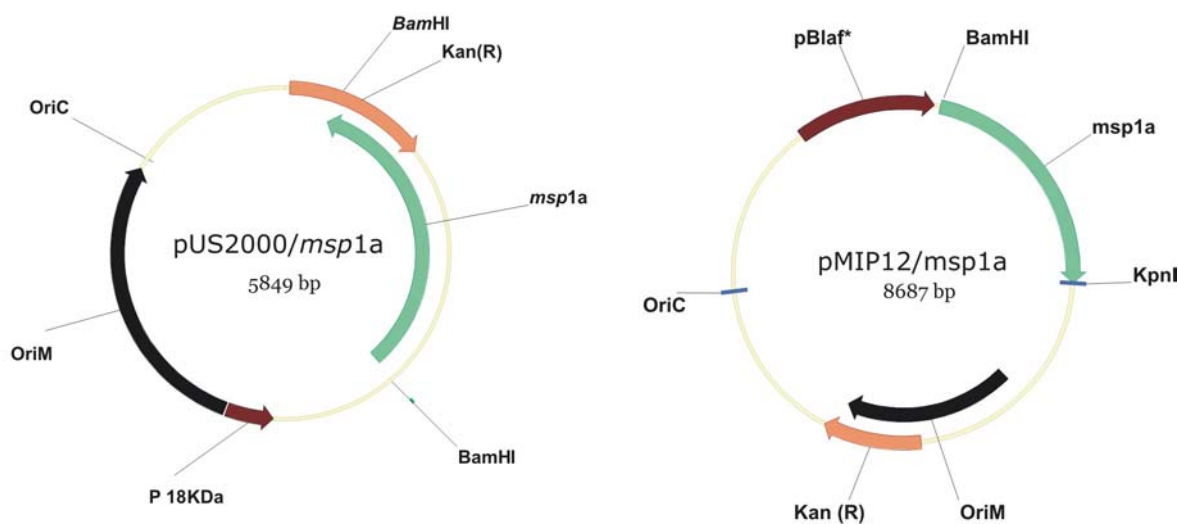


FIGURA 1. Mapa dos vetores pMIP12/*msp1a* e pUS2000/*msp1a*

2. Construção de *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur recombinante

A cepa *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 1173P2 foi multiplicada e transformada com os plasmídios pMIP12/*msp1a* e pUS2000/*msp1a* através de eletroporação. Após crescimento em meio sólido, colônias de BCG foram multiplicadas e a expressão de Msp1a foi demonstrada através de Western blot em ambas as construções através da utilização de MAb Ana22B1, conforme demonstrado na figura 2. Uma banda de aproximadamente 75 kDa foi observada nas cepas de BCG transformadas com os vetores recombinantes. Na coluna 3, foi observado outra banda de tamanho superior ao esperado. Isto pode ter ocorrido devido a modificações pós-traducionais da proteína ou devido a reações cruzadas com o extrato de *A. marginale*. Uma colônia transformada com cada um dos vetores foi escolhida para imunizar os animais.

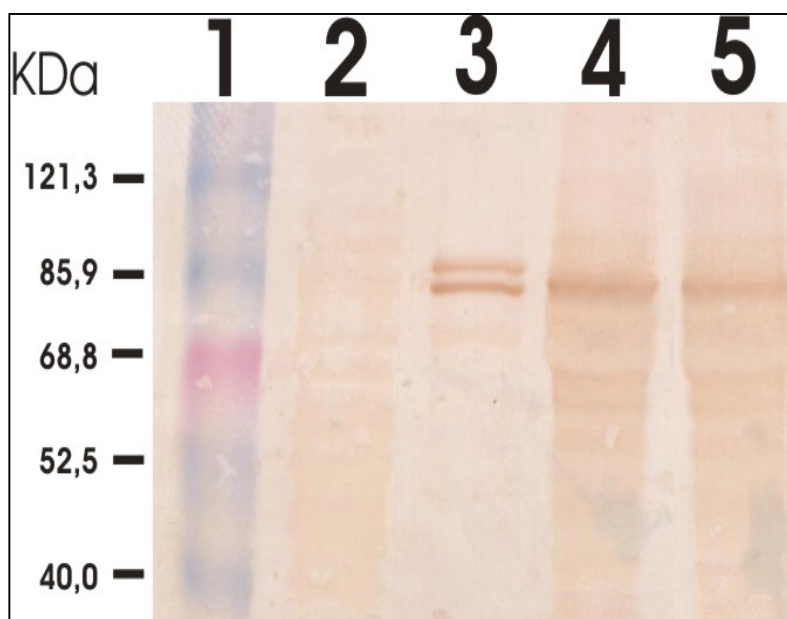


FIGURA 2. Detecção de Msp1a em *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur através do MAb Ana22B1. Coluna 1, marcador de massa molecular; coluna 2, BCG não transformada; coluna 3, extrato de *Anaplasma marginale*; coluna 4, *M. bovis* BCG/pUS2000/*msp1a*; coluna 5, *M. bovis* BCG/pMIP12/*msp1a*.

3. Expressão em *Escherichia coli* e purificação de Msp1a

Msp1a recombinante foi obtida através da transformação de *Escherichia coli* DE3 pLYsS com o vetor pAE/msp1a. Para isso, amplificou-se através de PCR uma região de 1.253 pb presente na porção amino-terminal do gene *msp1a*. O produto de PCR resultante foi digerido com as enzimas *Bgl*II/*Xba*I e ligado ao vetor pAE previamente digerido com as enzimas *Bam*HI/*Hind*III. O plasmídeo resultante foi transformado em *E. coli* DE3 pLYsS, e a expressão de Msp1a foi testada em pequena escala. Um clone, expressando Msp1a, foi escolhido para purificação da proteína em larga escala. Essa colônia foi expandida em 50 ml de meio líquido, sonificada e submetida a cromatografia de afinidade em coluna de níquel no aparelho AktaPRIME. Frações resultantes foram analisadas através de Western blot utilizando MAb ANA22B1 e a banda de tamanho esperada (~55 kDa) foi observada, conforme demonstra a figura 3. A proteína MSP1a possui uma região extremamente hidrofóbica na extremidade amino terminal e sua expressão em *E. coli* só foi conseguida após a remoção dessa região. Dessa forma, a proteína recombinante obtida em *E. coli* possui massa molecular maior do que aquela obtida em BCG.

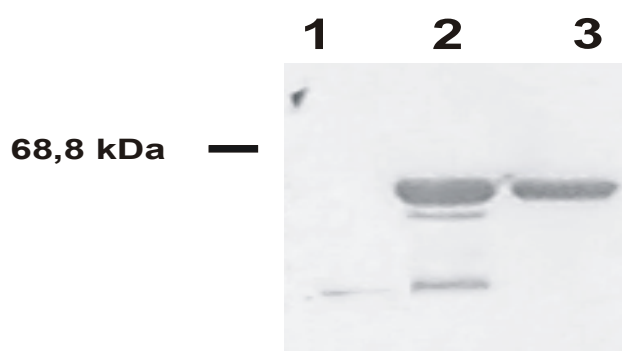


FIGURA 3. Western blot com MAb Ana22B1 da purificação de Msp1a por cromatografia de afinidade em coluna de níquel (Mab ANA22B1). Coluna 1, rOMPL1 (*Leptospira interrogans*); coluna 2, *pellet* da cultura de *E. coli* DE3 pLYsS sonificada, coluna 3, sobrenadante da cultura de *E. coli* DE3 pLYsS sonificada.

Para verificar se os soros dos animais experimentais reconheciam a proteína recombinante expressa por *E. coli* DE3 pLYsS, rMsp1a foi confrontada através de Western blot com os soros experimentais. Conforme esperado, o soro (dia 0 e pool das demais coletas) dos animais imunizados com solução salina e BCG não transformada, bem como aqueles obtidos no dia 0 (zero) dos grupos vacinados com *M. bovis* BCG/pMIP12/*msp1a* ou pUS2000/*msp1a* não reagiram com rMsp1a, enquanto que o pool das coletas dos dias 21 a 184 dos dois últimos grupos citados revelou uma banda específica de tamanho correspondente a proteína recombinante (~55 kDa). A figura 4 mostra os resultados obtidos nesse ensaio.

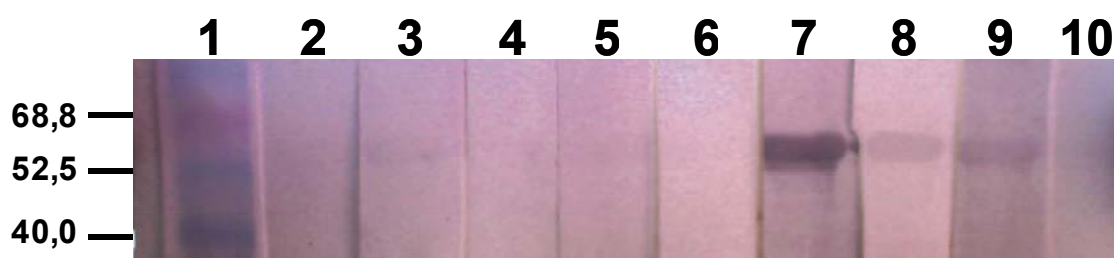


FIGURA 4. Western blot utilizando rMsp1a e soros dos animais experimentais. Coluna 1, marcador de peso molecular; coluna 2 e 3, grupo imunizado com solução salina (dias 0 e pool das demais coletas, respectivamente); colunas 4 e 5, grupo imunizado com *M. bovis* BCG não transformada (dia 0 e pool das demais coletas, respectivamente); colunas 6 e 7, grupo imunizado com *M. bovis* BCG/pUS2000/*msp1a* (dia 0 e pool das demais coletas, respectivamente); coluna 8, Mab ANA22B1; coluna 9, grupo imunizado com *M. bovis* BCG/pMIP12/*msp1a* (pool das coletas dos dias 21 a 184) e coluna 10, grupo imunizado com *M. bovis* BCG/pMIP12/*msp1a* dia 0.

4. Resposta imune humoral estimulada por rBCG em camundongos

Quatro grupos de camundongos BALB-c fêmea receberam inoculações de *M. bovis* BCG não transformado, *M. bovis* BCG/pUS2000/*msp1a*, *M. bovis* BCG/pMIP12/*msp1a* e solução salina no dia 0 e 21. Coletas de sangue dos animais experimentais foram realizadas a cada 21 dias e resposta humoral contra Msp1a, expressa por BCG nos camundongos, foi avaliada através de ELISA e Western blot. Os resultados de ELISA demonstraram que a administração intraperitoneal de 10^6 UFC/ml de rBCG expressando Msp1a foi suficiente para estimular uma resposta imune em camundongos aos 42 dias de experimento (26 unidades de ELISA). A resposta estimulada por pUS2000 foi significativamente maior que aquela estimulada por pMIP12, a partir dos 42 dias sendo que, após esse período, a resposta humoral permaneceu estável até os 184 dias. Como esperado, os grupos inoculados com solução salina e BCG não transformada demonstraram uma resposta fraca ou inespecífica (~1,5 unidades de ELISA) à rMSP1a. Esses resultados podem ser observados na figura 5.

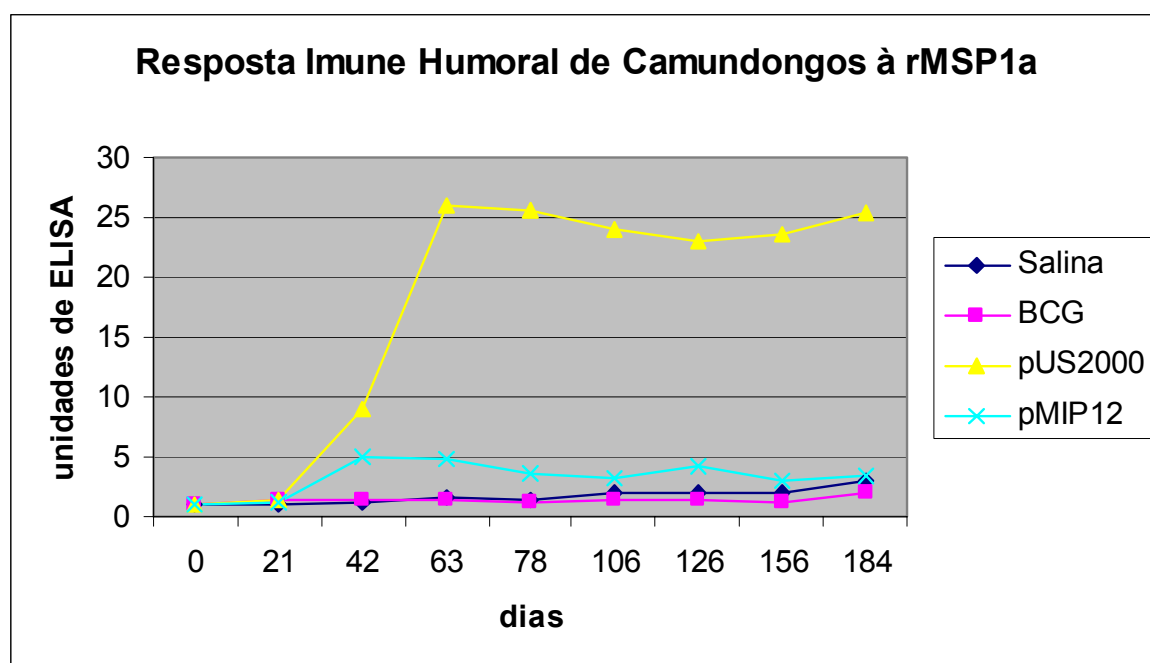


FIGURA 5. Resposta imune humoral de camundongos à rMSP1a

A capacidade dos soros experimentais reconhecerem a proteína Msp1a (~75 kDa) na forma nativa também foi testada. Para isso, extrato de *A. marginale* foi extraído de sangue de animal esplenectomizado e experimentalmente infectado e confrontado com os soros experimentais através de Western blot. Apenas o MAb ANA22B1 e o pool de soros dos dias 42 a 184 dos grupos imunizados com *M. bovis* BCG/pMIP12 e pUS2000 reagiram com Msp1a nativa demonstrando a capacidade de anticorpos estimulados por rMSP1a expressa por BCG em reconhecer a proteína de *A. marginale* na sua forma nativa. Esses resultados podem ser observados na figura 6.

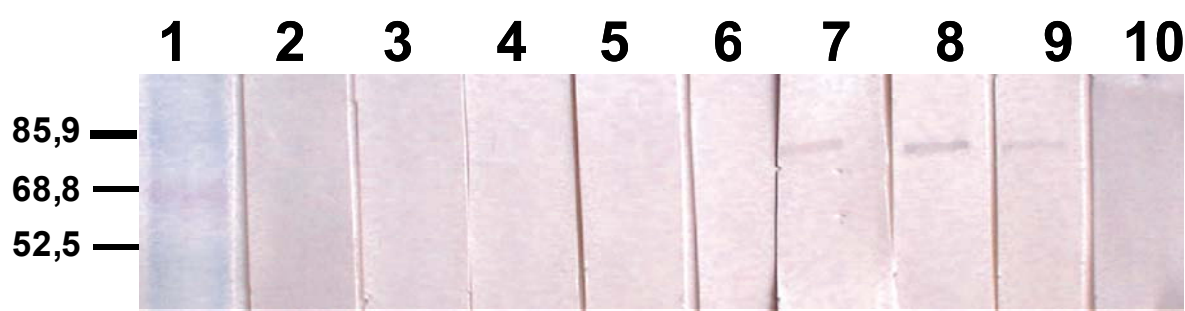


FIGURA 6. Western blot utilizando Msp1a nativa e soros dos animais experimentais. Coluna 1, marcador de peso molecular; coluna 2 e 3, grupo imunizado com solução salina (dias 0 e pool das demais coletas, respectivamente); colunas 4 e 5, grupo imunizado com *M. bovis* BCG não transformada (dia 0 e pool das demais coletas, respectivamente); colunas 6 e 7, grupo imunizado com *M. bovis* BCG/pUS2000 (dia 0 e pool das demais coletas, respectivamente); coluna 8, Mab ANA22B1; coluna 9, grupo imunizado com *M. bovis* BCG/pMIP12 (pool das coletas dos dias 21 a 184) e coluna 10, grupo imunizado com *M. bovis* BCG/pMIP12 dia 0.

5. Resposta imune celular estimulada por rBCG em camundongos

Para avaliação da resposta imune celular, esplenócitos dos camundongos vacinados foram isolados e avaliados para detectar a produção de IFN- γ , aos 49 dias pós-inoculação (dpi). Os esplenócitos foram sensibilizados com extrato total

de *A. marginale* ou LPS de *Leptospira spp.* Após incubação, os sobrenadantes foram coletados e a produção de IFN- γ foi determinada usando um kit de ELISA comercial de acordo com as instruções do fabricante. Produção de IFN- γ não foi detectada no sobrenadante do grupo imunizado com solução salina enquanto que o sobrenadante do grupo vacinado com *M. bovis* BCG/pMIP12 apresentou maiores níveis de IFN- γ quando comparado ao grupo imunizado com *M. bovis* BCG/pUS2000. Esses resultados podem ser observados na figura 7.

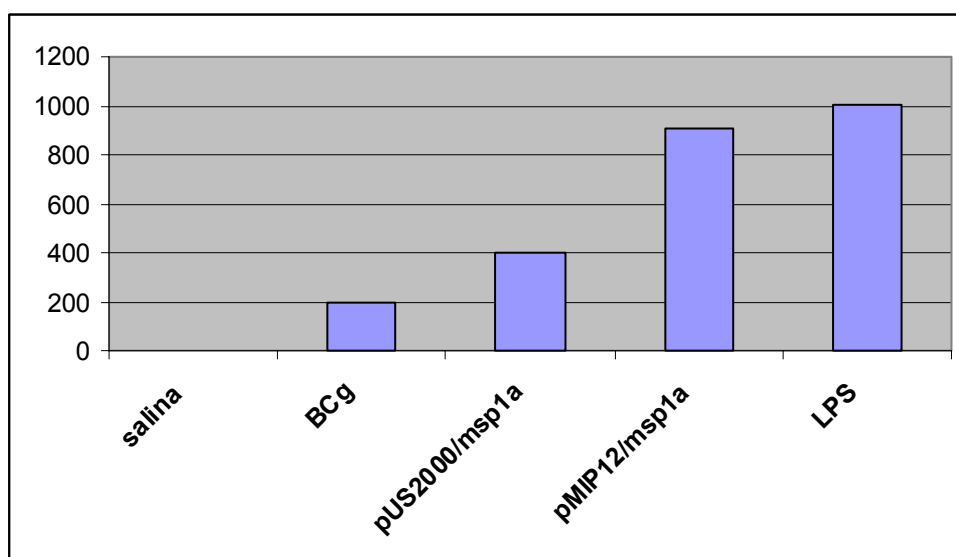


FIGURA 7. Produção de IFN- γ por esplenócitos de camundongos imunizados com BCG/*msp1a*.

DISCUSSÃO

Anaplasmosose é uma doença hemolítica dos bovinos causada por *Anaplasma marginale* que tem sido controlada através de vacinas inativadas produzidas a partir de eritrócitos bovinos infectados (de la Fuente *et al.*, 2002b). Essas vacinas reduzem os sintomas clínicos, mas são de produção dispendiosa, difíceis de padronizar e não estimulam proteção cruzada entre os isolados de diferentes regiões geográficas onde *A. marginale* é endêmico. Além disso, as vacinas derivadas de eritrócitos oferecem o risco de contaminação com patógenos que freqüentemente causam infecções persistentes em bovinos (Palmer & Wright, 1989; Kocan *et al.*, 2000).

O complexo MSP1 (principal proteína de superfície 1), formado pelas proteínas MSP1a e MSP1b, de *A. marginale* tem afinidade pelos receptores de eritrócitos bovinos e células de carrapato, tornando-se assim, uma importante via de infecção pela riquetsia. Experimentos utilizando Mab's contra MSP1a neutralizaram a infecção de eritrócitos bovinos *in vivo* (Allred *et al.*, 1990; Palmer *et al.*, 2001; Bowie *et al.*, 2002). No presente estudo, uma estratégia de imunização experimental contra anaplasmosose foi desenvolvida e testada. *M. bovis* BCG foi geneticamente modificada para expressar a proteína MSP1a de *A. marginale* no citoplasma bacteriano. Duas construções, utilizando promotores micobacterianos diferentes, foram testadas. Subseqüentemente, camundongos foram inoculados com as micobactérias recombinantes e a resposta imune humoral e celular contra MSP1a recombinante foram avaliadas.

Dois vetores de expressão micobacteriana foram utilizados nesse estudo: pMIP12 e pUS2000. Ambos os plasmídios possuem características em comum, sendo elas sítio de múltiplas clonagens, gene de resistência a canamicina, origem de replicação para *E. coli* e micobactérias. A principal diferença entre os dois vetores encontra-se no promotor de expressão, onde pMIP12 possui o promotor pBlaf* (do gene da β -lactamase de *Mycobacterium fortuitum*) e pUS2000 o promotor da proteína de 18 kDa de *Mycobacterium leprae*. Ambos os vetores

foram construídos e transformados em BCG que expressou rMSP1a eficientemente. Experimentos utilizando BCG recombinante expressando o antígeno β -galactosidase induziram uma forte resposta imune celular e humoral em camundongos, e desde então, esta bactéria tem sido utilizada para expressar proteínas heterólogas de vários organismos (Winter *et al.*, 1991b).

Os experimentos com vetores de expressão micobacteriana tem demonstrado muitas opções para a construção de rBCG baseadas em diferentes promotores e seqüências sinal. Além do promotor *hsp60*, amplamente utilizado (Stover *et al.*, 1991; Winter *et al.*, 1991b; Winter *et al.*, 1991a), os promotores dos antígenos pAN, pBlaf*, 18 kDa e 85A tem sido usados para dirigir a expressão de antígenos heterólogos em micobactérias (Dellagostin *et al.*, 1995; Kremer *et al.*, 1996). pBlaf* tem demonstrado ser um promotor de expressão muito forte em relação a outros promotores (Timm *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1999) enquanto que o promotor do antígeno de 18 kDa exibiu maiores níveis de expressão em células de macrófagos infectadas por BCG em comparação à células cultivadas em meio líquido. Esse último promotor possui uma região a montante da região – 35 que lhe confere máxima atividade promotora (Dellagostin *et al.*, 1995).

Das seis principais proteínas de superfície identificadas no estágio eritrocítico e no carrapato, MSP1, induziu imunidade protetora em bovinos desafiados com cepas heterólogas e homólogas de *A. marginale*. Além disso, MSP1 é reconhecido pelo sistema imune bovino após a infecção. MSP1a demonstrou estar envolvida na imunidade, adesão, infecção e transmissão do patógeno, sendo que sua principal característica é a presença de 28 – 29 peptídeos repetidos na extremidade amino-terminal da proteína, que variam entre isolados geográficos, mas permanecem constantes dentro de um mesmo isolado (Stover *et al.*, 1991; Palmer *et al.*, 1995; de la Fuente *et al.*, 2001a). Nessa região, MSP1a tem um epítipo neutralizante reconhecido pelo anticorpo monoclonal Ana22B1 (Palmer *et al.*, 1987). MSP1a demonstrou ser uma adesina para eritrócitos bovinos e células de carrapato (McGarey *et al.*, 1994b; Lee *et al.*, 1999).

O gene *msp1a* foi amplificado através de PCR e clonado nos plasmídios pUS2000 e pMIP12. Os plasmídios recombinantes foram seqüenciados e introduzidos em BCG para testar a expressão de MSP1a pelo vetor bacteriano.

MSP1a foi expressa eficientemente por BCG sob controle de ambos os promotores, *pBlaf** e 18 kDa, conforme tem demonstrado diversos estudos envolvendo a utilização desses promotores na expressão de antígenos heterólogos por BCG (Lee *et al.*, 1999; Timm *et al.*, 1994; Garcia-Garcia *et al.*, 2004a; Lagranderie *et al.*, 1997).

Anticorpos obtidos de camundongos imunizados com BCG recombinante expressando MSP1a foram capazes de reconhecer MSP1a na sua forma nativa demonstrando que a proteína recombinante manteve a estrutura antigênica do epítipo neutralizante presente nessa região, confirmando os resultados publicados em outro estudo (Garcia-Garcia *et al.*, 2004c).

A proteína MSP1a possui uma região extremamente hidrofóbica na extremidade amino-terminal (Allred *et al.*, 1990). No presente estudo, várias tentativas de expressão de MSP1a em *Escherichia coli* não obtiveram sucesso esperado. Porém, após a remoção dessa região hidrofóbica, conseguiu-se purificar a porção restante da proteína recombinante, onde estava o epítipo neutralizante. Em outro trabalho, a proteína *Env* do vírus da imunodeficiência dos símios só foi expressa após a remoção das seqüências hidrofóbicas. Esse trabalho relata que uma grande quantidade de regiões hidrofóbicas pode ser tóxica para células procarióticas (Leung *et al.*, 2000). Essa dificuldade não foi observada nesse estudo, durante a expressão de MSP1a por BCG.

Respostas imune humoral e celular tem sido demonstradas contra antígenos heterólogos em BCG (Stover *et al.*, 1991; Supply *et al.*, 1999; Leung *et al.*, 2000; Jabbar *et al.*, 2000; Nascimento *et al.*, 2000). Igualmente tem sido descrito que a expressão de antígenos heterólogos no citoplasma de BCG induz uma resposta predominantemente celular (Stover *et al.*, 1993; Himmelrich *et al.*, 2000) importante para o controle de *A. marginale*.

Camundongos imunizados com rBCG expressando MSP1a desenvolveram resposta imune humoral e celular, confirmadas por ELISA e Western blot, indicando que os antígenos foram adequadamente apresentados ao sistema imune. Duas inoculações com rBCG foram capazes de induzir respostas de anticorpos detectáveis a partir dos 42 dias após a primeira inoculação (dpi1), sendo essa resposta mantida até os 184 dpi1. Este resultado está de acordo com outros estudos onde títulos de anticorpos contra antígenos heterólogos foram

obtidos após duas inoculações com BCG (Mazzantini *et al.*, 2004). Nesse estudo, camundongos imunizados com BCG/rMSP1a sob ação dos promotores pUS2000 e pMIP12 desenvolveram resposta imune de 26 e 4,9 unidades de ELISA aos 63 dpi, respectivamente. Esses resultados demonstraram que pUS2000 foi capaz de estimular uma maior produção de anticorpos ($p < 0,05$) do que pMIP12.

O presente estudo avaliou a capacidade de rBCG induzir resposta imune celular em camundongos através da mensuração de IFN- γ e IL-4 em células de baço dos animais imunizados. Foi detectada a produção de IFN- γ nas células do baço, porém não foram encontrados níveis detectáveis de IL-4. Resposta imune do tipo T auxiliar 1, com produção de IFN- γ e TNF- α e supressão de IL-10 e IL-4 tem sido descritas após inoculação com rBCG (Nascimento *et al.*, 2000; Himmelrich *et al.*, 2000). Entretanto, a imunidade protetora em bovinos imunizados com MSP1 nativa está associada com opsonização e produção de anticorpos neutralizantes, onde linfócitos CD4⁺ participam através da produção de IFN- γ , o qual promove a formação de imunoglobulina G de alta afinidade e a ativação de células fagocíticas produtoras de óxido nítrico, importante na eliminação de microrganismos (Brown *et al.*, 2001b; Brown *et al.*, 2002). A avaliação da produção de IFN- γ pelas células esplênicas dos camundongos imunizados demonstrou que rBCG/pMIP12/*m*sp1a produziu uma maior quantidade dessa citocina em relação a rBCG/pUS2000/*m*sp1a. Porém, uma grande variação na resposta individual dentro dos grupos foi observada. Pesquisas utilizando camundongo como modelo experimental demonstraram que a resposta de anticorpos contra antígenos heterólogos expressos em BCG é controlada por fatores genéticos (Lagranderie *et al.*, 1997). Considerando que o mesmo princípio seja válido para a produção de citocinas e levando em conta a variabilidade genética dos animais utilizados nesse estudo, poderíamos explicar, pelo menos em parte, a variação na produção de IFN- γ .

Um dos maiores entraves a utilização de *M. bovis* BCG como vacina na área veterinária é a indução de positividade ao teste de tuberculina estimulado por BCG. Porém, nos últimos anos, observou-se o desenvolvimento de mutantes auxotróficos dessa bactéria, que não induzem reação positiva a tuberculina, o que torna esse sistema uma estratégia possível de ser utilizada na imunização de animais (Chambers *et al.*, 2000). Outros estudos têm identificado antígenos

específicos de *Mycobacterium bovis*, que não estão presentes em *M. bovis* BCG, o que torna possível a diferenciação entre infecção de campo e resposta vacinal (van Pinxteren *et al.*, 2000).

Esse experimento descreve uma estratégia vacinal baseada em BCG recombinante expressando o antígeno MSP1a de *Anaplasma marginale*. Os resultados obtidos demonstram que os camundongos imunizados com rBCG desenvolveram resposta imune humoral e celular específica contra MSP1a. Anticorpos oriundos desses animais foram capazes de detectar a presença da proteína em seu estado nativo num extrato de eritrócitos bovinos infectados por *A. marginale*. Apesar de não terem sido realizados testes de desafio utilizando *A. marginale* patogênica, os resultados encorajam ao prosseguimento dos estudos com rBCG, incluindo uma estratégia experimental com bovinos.

CONCLUSÕES

Mycobacterium bovis BCG Pasteur recombinante foi capaz de expressar a proteína Msp1a de *Anaplasma marginale*;

Msp1a recombinante, expressa por BCG, foi capaz de induzir uma resposta imune humoral e celular específica nos camundongos imunizados;

Os anticorpos oriundos da estimulação pelas vacinas recombinantes foram capazes de reconhecer Msp1a na sua forma nativa.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Realização de testes de desafio em bovinos buscando avaliar a capacidade protetora da vacina recombinante contra anaplasmoze bovina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdala,A.A., E.Pipano, D.H.Aguirre, A.B.Gaido, M.A.Zurbriggen, A.J.Mangold, and A.A.Guglielmone. 1990. Frozen and fresh *Anaplasma centrale* vaccines in the protection of cattle against *Anaplasma marginale* infection. **Revue d Elevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaux** 43:155-158.
- Agnirre,D.H., A.J.Bermúdez, A.J.Mangold, and A.A.Guglielmone. 1198. Infección natural con *Anaplasma marginale* en bovinos de raz Hereford, Criolla and Nelore en Tucumán, Argentina. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**:37-42.
- Aldovini,A. and R.A.Young. 1991. Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines. **Nature** 351:479-482.
- Alleman,A.R., S.M.Kamper, N.Viseshakul, and A.F.Barbet. 1993. Analysis of the *Anaplasma marginale* genome by pulsed-field electrophoresis. **Journal of General Microbiology** 139 (Pt 10):2439-2444.
- Allred,D.R., T.C.McGuire, G.H.Palmer, S.R.Leib, T.M.Harkins, T.F.McElwain, and A.F.Barbet. 1990. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:3220-3224.
- Arulkanthan,A., W.C.Brown, T.C.McGuire, and D.P.Knowles. 1999. Biased immunoglobulin G1 isotype responses induced in cattle with DNA expressing msp1a of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity** 67:3481-3487.
- Barbet,A.F., R.Blentlinger, J.Yi, A.M.Lundgren, E.F.Blouin, and K.M.Kocan. 1999. Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture, tick salivary glands, and cattle. **Infection and Immunity** 67:102-107.
- Barbet,A.F., G.H.Palmer, P.J.Myler, and T.C.McGuire. 1987. Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for polypeptide Am105L. **Infection and Immunity** n 55:2428-2435.
- Barbet,A.F., J.Yi, A.Lundgren, B.R.McEwen, E.F.Blouin, and K.M.Kocan. 2001. Antigenic variation of *Anaplasma marginale*: major surface protein 2 diversity during cyclic transmission between ticks and cattle. **Infection and Immunity** 69:3057-3066.
- Bloom,B.R. and P.Fine. 1994. The BCG experience: implications for future vaccines against tuberculosis. *In* **Tuberculosis: pathogenesis, protection and control**. ASM Press, Washington, D.C. 531-558.

- Bloom, B.R., R.L. Modlin, and P. Salgame. 1992. Stigma variations: observations on suppressor T cells and leprosy. **Annual Review of Immunology** 10:453-488.
- Blouin, E.F. and K.M. Kocan. 1998. Morphology and development of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in cultured *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) cells. **Journal of Medical Entomology** 35:788-797.
- Blouin, E.F., J.T. Saliki, F.J. de la Fuente, J.C. Garcia-Garcia, and K.M. Kocan. 2003. Antibodies to *Anaplasma marginale* major surface proteins 1a and 1b inhibit infectivity for cultured tick cells. **Veterinary Parasitology** 111:247-260.
- Bowie, M.V., F.J. de la Fuente, K.M. Kocan, E.F. Blouin, and A.F. Barbet. 2002. Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. **Gene** 282:95-102.
- Brayton, K.A., G.H. Palmer, A. Lundgren, J. Yi, and A.F. Barbet. 2002. Antigenic variation of *Anaplasma marginale* msp2 occurs by combinatorial gene conversion. **Molecular Microbiology** 43:1151-1159.
- Brock, W.E., I.O. Kliever, and C.C. Pearson. 1965. A vaccine for anaplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**:948-951.
- Brown, W.C., T.C. McGuire, W. Mwangi, K.A. Kegerreis, H. Macmillan, H.A. Lewin, and G.H. Palmer. 2002. Major histocompatibility complex class II DR-restricted memory CD4(+) T lymphocytes recognize conserved immunodominant epitopes of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a. **Infection and Immunity** 70:5521-5532.
- Brown, W.C., T.C. McGuire, D. Zhu, H.A. Lewin, J. Sosnow, and G.H. Palmer. 2001a. Highly conserved regions of the immunodominant major surface protein 2 of the genogroup II ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale* are rich in naturally derived CD4+ T lymphocyte epitopes that elicit strong recall responses. **Journal of Immunology** 166:1114-1124.
- Brown, W.C., G.H. Palmer, H.A. Lewin, and T.C. McGuire. 2001b. CD4(+) T lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* major surface protein 1 (MSP1), a heteromeric complex of MSP1a and MSP1b, preferentially recognize the MSP1a carboxyl terminus that is conserved among strains. **Infection and Immunity** 69:6853-6862.
- Brown, W.C., V. Shkap, D. Zhu, T.C. McGuire, W. Tuo, T.F. McElwain, and G.H. Palmer. 1998. CD4(+) T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. **Infection and Immunity** 66:5406-5413.
- Camacho-Nuez, M., M.M. de Lourdes, C.E. Suarez, T.C. McGuire, W.C. Brown, and G.H. Palmer. 2000. Expression of polymorphic msp1beta genes during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia. **Infection and Immunity** 68:1946-1952.

- Chambers,M.A., A.Williams, D.Gavier-Widen, A.Whelan, G.Hall, P.D.Marsh, B.R.Bloom, W.R.Jacobs, and R.G.Hewinson. 2000. Identification of a *Mycobacterium bovis* BCG auxotrophic mutant that protects guinea pigs against *M. bovis* and hematogenous spread of *Mycobacterium tuberculosis* without sensitization to tuberculin. **Infection and Immunity** 68:7094-7099.
- Chan,J. and S.Kaufmann. 1994. Immune mechanism of protection. *In* **Tuberculosis: pathogenesis, protection and control**. ASM Press, Washington, D.C. 398-415.
- Connell,M. and W.T.Hall. 1972. Transmission of *Anaplasma marginale* by the cattle tick *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal** 48:477.
- Connell,N.D., E.Medina-Acosta, W.R.McMaster, B.R.Bloom, and D.G.Russell. 1993. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guerin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 90:11473-11477.
- Correa,W.M., C.N.Correa, and A.F.Gottschalk. 2004. Bovine abortion associated with *Anaplasma marginale*. **Canadian Journal of Comparative Medicine** 42:227-228.
- de la Fuente,F.J., E.F.Blouin, and K.M.Kocan. 2003a. Infection exclusion of the rickettsial pathogen *Anaplasma marginale* in the tick vector *Dermacentor variabilis*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** 10:182-184.
- de la Fuente,F.J., J.C.Garcia-Garcia, E.F.Blouin, and K.M.Kocan. 2001a. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. **International Journal of Parasitology** 31:145-153.
- de la Fuente,F.J., J.C.Garcia-Garcia, E.F.Blouin, and K.M.Kocan. 2003b. Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells. **Veterinary Microbiology** 91:265-283.
- de la Fuente,F.J., J.C.Garcia-Garcia, E.F.Blouin, B.R.McEwen, D.Clawson, and K.M.Kocan. 2001b. Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of *Anaplasma marginale*. **International Journal of Parasitology** 31:1705-1714.
- de la Fuente,F.J., J.C.Garcia-Garcia, E.F.Blouin, J.T.Saliki, and K.M.Kocan. 2002a. Infection of tick cells and bovine erythrocytes with one genotype of the intracellular ehrlichia *Anaplasma marginale* excludes infection with other genotypes. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** 9:658-668.
- de la Fuente,F.J., K.M.Kocan, J.C.Garcia-Garcia, E.F.Blouin, P.L.Claypool, and J.T.Saliki. 2002b. Vaccination of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture and bovine erythrocytes followed by challenge-exposure with infected ticks. **Veterinary Microbiology** 89:239-251.

- de la Fuente,F.J., R.A.Van den Bussche, and K.M.Kocan. 2001c. Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). **Veterinary Parasitology** 97:65-76.
- de la Fuente,F.J., R.A.Van den Bussche, T.M.Prado, and K.M.Kocan. 2003c. *Anaplasma marginale* msp1alpha genotypes evolved under positive selection pressure but are not markers for geographic isolates. **Journal of Clinical Microbiology** 41:1609-1616.
- Dellagostin,O.A., S.Wall, E.Norman, T.O'Shaughnessy, J.W.Dale, and J.McFadden. 1993. Construction and use of integrative vectors to express foreign genes in mycobacteria. **Molecular Microbiology** 10:983-993.
- Dias,E.C. and H.Aragão. 1914. Pesquisas sobre a natureza dos anaplasmas. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz** vi(3):231-249.
- Dikmans,G. 1950. The transmission of anaplasmosis. **American Journal of Veterinary Research**:5-16.
- Dumler,J.S., A.F.Barbet, C.P.Bekker, G.A.Dasch, G.H.Palmer, S.C.Ray, Y.Rikihisa, and F.R.Rurangirwa. 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 51:2145-2165.
- Edelman,R., K.Palmer, K.G.Russ, H.P.Secret, J.A.Becker, S.A.Bodison, J.G.Perry, A.R.Sills, A.G.Barbour, C.J.Luke, M.S.Hanson, C.K.Stover, J.E.Burlein, G.P.Bansal, E.M.Connor, and S.Koenig. 1999. Safety and immunogenicity of recombinant Bacille Calmette-Guerin (rBCG) expressing *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A (OspA) lipoprotein in adult volunteers: a candidate Lyme disease vaccine. **Vaccine** 17:904-914.
- Figueroa,J.V., J.A.Alvarez, J.A.Ramos, E.E.Rojas, C.Santiago, J.J.Mosqueda, C.A.Vega, and G.M.Buening. 1998. Bovine babesiosis and anaplasmosis follow-up on cattle relocated in an endemic area for hemoparasitic diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences** 849:1-10.
- Fowler,D. and B.L.Swift. 1975. Abortion in cows inoculated with *Anaplasma marginale*. **Theriogenology** 4:59-67.
- French,D.M., W.C.Brown, and G.H.Palmer. 1999. Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. **Infection and Immunity** 67:5834-5840.
- French,D.M., T.F.McElwain, T.C.McGuire, and G.H.Palmer. 1998. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. **Infection and Immunity** 66:1200-1207.

- Garcia-Garcia,J.C., F.J.de la Fuente, G.Bell-Eunice, E.F.Blouin, and K.M.Kocan. 2004a. Glycosylation of Anaplasma marginale major surface protein 1a and its putative role in adhesion to tick cells. **Infection and Immunity** 72:3022-3030.
- Garcia-Garcia,J.C., F.J.de la Fuente, E.F.Blouin, T.J.Johnson, T.Halbur, V.C.Onet, J.T.Saliki, and K.M.Kocan. 2004b. Differential expression of the msp1alpha gene of Anaplasma marginale occurs in bovine erythrocytes and tick cells. **Veterinary Microbiology** 98:261-272.
- Garcia-Garcia,J.C., F.J.de la Fuente, K.M.Kocan, E.F.Blouin, T.Halbur, V.C.Onet, and J.T.Saliki. 2004c. Mapping of B-cell epitopes in the N-terminal repeated peptides of Anaplasma marginale major surface protein 1a and characterization of the humoral immune response of cattle immunized with recombinant and whole organism antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 98:137-151.
- Garnier,J., D.J.Osguthorpe, and B.Robson. 1978. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. **Journal of Molecular Biology** 120:97-120.
- Guglielmone,A.A. 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Veterinary Parasitology** 57:109-119.
- Hart,P.D. and I.Sutherland. 1977. BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life. **British Medical Journal** 2:293-295.
- Hart,P.D., I.Sutherland, and J.Thomas. 1967. The immunity conferred by the effective BCG and whole bacillus vaccines in relation to the induced tuberculin sensitivity and to technical variations in the vaccines. **Tubercle**:201-210.
- Himmelrich,H., R.Lo-Man, N.Winter, P.Guermonprez, C.Sedlik, M.Rojas, D.Monnaie, M.Gheorghiu, M.Lagranderie, M.Hofnung, B.Gicquel, J.M.Clement, and C.Leclerc. 2000. Immune responses induced by recombinant BCG strains according to level of production of a foreign antigen: malE. **Vaccine** 18:2636-2647.
- Hopp,T.P. and K.R.Woods. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 78:3824-3828.
- Husson,R.N., B.E.James, and R.A.Young. 1990. Gene replacement and expression of foreign DNA in mycobacteria. **Journal of Bacteriology** 172:519-524.
- Jabbar,I.A., G.J.Fernando, N.Saunders, A.Aldovini, R.Young, K.Malcolm, and I.H.Frazer. 2000. Immune responses induced by BCG recombinant for human papillomavirus L1 and E7 proteins. **Vaccine** 18:2444-2453.
- Jacobs,W.R., M.Tuckman, and B.R.Bloom. 1987a. Introduction of Foreign Dna Into Mycobacteria Using A Shuttle Phasmid. **Nature** 327:532-535.

- Jacobs,W.R., M.Tuckman, and B.R.Bloom. 1987b. Introduction of Foreign Dna Into Mycobacteria Using A Shuttle Phasmid. **Nature** 327:532-535.
- Jacobs,W.R., Jr., M.Tuckman, and B.R.Bloom. 1987. Introduction of foreign DNA into mycobacteria using a shuttle phasmid. **Nature** 327:532-535.
- Kocan,K.M., E.F.Blouin, and A.F.Barbet. 2000. Anaplasmosis control. Past, present, and future. **Annals of the New York Academy of Sciences** 916:501-509.
- Kocan,K.M., F.J.de la Fuente, A.A.Guglielmone, and R.D.Melendez. 2003. Antigens and alternatives for control of Anaplasma marginale infection in cattle. **Clinical Microbiology Reviews** 16:698-712.
- Kocan,K.M., W.L.Goff, D.Stiller, P.L.Claypool, W.Edwards, S.A.Ewing, J.A.Hair, and S.J.Barron. 1992. Persistence of Anaplasma marginale (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male Dermacentor andersoni (Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible calves. **Journal of Medical Entomology** 29:657-668.
- Konkel,M.E. and K.Tilly. 2000. Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. **Microbes and Infection** 2:157-166.
- Kremer,L., G.Riveau, A.Baulard, A.Capron, and C.Locht. 1996. Neutralizing antibody responses elicited in mice immunized with recombinant bacillus Calmette-Guerin producing the Schistosoma mansoni glutathione S-transferase. **Journal of Immunology** 156:4309-4317.
- Kuttler,K.L. 1984. Anaplasma infections in wild and domestic ruminants: a review. **Journal of Wildlife Diseases** 20:12-20.
- Kuttler,K.L., J.L.Zaugg, and L.W.Johnson. 1984. Serologic and clinical responses of premunized, vaccinated, and previously infected cattle to challenge exposure by two different Anaplasma marginale isolates. **American Journal of Veterinary Research** 45:2223-2226.
- Kyte,J. and R.F.Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **Journal of Molecular Biology** 157:105-132.
- Lagranderie,M., R.Lo-Man, E.Deriaud, B.Gicquel, M.Gheorghiu, and C.Leclerc. 1997. Genetic control of antibody responses induced by recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing a foreign antigen. **Infection and Immunity** 65:3057-3064.
- Lagranderie,M., A.Murray, B.Gicquel, C.Leclerc, and M.Gheorghiu. 1993. Oral immunization with recombinant BCG induces cellular and humoral immune responses against the foreign antigen. **Vaccine** 11:1283-1290.
- Lagranderie,M.R., A.M.Balazuc, E.Deriaud, C.D.Leclerc, and M.Gheorghiu. 1996. Comparison of immune responses of mice immunized with five different Mycobacterium bovis BCG vaccine strains. **Infection and Immunity** 64:1-9.

- Langermann,S., S.Palaszynski, A.Sadziene, C.K.Stover, and S.Koenig. 1994. Systemic and mucosal immunity induced by BCG vector expressing outer-surface protein A of *Borrelia burgdorferi*. **Nature** 372:552-555.
- Lee,S.F., R.J.March, S.A.Halperin, G.Faulkner, and L.Gao. 1999. Surface expression of a protective recombinant pertussis toxin S1 subunit fragment in *Streptococcus gordonii*. **Infection and Immunity** 67:1511-1516.
- Leung,N.J., A.Aldovini, R.Young, M.A.Jarvis, J.M.Smith, D.Meyer, D.E.Anderson, M.P.Carlos, M.B.Gardner, and J.V.Torres. 2000. The kinetics of specific immune responses in rhesus monkeys inoculated with live recombinant BCG expressing SIV Gag, Pol, Env, and Nef proteins. **Virology** 268:94-103.
- Liew,F.Y. 1993. The role of nitric oxide in parasitic diseases. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** 87:637-642.
- Lohr,C.V., K.A.Brayton, V.Shkap, T.Molad, A.F.Barbet, W.C.Brown, and G.H.Palmer. 2002. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 operon-associated proteins during mammalian and arthropod infection. **Infection and Immunity** 70:6005-6012.
- Lugosi,L. 1992. Theoretical and methodological aspects of BCG vaccine from the discovery of Calmette and Guérin to molecular biology. A review. **Tubercle and Lung Disease** 73:252-261.
- Matsuo,K., R.Yamaguchi, A.Yamazaki, H.Tasaka, K.Terasaka, M.Totsuka, K.Kobayashi, H.Yukitake, and T.Yamada. 1990. Establishment of a foreign antigen secretion system in mycobacteria. **Infection and Immunity** 58:4049-4054.
- Mazzantini,R.P., E.N.Miyaji, W.O.Dias, D.Sakauchi, A.L.Nascimento, I.Raw, N.Winter, B.Gicquel, R.Rappuoli, and L.C.Leite. 2004. Adjuvant activity of *Mycobacterium bovis* BCG expressing CRM197 on the immune response induced by BCG expressing tetanus toxin fragment C. **Vaccine** 22:740-746.
- McCallon,B.R. 1976. Prevalence and economic aspects of anaplasmosis. **Proceedings of the 6th National Anaplasmosis Conference**:1-3 (Abstr.).
- McGarey,D.J. and D.R.Allred. 1994a. Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. **Infection and Immunity** 62:4587-4593.
- McGarey,D.J., A.F.Barbet, G.H.Palmer, T.C.McGuire, and D.R.Allred. 1994b. Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b. **Infection and Immunity** 62:4594-4601.
- McGuire,T.C., E.B.Stephens, G.H.Palmer, T.F.McElwain, C.A.Lichtensteiger, S.R.Leib, and A.F.Barbet. 1994. Recombinant vaccinia virus expression of *Anaplasma marginale* surface protein MSP-1a: effect of promoters, leader sequences and GPI anchor sequence on antibody response. **Vaccine** 12:465-471.

- Meeus,P.F. and A.F.Barbet. 2001. Ingenious gene generation. **Trends in Microbiology** 9:353-355.
- Milstien, J. B. and Gaido, A. B. Quality control of BCG vaccines by the World Health Organization: a review of factors that may influence vaccine effectiveness and safety. 1989. Geneva, World Health Organization.
- Mogues,T., M.E.Goodrich, L.Ryan, R.LaCourse, and R.J.North. 2001. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne Mycobacterium tuberculosis infection in mice. **Journal of Experimental Medicine** 193:271-280.
- Munderloh,U.G., E.F.Blouin, K.M.Kocan, N.L.Ge, W.L.Edwards, and T.J.Kurtti. 1996. Establishment of the tick (Acari:Ixodidae)-borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales:Anaplasmataceae) in tick cell culture. **Journal of Medical Entomology** 33:656-664.
- Nascimento,I.P., W.O.Dias, R.P.Mazzantini, E.N.Miyaji, M.Gamberini, W.Quintilio, V.C.Gebara, D.F.Cardoso, P.L.Ho, I.Raw, N.Winter, B.Gicquel, R.Rappuoli, and L.C.Leite. 2000. Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing pertussis toxin subunit S1 induces protection against an intracerebral challenge with live Bordetella pertussis in mice. **Infection and Immunity** 68:4877-4883.
- Ohara,N. and T.Yamada. 2001. Recombinant BCG vaccines. **Vaccine** 19:4089-4098.
- Palmer,G.H., A.F.Barbet, W.C.Davis, and T.C.McGuire. 1986. Immunization with an isolate-common surface protein protects cattle against anaplasmosis. **Science** 231:1299-1302.
- Palmer,G.H. and T.F.McElwain. 1995. Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. **Veterinary Parasitology** 57:233-253.
- Palmer,G.H., F.R.Rurangirwa, and T.F.McElwain. 2001. Strain composition of the ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a mammalian reservoir for tick transmission. **Journal of Clinical Microbiology** 39:631-635.
- Palmer,G.H., S.D.Waghela, A.F.Barbet, W.C.Davis, and T.C.McGuire. 1987. Characterization of a neutralization-sensitive epitope on the Am 105 surface protein of *Anaplasma marginale*. **International Journal of Parasitology** 17:1279-1285.
- Palmer,G.H. and I.Wright. 1989. *Anaplasma* vaccines. In **Veterinary Protozoan and Hemoparasite Vaccines**. CRC Press, Boca Raton, Florida. 1-29.
- Richey,E.J. 1981. Bovine anaplasmosis. In **Current veterinary food animal practice**. R.J.Howard, editor. The W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA. 767-772.
- Ristic,M. 1977. Bovine anaplasmosis. In **Parasitic Protozoa**. J.Kreier, editor. Academic Press Inc., New York. 235-249.

- Ristic,M. and C.A.Carson. 1977. Methods of immunoprophylaxis against bovine anaplasmosis with emphasis on use of the attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. **Advances in Experimental Medicine and Biology** 93:151-188.
- Ristic,M. and A.M.WATRACH. 1963. Anaplasmosis. VI. Studies and a hypothesis concerning the cycle of development of the causative agent. **American Journal of Veterinary Research** 24:267-277.
- Rodrigues,L.C. and P.G.Smith. 1990. Tuberculosis in developing countries and methods for its control. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 84:739-744.
- Shkap,V., T.Molad, L.Fish, and G.H.Palmer. 2002. Detection of the *Anaplasma centrale* vaccine strain and specific differentiation from *Anaplasma marginale* in vaccinated and infected cattle. **Parasitology Research** 88:546-552.
- Shkap,V., E.Pipano, T.C.McGuire, and G.H.Palmer. 1991. Identification of immunodominant polypeptides common between *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale*. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 29:31-40.
- Snapper,S.B., L.Lugosi, A.Jekkel, R.E.Melton, T.Kieser, B.R.Bloom, and W.R.Jacobs, Jr. 1988. Lysogeny and transformation in mycobacteria: stable expression of foreign genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 85:6987-6991.
- Stover,C.K., G.P.Bansal, M.S.Hanson, J.E.Burlein, S.R.Palaszynski, J.F.Young, S.Koenig, D.B.Young, A.Sadziene, and A.G.Barbour. 1993. Protective immunity elicited by recombinant bacille Calmette-Guerin (BCG) expressing outer surface protein A (OspA) lipoprotein: a candidate Lyme disease vaccine. **Journal of Experimental Medicine** 178:197-209.
- Stover,C.K., I.C.de, V, T.R.Fuerst, J.E.Burlein, L.A.Benson, L.T.Bennett, G.P.Bansal, J.F.Young, M.H.Lee, G.F.Hatfull, and . 1991. New use of BCG for recombinant vaccines. **Nature** 351:456-460.
- Streit,J.A., T.J.Recker, J.E.Donelson, and M.E.Wilson. 2000. BCG expressing LCR1 of *Leishmania chagasi* induces protective immunity in susceptible mice. **Experimental Parasitology** 94:33-41.
- Supply,P., P.Sutton, S.N.Coughlan, K.Bilo, E.Saman, A.J.Trees, M.F.Cesbron Delauw, and C.Locht. 1999. Immunogenicity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*. **Vaccine** 17:705-714.
- Theiler, A. Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. 1st Report of the Director of Veterinary Research, Departament of Agriculture of the Union South Africa , 7-46. 1911.

- Timm,J., M.G.Perilli, C.Duez, J.Trias, G.Orefici, L.Fattorini, G.Amicosante, A.Oratore, B.Joris, J.M.Frere, and . 1994. Transcription and expression analysis, using lacZ and phoA gene fusions, of Mycobacterium fortuitum beta-lactamase genes cloned from a natural isolate and a high-level beta-lactamase producer. **Molecular Microbiology** 12:491-504.
- Unver,A., N.Ohashi, T.Tajima, R.W.Stich, D.Grover, and Y.Rikihisa. 2001. Transcriptional analysis of p30 major outer membrane multigene family of Ehrlichia canis in dogs, ticks, and cell culture at different temperatures. **Infection and Immunity** 69:6172-6178.
- Unver,A., Y.Rikihisa, R.W.Stich, N.Ohashi, and S.Felek. 2002. The omp-1 major outer membrane multigene family of Ehrlichia chaffeensis is differentially expressed in canine and tick hosts. **Infection and Immunity** 70:4701-4704.
- van Pinxteren,L.A., P.Ravn, E.M.Agger, J.Pollock, and P.Andersen. 2000. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** 7:155-160.
- Winter,N., M.Lagranderie, J.Rauzier, J.Timm, C.Leclerc, B.Guy, M.P.Kieny, M.Gheorghiu, and B.Gicquel. 1991a. Expression of heterologous genes in Mycobacterium bovis BCG: induction of a cellular response against HIV-1 Nef protein. **Gene** 109:47-54.
- Winter,N., M.Lagranderie, J.Rauzier, J.Timm, C.Leclerc, B.Guy, M.P.Kieny, M.Gheorghiu, and B.Gicquel. 1991b. Expression of heterologous genes in Mycobacterium bovis BCG: induction of a cellular response against HIV-1 Nef protein. **Gene** 109:47-54.
- Zaugg,J.L. 1985. Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation. **American Journal of Veterinary Research** 46:570-572.
- Zaugg,J.L. and K.L.Kuttler. 1984. Bovine anaplasmosis: in utero transmission and the immunologic significance of ingested colostral antibodies. **American Journal of Veterinary Research** 45:440-443.