

Cleber Oliveira Soares

**RELATÓRIO FINAL DE CONSULTORIA
(IICA/PRODETAB)**

Campo Grande, MS
2000



Embrapa Gado de Corte. Documentos, 94

Rodovia BR 262, km 4
Caixa Postal 154
Telefone: (67) 768 2000
Fax: (67) 768 2150
79002-970 Campo Grande, MS
<http://www.cnpqc.embrapa.br>

Tiragem: 10 exemplares

Comitê de Publicações

Ademir Hugo Zimmer - Presidente
Cacilda Borges do Valle
Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima - Coordenação Editorial
José Raul Valério
Manuel Cláudio Motta Macedo
Maria Antonia Martins de Ulhôa Cintra - Normalização
Osni Corrêa de Souza
Ronaldo de Oliveira Encarnação
Tênisson Waldow de Souza
Valéria Pacheco Batista Euclides

Soares, Cleber Oliveira.

Relatório final de consultoria (IICA/PRODETAB) / Cleber Oliveira Soares. -- Campo Grande : Embrapa Gado de Corte, 2000.

32p. -- (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1517-3747 ; 94)

ISBN 85-297-0070-8

1. Sanidade animal. 2. Carrapato. 3. *Boophilus microplus*. 4. Bovino - Doença. 5. Tristeza parasitária bovina. 6. Imunologia. I. Embrapa Gado de Corte (Campo Grande, MS). II. Título. III. Série.

CDD 636.0896079

© Embrapa 2000

Título em inglês: "IICA/PRODETAB consultancy: final report"

Nome do Consultor IICA: Dr. Cleber Oliveira Soares

Projeto: 06.1997.180.02, "Cultivo *in vitro* de tecidos do carrapato *Boophilus microplus* e obtenção de imunógenos"

Projeto: 06.2000.198.01, "Desenvolvimento de um teste de imunocromatografia para detecção de anticorpos contra *Babesia bigemina*"

Projeto: 06.2000.198.02, "Imunidade conferida pela membrana externa dos corpúsculos iniciais de *Anaplasma marginale* e proteínas principais da superfície MSP-2 e MSP-5, associadas a indutor inespecífico de imunidade celular em bovinos"

Número do contrato: 133/00

Nº do Aditivo:

Tema: Tecnologia Avançada

Objetivo da Consultoria: Contribuir com os projetos de sanidade animal que terão soluções para o problema de carrapato e da tristeza parasitária bovina.

Nº de Produtos elaborados: 3 (três): Um relatório com acompanhamento e recomendações para cada projeto.

Mês correspondente: 15/05/2000 a 24/10/2000

Palavras chaves: Carrapato, tristeza parasitária bovina, imunodiagnóstico, imunógenos, sanidade animal.

CULTIVO *in vitro* DE TECIDOS DO CARRAPATO *Boophilus microplus* E OBTENÇÃO DE IMUNÓGENOS

PROJETO: 06.1997.180.02

RESUMO

A identificação e a caracterização de antígenos promissores para o desenvolvimento de vacina contra o carrapato *Boophilus microplus*, bem como a localização destes antígenos nos tecidos do carrapato dependem, pelos métodos atuais, da manipulação física, bioquímica e histoquímica *in situ*. Do mesmo modo a caracterização antigênica, genética e a identificação de antígenos promissores de *Babesia* spp. e *Anaplasma* spp. dependem da inoculação de animais experimentais doadores. Além de trabalhosos, caros e demorados, estes processos estão sujeitos às variações de sensibilidade dos doadores e a fatores biológicos imprevisíveis. O cultivo de células do carrapato poderá proporcionar um sistema contínuo, *in vitro*, capaz de facilitar a identificação, a localização, o isolamento e a caracterização de antígenos em carrapatos. Foram cultivadas células embrionárias de carrapato, obtidas a partir de ovos. As culturas foram mantidas em meio de cultura descrito por YUNKER (1987) ou em meio de cultura descrito por MUNDERLOH & KURTTI (1989), em frascos de cultura de 25 cm², em sistema fechado. Para estudos citológicos, as culturas foram repicadas para tubos de Leighton, com lamínula. Após a formação da camada de células sobre as lamínulas, estas foram removidas do tubo e processadas de acordo com o estudo a ser realizado.

1. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1. Cultivo celular

As culturas primárias de células embrionárias de *B. microplus* foram realizadas conforme método descrito por YUNKER (1987) ou pelo método desenvolvido por MUNDERLOH & KURTTI (1989). Resumidamente, teleóginas colhidas, no término do ciclo parasitário, foram lavadas e, superficialmente, esterilizadas com álcool 70°, solução a 1% de água sanitária, solução a 1%

de cloreto de benzalcônio e água destilada contendo antibiótico. Estas fêmeas foram colocadas em placa de Petri esterilizada e incubadas, a 28°C e umidade relativa >80%, para realização da postura.

Após 10 dias do início da postura, os ovos foram esterilizados, superficialmente por lavagens com acetona, solução de White, álcool 70° e água destilada. Na seqüência os ovos embrionados foram colocados em um copo de Becker de 40 ml, esterilizado, e quebrados com o auxílio de um êmbolo de seringa hipodérmica. Seguiu-se a filtração do material através de um filtro de vidro nº zero para separar as células das cascas e dos ovos que não foram rompidos. O filtrado foi centrifugado a 1.000 rpm por 8 minutos e o sedimento foi ressuspenso em meio de cultura, Leibovitz L15, distribuído nos frascos de cultura e incubados a 31°C, em sistema fechado. Semanalmente, ou com maior freqüência, dependendo da velocidade de crescimento, 50% do meio de cultura de cada frasco foi substituído por meio de cultura novo.

As culturas foram realizadas em frascos de cultura de 25 cm² e em tubos de Leighton com lamínulas e foram repicadas à medida em que houve o povoamento da superfície dos frascos de cultura. Parte das culturas serão mantidas, por tempo indeterminado, na tentativa de desenvolver células de linha, isto é, células que se multiplicam continuamente.

1.2. Obtenção de extrato celular

As células cultivadas em frascos de cultura foram descoladas com solução de tripsina a 0,25%, a 37°C, por 20 minutos. Em seguida foram centrifugadas por 10 minutos, a 3.000 x g, por três vezes, com tampão salina fosfato (PBS), pH 7,2. O sedimento contendo as células foi ressuspenso, ao volume inicial, em tampão de lise (Tris, 50 mM, iodoacetamida, 5 mM, fenilmetilsulfonilfluoreto, 0,1 mM, N- α -ptosil-L-lisil clorometil cetona, 0,1 mM, nonited-P-40, 1%) e, submetido à disrupção ultra-sônica, por 5 minutos, a 70 Hz. Posteriormente, realizou-se uma centrifugação, por 30 minutos, a 10.000 x g, a 4°C. O sobrenadante foi armazenado a -70°C, em alíquotas de 100 μ l.

1.3. Caracterização fenotípica

Os extratos de células cultivadas serão submetidas à dosagem de proteínas solúveis totais, pela técnica do reagente de Folin (LOWRY et al., 1951). Determinada a concentração protéica, uma alíquota de 100 µg, do extrato, foi desnaturada por fervura, por três minutos, em tampão de amostra para eletroforese (Tris 25 mM, pH 6,8; glicerol a 15%; 2-mercaptoetanol a 2,5% e cristais de azul de bromofenol). As amostras foram submetidas à eletroforese, em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10%, em sistema descontínuo, com gel de agregação, a 5%. A corrida foi realizada a 100 V e 80 mA, para empilhamento das amostras, e a 140 V e 100 mA para separação eletroforética. A separação eletroforética das proteínas das amostras foi realizada pareada a um padrão de peso molecular. Após a corrida, o gel foi corado com azul brilhante de comassie, descorado e montado, entre papel celofane poroso, para posterior análise dos proteinogramas. As bandas do perfil protéico de cada amostra serão analisadas segundo sua mobilidade relativa no proteinograma, comparada ao padrão de peso molecular (ALFENAS, 1998).

1.4. Caracterização citológica das células cultivadas de *B. microplus*

Do cultivo em tubos de Leighton foram recuperadas as lamínulas que foram processadas para a análise citológica microscópica e a caracterização celular. A identificação e caracterização citológica das células em cultura será comparada com cortes histológicos dos órgãos do carrapato. As lamínulas retiradas do tubo de Leighton e cobertas pelas células embrionárias foram fixadas em formol 10% por 24 horas e coradas pelo corante de Giemsa.

2. RESULTADOS

2.1. Cultivo celular e caracterização citológica

O estabelecimento das culturas primárias de células embrionárias de *B. microplus* vem sendo realizado progressivamente. No entanto, observou-se que o crescimento destes tipos celulares se dá de forma lenta e sua

manutenção requer uma troca constante de meios. Foi possível estabelecer culturas primárias pelo período de até três meses, em média; sendo necessário o reinício do cultivo.

Entre os diferentes tipos de células embrionárias de *B. microplus*, no cultivo *in vitro*, houve o predomínio das formas alongadas, triangulares e fibroblastóides. As observações preliminares indicam que o meio Leibovitz L15 possibilita um melhor crescimento celular quando comparado ao meio Leibovitz L15 B.

2.2. Obtenção de extrato celular e caracterização fenotípica

Foi possível obter extrato de células cultivadas, a partir de uma garrafa de cultura. A dosagem de proteínas solúveis totais, pela técnica do reagente de Folin (LOWRY et al., 1951) revelou a concentração protéica de 357,40 µg/ml.

Este projeto encontra-se em fase de execução e análise da caracterização fenotípica das células cultivadas.

3. CONSIDERAÇÕES

3.1. Continuidade do projeto

As próximas etapas, imediatas, previstas serão a obtenção de células de linha, e a produção e obtenção de massa celular para estudos citológicos e fenotípicos.

Posteriormente, seguirão os estudos relativos à replicação destas células e métodos de manutenção das mesmas.

3.2. Situação e expectativas do projeto

As atividades deste projeto encontram-se em andamento. Pelo fato do cultivo e replicação das células embrionárias de *B. microplus* ocorrer de forma lenta e demandar um longo período de tempo, maiores resultados e conclusões a despeito deste só serão possíveis nos próximos semestres.

Contudo, foram sugeridos incrementos e novas metas para este projeto com o objetivo de melhor aproveitamento das células e aprimoramento das metas. Dentre as sugestões estão:

3.2.1 Caracterização antigênica de células embrionárias de *B. microplus*

Cinco camundongos Balb/c, para cada extrato antigênico, serão inoculados com três doses de 1 µg de proteína por 10 g de peso vivo. Os extratos serão acrescidos de adjuvante completo de Freund (inóculo 1) ou adjuvante incompleto de Freund (inóculo 2 e 3) da diluição de 1:1 (v/v). Os inóculos serão realizados com intervalos de 10 dias. Os camundongos serão sangrados, para a obtenção de soro, em intervalos de 10 dias, do dia 0 até o 60º dia. Os soros dos camundongos, de cada grupo de extrato, serão incubados sobre fitas de nitrocelulose, adsorvidas com o respectivo extrato antigênico (*western blotting*), para verificar a cinética da produção de anticorpos. Estes soros serão, ainda, submetidos a fitas adsorvidas com os outros extratos antigênicos, a fim de verificar possíveis reações cruzadas ou homologia antigênica (JANSON & RYDEN, 1998).

Será realizada detecção imunohistoquímica, utilizando os soros hiperimunes, respectivos, sobre lâminas contendo as células embrionárias ou teciduais, cultivadas. A imunohistoquímica será realizada em sistema estreptoavidina-biotina, revelado por peroxidase-amino etilcarbazole. As revelações serão contra-coradas por hematoxilina alcoólica de Mayer.

Após a caracterização fenotípica e antigênica, serão selecionadas subunidades protéicas conservadas entre os diferentes extratos de células cultivadas. Será procedida a eletroeluição e imunização de camundongos, primeiramente, e, depois, bovinos para verificar-se o grau de proteção e/ou reconhecimento, isoladamente ou em associação.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos*. Viçosa: Editora UFV, 1998. 574p.
- JANSON, J.C.; RYDEN, L. *Protein purification. Principles, high resolution methods and applications*. 2º ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1998. 695 p.
- LOWRY, O.H.; ROSENBUCH, C.N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MUNDERLOH, U.G.; KURTTI, T.J. Formulation of medium for tick cell culture, *Experimental & applied acarology*, v.7, p.219-229, 1989.
- YUNKER, C.F. Preparation and maintenance of arthropod cell cultures. III. Acari with emphasis on ticks. In: YUNKER, C.E. *Arboviruses in Arthropod cells in vitro*. Boca Raton: CRC, 1987, v.1.

DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE DE IMUNOCROMATOGRAFIA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Babesia bigemina*

PROJETO: 06.2000.198.01

RESUMO

A babesiose constitui um dos principais fatores limitantes para o melhoramento da produtividade da bovinocultura em áreas tropicais e subtropicais do mundo, onde existem mais de 500 milhões de bovinos expostos à infecção por *Babesia* spp. Apesar de não existir uma avaliação do problema econômico global causado por esse agente, as estimativas existentes apontam grandes perdas, traduzidas por mortalidade, diminuição na produção de carne e leite e custos indiretos com medidas profiláticas e de tratamento dos animais. No Brasil, a babesiose é causada pelos hemoprotozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina*, responsáveis por prejuízos anuais estimados em 960 milhões de dólares. O quadro clínico provocado por *B. bigemina* é caracterizado geralmente por altas parasitemias, febre, anemia hemolítica, ictércia e hemoglobinúria. No entanto, a expressão destas alterações clínicas, varia em função da situação epidemiológica. As provas sorológicas são ferramentas importantes para avaliar a situação epidemiológica de uma propriedade ou região, bem como de medidas profiláticas, tais como a imunização através de premunição ou vacinas atenuadas. Dentre as provas já desenvolvidas até o momento, a imunofluorescência indireta e o ELISA são as mais utilizadas. Na maioria das vezes, estas provas utilizam antígenos brutos ou semipurificados, contendo estroma de células do bovino, o que contribui para a ocorrência de reações inespecíficas. Na tentativa de superar este problema, foram desenvolvidos ELISAs com antígenos recombinantes e anticorpos monoclonais. No entanto, estas provas ainda apresentam limitações em seu uso, já que necessitam de equipamentos para leitura dos resultados e mão-de-obra especializada para sua execução. O presente subprojeto visa desenvolver uma prova de imunocromatografia de um único passo, com antígenos recombinantes

imobilizados em uma membrana de nitrocelulose, e anti-IgG de bovino conjugada com ouro coloidal. A seleção dos antígenos será baseada em estudos prévios, realizados pela equipe do Laboratório de Imunologia da Embrapa Gado de Corte, em que foram identificados antígenos conservados em isolados de *B. bigemina*, das cinco regiões fisiográficas do Brasil. Além de alta sensibilidade e especificidade, espera-se a ausência de reações cruzadas com soros de bovinos infectados múltiplas vezes com *B. bovis*, *A. marginale* e *Trypanosoma vivax*. Além disto, a simplicidade na execução deste teste permitiria sua utilização em condições de campo e em laboratórios deficientes em equipamentos e não exigiria mão-de-obra especializada.

1. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1. Caracterização antigênica

Baseado em estudos de caracterização antigênica dos isolados brasileiros de *Babesia bigemina* (MADRUGA et al., 1998), foram testados os antígenos conservados nos isolados das cinco regiões fisiográficas. Para tanto, bezerros esplenectomizados foram inoculados com isolados brasileiros, um isolado para cada região, de *B. bigemina* criopreservados, para posterior obtenção de antígenos.

1.2. Obtenção de extrato antigênico

Sangue dos bezerros inoculados com isolados brasileiros de *B. bigemina*, de cinco regiões fisiográficas, com altas parasitemias (superior a 20%), foi colhido em citrato de sódio e lavado três vezes com tampão fosfato (0,01 M de fosfato de sódio e 0,15 M NaCl, pH 7,2) para a remoção de leucócitos. Nestas condições, o sangue parasitado foi armazenado a -70°C . Posteriormente as hemácias lisadas e os parasitos foram centrifugados a 22.000 x g por três vezes, com solução tampão fosfato (STF) contendo 50 mM de fenilmetilsulfonilfluoreto. A solubilização deste material foi realizada com um tampão de lise (50 mM TRIS, 5 mM EDTA, 5 mM de iodoacetamida, 0,1 mM fenilmetilsulfonilfluoreto, 0,1 mM N- α -ptosil-L-lisil clorometil cetona,

1% de Nonidet- P-40). O material lisado foi centrifugado a 30.000 x g durante 60 minutos, filtrado através de membrana de 0,45 µm e sonificado por 10 minutos, com intervalos de um minuto, em banho de gelo.

1.3. Dosagem de proteínas e separação eletroforética

O extrato antigênico de *B. bigemina* de cada um dos cinco isolados foi submetido à dosagem de proteínas totais solúveis pela técnica do reagente de Folin (LOWRY et al., 1951).

Uma alíquota da proteína solubilizada, de cada amostra, foi desnaturada por fervura por três minutos em tampão de amostra para eletroforese (tris 25 mM, PH 6,8; SDS a 2%, glicerol a 15%; 2-mercaptoetanol a 2,5% e cristais de azul de bromofenol). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10% em sistema descontínuo com gel de agregação a 5% (ALFENAS, 1998). A corrida foi realizada a 100 V e 80 mA para empilhamento das amostras e a 140 V e 100 mA para separação eletroforética.

A separação eletroforética das proteínas das amostras foi realizada pareada a um padrão de peso molecular contendo 7 frações (lisozima, 14,3 KDa; B- lactoglobulina, 18,4 KDa; anidrase carbônica, 29 KDa; ovalbumina, 43 KDa; soro albumina bovina, 68 KDa; fosforilase b, 97,4 KDa; e miosina, 200 KDa).

Após a corrida, o gel foi corado em azul brilhante de comassie, montado e seco entre papel celofane poroso para posterior análise dos zimogramas. As bandas protéicas foram analisadas segundo sua mobilidade relativa no zimograma, comparada ao padrão de peso molecular.

1.4. Seleção de antígenos

Realizou-se a análise comparativa entre zimogramas dos extratos antigênicos dos cinco isolados de *B. bigemina*. Objetivou-se a seleção de cinco subunidades protéicas conservadas entre os isolados e, dentre elas a P200 e a P58, previamente conhecidas como conservadas (MADRUGA et al., 1998).

Entre os isolados selecionou-se aquele com melhor revelação eletroforética das cinco subunidades conservadas, como padrão para o estudo.

1.5. Eletroluição das subunidades de *B. bigemina*

Realizou-se eletroforese em gel de SDS-PAGE, longo (20 x 15 cm), sob as mesmas condições descritas no item 3. O gel contendo três poços: dois curtos e um longo recebeu padrão de peso molecular em um poço curto e, amostra no outro poço curto e no longo. Após a corrida, o gel foi cortado retirando a porção referente aos dois poços pequenos para ser corada. A porção maior do gel contendo a amostra foi mantida em tampão de corrida até a descoloração da porção menor.

As duas porções do gel (menor e maior, corada e não corada respectivamente) foram colocadas, sobre uma placa de vidro, lado a lado para localização, orientação e recorte das tiras de gel contendo as cinco subunidades a serem eletroeluídas. Em seguida, as tiras de gel foram empacotadas em tubos para eluição e acondicionadas no bloco do eletroluidor (Hoefer). A eletroeluição das cinco subunidades foi realizada com polaridade positiva; a 50 V; 0,05 mA; 120 minutos; polaridade reversa de 5 segundos; e a temperatura de bloco de 10°C.

1.6. Contraprova da eletroeluição

Para certificação da eficiência da eletroeluição, os eluatos das cinco subunidades protéicas de *B. bigemina* foram submetidos à dosagem de proteínas solúveis pelo método do reagente de Folin (LOWRY et al., 1951). Posteriormente, uma alíquota de cada eluato foi acrescida de tampão de amostra e submetida a eletroforese sob as mesmas condições e metodologias descritas no item 3.

1.7. Imunização de camundongos

Cinco camundongos Balb/c, para cada subunidade, foram inoculados com três doses de 1 µg de proteína/10 g de peso vivo. As proteínas foram

acrescidas de adjuvante completo de Freund (inóculo 1) ou adjuvante incompleto de Freund (inóculo 2 e 3) na diluição de 1:1 (v/v). Os inóculos foram realizados com intervalos de 10 dias. Os 25 camundongos foram sangrados para a obtenção de soro, em intervalos de 10 dias, do dia 0 até o 80º.

1.8. Imunofluorescência com soros dos camundongos imunizados

Os soros dos camundongos imunizados com as subunidades protéicas foram testados por imunofluorescência indireta (IFI), para certificação da localização antigênica, destas subunidades, e seu padrão de revelação no hemoparasito e/ou no eritrócito infectado. Este ensaio foi baseado na técnica descrita por MADRUGA et al. (1986). Na IFI utilizou-se lâminas com esfregaço sangüíneo contendo *B. bigemina*, na parasitemia de 4%, como antígeno; os soros testes foram diluídos a 1:8 em tampão PBS; e o conjugado, anti-IgG bovino marcado com isotiocianato de fluoresceína, diluído a 1:80 em PBS. A leitura das lâminas foi realizada utilizando microscópio de epifluorescência com lâmpada HBO-50, em ambiente escuro.

1.9. Western blot

O reconhecimento antigênico das frações protéicas foi analisado por *western blotting*, frente a soro de bovinos inoculados, experimentalmente, com os cinco isolados regionais de *B. bigemina*. Após separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,45 µm de poro. A transferência foi realizada horizontalmente durante três horas, utilizando a técnica semi-úmida. As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com solução de Tris-Tween 20 (0,05% Tween-20, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl com 1% de leite em pó livre de gordura), durante 12 horas. Soros de bovinos inoculados experimentalmente com *B. bigemina*, em diversos momentos da infecção, foram testados frente aos antígenos conservados (subunidades) previamente purificadas. Será selecionado o antígeno, para *B. bigemina*, que induz a

produção de anticorpos por um período mais longo durante a infecção e/ou durante toda a infecção. Os soros foram diluídos em solução bloqueadora e incubados com as membranas de nitrocelulose durante 12 horas, a 4°C. Essas membranas foram lavadas em solução bloqueadora e incubadas por 60 minutos com anti-imunoglobulina G de bovino, marcada com fosfatase alcalina, na diluição apropriada em solução bloqueadora, durante 12 horas, em temperatura ambiente. As membranas de nitrocelulose foram lavadas três vezes em solução Tris-Tween 20. As proteínas foram visualizadas com a adição do substrato (100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, com 0,325 mg/ml de azul de nitrotetrazolium, 0,65 mg/ml 5-bromo-4-cloro-3-fosfato indol) e incubado em temperatura ambiente. A seguir, as membranas foram mergulhadas numa solução de 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, com 5 mM NaEDTA por 30 minutos para interromper a reação.

2. RESULTADOS

2.1. Eletroforese e seleção de antígenos

A análise pareada do perfil dos cinco isolados brasileiros de *B. bigemina*: regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, permitiu comparar os proteinogramas. Foram selecionadas, entre os zimogramas, cinco bandas protéicas com massa molecular, aproximada, de 25 KDa, 33 KDa, 58 KDa, 77 KDa e 200 KDa.

Dentre as proteínas de subunidades selecionadas, conservadas entre os isolados, as de massa 58 e 200 KDa, conhecidamente de localização em roptrias e em membrana externa de *B. bigemina*, respectivamente, serão utilizadas como parâmetro para comparação com as demais.

Foram selecionadas as subunidades que mostraram-se conservadas e que apresentaram melhor revelação eletroforética no proteinograma.

2.2. Eletroeluição e certificação dos eluatos

Pela eletroeluição foi possível separar do extrato antigênico de *B. bigemina* as cinco subunidades protéicas, isoladamente. A dosagem de proteínas solúveis revelou concentrações protéicas médias, entre eluatos, de 780 µg/ml a 2.100 µg/ml. A contraprova, da eluição, pela eletroforese demonstrou a eficiência da purificação das subunidades protéicas que apresentaram-se reveladas no gel (Figura 1). Para cada partida de eletroeluição realizou-se a contraprova eletroforética como controle da pureza das subunidades.

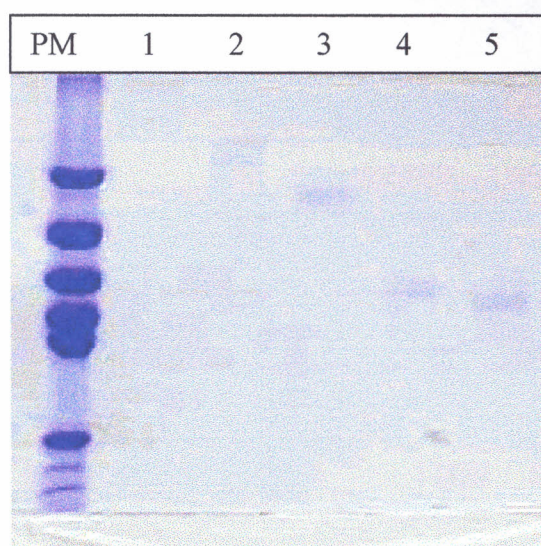


Figura 1. Perfil eletroforético das subunidades protéicas de *Babesia bigemina* eletroeluídas. PM, peso molecular; 1, proteína de 200 KDa; 2, proteína de 77 KDa; 3, proteína de 58 KDa; 4, proteína de 33 KDa; 5, proteína de 25 KDa. Coloração por Commassie blue 250R.

2.3. Imunização de camundongos e imunofluorescência

Os soros dos camundongos imunizados com as cinco subunidades protéicas avaliados pela imunofluorescência indireta (IFI), revelou que a cinética da produção de anticorpos policlonais monoespecíficos iniciou-se, em média, entre o 10^o ao 20^o dia pós-imunização (DPI), permanecendo crescente até o 60^o DPI, declinando em seguida. A cinética da produção de anticorpos para cada subunidade protéica pode ser observada na Tabela 1. A localização antigênica das subunidades e seu padrão de revelação no hemoparasito foi a seguinte: P200: padrão de reação circundando todo o parasito e

uniformemente distribuído; P77: padrão de reação puntiforme médio e de localização central no parasito; P58: padrão de reação puntiforme pequena, compacta e de localização central no parasito; P33: padrão de reação grumosa média e de distribuição por todo o parasito; P25: padrão de reação puntiforme pequeno, compacta e de localização central no parasito.

Tabela 1A. Avaliação da imunogenicidade da proteína de 200 KDa de *Babesia bigemina* pela IFI.

Animal	Dias pós-imunização							
	0	10	20	30	40	50	60	80
1	-	-	+	-	+	+	+	+
2	-	+	+	-	+	+	+	+
3	-	+	+	+	+++	++	++	++
4	-	+	+	+	+++	++	++	+
5	-	+	+	-	++	+	+	+

Tabela 1B. Avaliação da imunogenicidade da proteína de 77 KDa de *Babesia bigemina* pela IFI.

Animal	Dias pós-imunização							
	0	10	20	30	40	50	60	80
1	-	+	-	-	+	+	+	+
2	-	+	+	-	+	+	+	+
3	-	+	+	-	+	+	+	+
4	-	+	+	-	-	-	+	+
5	-	+	+	+	+	+	+	+

Tabela 1C. Avaliação da imunogenicidade da proteína de 58 KDa de *Babesia bigemina* pela IFI.

Animal	Dias pós-imunização							
	0	10	20	30	40	50	60	80
1	-	+	+	+	+	+	+	+
2	-	+	+	+	+	++	+	+
3	-	+	+	+	+	+	++	+
4	-	+	++	+	+	++	++	+
5	-	+	+	+	+	+	+	++

Tabela 1D. Avaliação da imunogenicidade da proteína de 33 KDa de *Babesia bigemina* pela IFI.

Animal	Dias pós-imunização							
	0	10	20	30	40	50	60	80
1	-	-	+	-	+	+	+	+
2	-	-	+++	+	+	+	+	+
3	-	-	+++	-	+	+	+	+
4	-	-	+	+	+	+	+	+
5	-	-	+++	+	++	+	+++	+

Tabela 1E. Avaliação da imunogenicidade da proteína de 25 KDa de *Babesia bigemina* pela IFI.

Animal	Dias pós-imunização							
	0	10	20	30	40	50	60	80
1	-	+	++	+	++	+	++	++
2	-	-	+	+	+	+	+	+
3	-	+	+	+	+	+	+	+
4	-	+	+	+	++	++	++	+
5	-	+	+	++	++	+	+	+

2.4. Western blotting

Esta etapa encontra-se em fase de padronização de protocolo e procedimentos. Está-se avaliando a interação de diferentes concentrações de antígeno (subunidades protéicas) frente a diferentes diluições de soros e diferentes diluições de conjugado (anti-IgG bovina marcada com fosfatase alcalina). Neste ensaio está-se avaliando o reconhecimento antigênico das proteínas de subunidades frente a soros de bovinos inoculados experimentalmente com os cinco isolados de *B. bigemina*. Estão sendo testados os soros coletados desde o início da inoculação (dia 0) até 120 dias pós-inoculação; como controle positivo do ensaio estar-se utilizando anticorpos monoclonais anti-p200 e anti-p58. O antígeno (subunidades protéicas) necessário para execução desta prova foi purificado e encontra-se armazenado a -75°C .

3. CONSIDERAÇÕES

3.1. Continuidade do projeto

As próximas etapas, imediatas, previstas serão a conjugação de imunoglobulinas da classe IgG de coelho anti-IgG bovina com ouro coloidal (partículas uniformes de 20 nm), e com ouro coloidal associado à proteína A. Em seguida será desenhado, padronizado e avaliado o teste de imunocromatografia com as proteínas de subunidades nativas.

Posteriormente, seguirão os estudos relativos à produção destas proteínas sob a forma recombinante (produção da biblioteca genômica e de cDNA, ampliação das bibliotecas, avaliação das proteínas recombinante, seqüenciamento do gene clonado) para o desenvolvimento do teste definitivo de imunocromatografia anti *B. bigemina*. Após estas etapas far-se-á a padronização, a avaliação e a validação do kit.

3.2. Situação e expectativas do projeto

As atividades deste projeto encontram-se em pleno andamento e o cronograma está antecipado e/ou dentro do prazo previsto. As expectativas são do projeto ser concluído na íntegra e dentro da previsão.

Este projeto contribuirá na geração de ferramentas de biotecnologia para uso imediato a campo, e fornecerá subsídios para a consolidação de conhecimentos no desenvolvimento de outros insumos biológicos para a área de sanidade animal.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos*. Viçosa: Editora UFV, 1998. 574p.
- LOWRY, O.H.; ROSENBUCH, C.N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MADRUGA, C.R., KESSLER, R.H., JESUS, E.F., SETE, A.J. Imunofluorescência indireta para diagnóstico sorológico de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*: Produção de antígeno com cepas isoladas no estado de Mato Grosso do Sul e avaliação preliminar do teste. *Pesquisa em Andamento (EMBRAPA)*, 32, p.1-4, 1986.
- MADRUGA, C.R., CARVALHO, C.M.E., SCHENK, M.A.M., KESSLER, R.H. Persistence of carrier state and its relationship with the immunity in nelore cattle experimentally infected with different isolates of *Babesia bigemina*: a preliminar report. In: *XVI Panamerican Congress of Veterinary Sciences*, Anais...1998.

IMUNIDADE CONFERIDA PELA MEMBRANA EXTERNA DOS CORPÚSCULOS INICIAIS DE *Anaplasma marginale* E PROTEÍNAS PRINCIPAIS DA SUPERFÍCIE MSP-2 E MSP-5, ASSOCIADAS A INDUTOR INESPECÍFICO DE IMUNIDADE CELULAR EM BOVINOS

PROJETO: 06.2000.198.02

RESUMO

A anaplasmose bovina é causada pelas rickettsias de localização intra-eritrocítica *Anaplasma centrale* e *A. marginale*. Esta última espécie, mais patogênica para os bovinos, ocorre em áreas tropicais e subtropicais do mundo, acarretando consideráveis prejuízos. Estimativas realizadas nos Estados Unidos indicam que a anaplasmose é responsável pela morte de 50.000 a 100.000 bovinos por ano (PALMER et al., 1986) e por perdas em torno de 300 milhões de dólares (PALMER, 1989). No Brasil, existe a estimativa de 250 milhões de dólares de prejuízos causados pelo complexo Tristeza Parasitária Bovina, no qual o *A. marginale* se inclui (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1984). No Brasil, o *A. marginale* é transmitido pelo carrapato *Boophilus microplus*, embora seu mecanismo de transmissão ainda não esteja bem esclarecido (SCHENK & KESSLER, 1998). A anaplasmose bovina é caracterizada por febre, anemia, icterícia, anorexia, perda de peso e morte (BARBET et al., 1999). Além disso, a infecção intra-uterina, que pode resultar em morte fetal, aborto e natimortalidade (ZAUGG, 1985), também constitui uma fator de queda da produção. Os problemas econômicos causados pelo *A. marginale* justificam esforços na busca de programas de controle da anaplasmose. Os métodos de imunização existentes predominantemente utilizam organismos vivos e constituem a chamada premunição. O método mais antigo de premunição utiliza organismos virulentos, seguido de monitoramento e tratamento com antibióticos daqueles animais com sintomatologia clínica da doença (SCHENK & KESSLER, 1998). Uma evolução

desse procedimento foi a premunição com a dose mínima infectante, cujo objetivo foi evitar a inoculação de um número elevado de organismos, o que provocaria morbidade nos animais imunizados (SCHENK & KESSLER, 1998). Também é utilizado o *A. centrale*, espécie menos patogênica, com a finalidade de proteger bovinos contra a infecção de *A. marginale*. Uma das limitações desse tipo de premunição é que a proteção não é total contra diferentes isolados de *A. marginale* (SCHENK & KESSLER, 1998). Todos os métodos que utilizam organismos vivos podem causar em animais adultos, como touros e vacas, severa morbidade, mortalidade e aborto (HENRY et al., 1983). Adicionalmente, há risco potencial de veiculação de outras doenças infecciosas transmitidas pelo sangue. Nos últimos anos, os estudos sobre imunização contra *Anaplasma* concentraram-se na obtenção de frações antigênicas. Bovinos imunizados com membrana externa de corpúsculos iniciais na concentração de 100 µg em 6 mg de saponina e com inoculações na 2^a, 4^a e 6^a semana posteriores apresentaram uma significativa redução da anemia e rickettsemia. Nessa membrana, foram caracterizadas seis proteínas principais de superfície, que foram denominadas MSP-1a, MSP-1b, MSP-2, MSP-3, MSP-4 e MSP-5 (TEBELE et al., 1991).

Bovinos imunizados com MSP-2 apresentaram proteção variável desde absoluta a apenas um retardamento no pique de rickettsemia (PALMER et al., 1988). Essa MSP é codificada por uma família multigênica, que constitui cerca de 1% do genoma dessa rickettsia (EID et al., 1996). Os isolados brasileiros analisados até o presente apresentaram polimorfismo quanto aos epítomos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais AnaF-19E2, Ana50A2, Ana66A2, enquanto que os epítomos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais Ana58A2 e Ana070A2 foram caracterizados como conservados (OLIVEIRA, 1999). Estas variações possivelmente estão relacionadas à expressão de distintas cópias de genes que codificam essa proteína durante a infecção do *A. marginale* (EID et al., 1996). Sabe-se que, em seu ciclo evolutivo, *A. marginale* estabelece uma infecção persistente, caracterizada por ciclos de rickettsemia, nos quais novas variantes, definidas pela seqüência dos

transcritos de MSP-2 expressos (RURANGIRWA et al., 1999). A imunização de bovinos com a MSP-5 induziu a produção de altos títulos de anticorpos contra uma proteína da superfície dos corpúsculos iniciais de 19 kDa , mas que não protegeram contra o desafio com *A. marginale* virulento (PALMER & McELWAIN, 1995). Esta proteína, que apresenta epítomos conservados nos isolados brasileiros (OLIVEIRA, 1999), é codificada por um único gene altamente conservado, que expressa epítomos conformacionais conservados em isolados de *A. marginale*, *A. centrale* e *A. ovis* (MUNODZANA et al., 1998). A conservação desta proteína em todas as espécies de *Anaplasma*, aliada à presença desta MSP em glândulas salivares de carrapatos infectados com *A. marginale*, sugere que este polipeptídeo é imprescindível no ciclo de vida das rickettsias do gênero *Anaplasma* (KNOWLES et al., 1996).

SHARMA (1988) demonstrou que a imunidade não específica, conferida por preparações micobacterianas a bovinos infectados com *A. marginale*, envolve a participação de elementos celulares e citocinas ativadas inespecificamente. O micro-ambiente criado por citocinas como o interferon gama (IFN- γ), determinam o equilíbrio entre as subpopulações de células TCD4 tipo 1 e TCD4 tipo 2, resultando num ambiente favorável para que antígenos de subunidades induzam uma resposta imune predominantemente do tipo celular, a exemplo do que acontece na leishmaniose (KEMP et al., 1996). BROWN et al. (1998a e 1998b) confirmaram a participação de células TCD4, interferon gama (INF- γ) e da imunoglobulina G2 (IgG2) na proteção contra *A. marginale* em animais imunizados. Em bovinos, o IFN- γ é responsável pelo incremento na produção de IgG2 e ativação de macrófagos, a fim de que estes produzam moléculas como o óxido nítrico, que atua como um inibidor de patógenos intracelulares como protozoários e rickettsias (BROWN et al., 1998a e 1998b). Portanto, uma correta apresentação de proteínas de superfície ao sistema imune representaria um importante passo para o desenvolvimento de uma adequada resposta imune (BROWN, 1989). Com base nessa afirmativa, MONTENEGRO-JAMES et al. (1991) e PALMER & McELWAIN (1995) propuseram a utilização de antígenos de superfície

associados a adjuvantes apropriados, como forma de otimizar a estimulação imunológica específica, através da apresentação do antígeno pelos macrófagos aos linfócitos. CANTOR et al. (1993) demonstraram que os anticorpos de bovinos imunizados com a MSP-1 promoveram, *in vitro*, a fagocitose dos corpúsculos iniciais de *A. marginale* pelos macrófagos, e sugerem que a resposta humoral e a opsonização pode ser um importante mecanismo protetor *in vivo*.

Diante desses fatos, supõe-se que vacinas de subunidades eficientes no controle da anaplasnose deverão conter elementos de apresentação capazes de induzir forte resposta imune mediada por células aos antígenos de superfície de *A. marginale* (GALE et al., 1996).

Desta forma, este projeto tem como objetivo desenvolver e avaliar sistemas de imunização contra a anaplasnose. O primeiro sistema utilizará membrana externa dos corpúsculos iniciais de *A. marginale*, o segundo MSP-2 e MSP-3 recombinantes, o terceiro MSP-2 e MSP-3 sintéticos. Associados a estes antígenos serão utilizados adjuvante e imunomodulador.

1. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1. Multiplicação de *A. marginale*

Bezerros da raça Nelore, livres de infecção por hemoparasitos, esplenectomizados e imunossuprimidos com dexametazona, foram inoculados com estabilizado contendo 10^8 organismos de *A. marginale*, isolado Agreste/Pernambuco, com a finalidade de multiplicação dessa rickettsia. O sangue para obtenção de corpúsculos iniciais foi colhido em tubos estéreis com heparina, na fase aguda da infecção, antes da produção de anticorpos específicos contra *Anaplasma*.

1.2. Isolamento e análise da membrana dos corpúsculos iniciais de *A. marginale*

O isolamento foi realizado através da técnica descrita por TEBELE (1991). As amostras de sangue foram lavadas três vezes em RPMI 1640 (pH 7,0), contendo 2 mM de L-glutamina e 25 mM de HEPES, por centrifugação a 37.000 x g, por 30 minutos. A camada mais clara do *pellet*, onde concentravam-se os eritrócitos parasitados por *Anaplasma*, foi colhida e suspensa em 35 ml de RPMI. Posteriormente, a suspensão foi sonicada por 60 segundos, com potência 1,5 (sonicador Branson 250, macroponteira) e lavada por centrifugação com RPMI a 1.650 x g por 15 minutos. O *pellet* contendo os corpúsculos iniciais foi colhido e uma amostra do material foi separada para microscopia e para realização de eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida.

Paralelamente à eletroforese dos corpúsculos iniciais solubilizados, realizou-se a corrida de uma amostra de hemácias de bovino não parasitadas, para verificação da eficiência do processo de purificação. Para separação de membrana, aproximadamente 75 mg de corpúsculos iniciais foram suspensos em 2 mL de sacarose a 20% (v/v) com 10 mM de HEPES com 50 µg/ml de DNase e 50 µg/ml de RNase. Esta suspensão foi sonicada por três minutos, na potência 1,5 (sonicador Branson 250, microponteira). Para sedimentar os corpúsculos iniciais não rompidos, a suspensão foi centrifugada a 1.000 x g por 15 minutos, a 4°C. Em seguida, o sobrenadante (cerca de 2 mL) foi disposto em tubo contendo 2 mL de sacarose a 52, 48, 44, 38 e 32% (v/v) e centrifugado a 82.000 x g por 20 horas, a 5°C. As bandas resultantes foram colhidas, suspensas em HEPES 10 mM (pH 7,4) e centrifugadas a 9.400 x g, a 4°C, por 30 minutos.

Para certificação da presença da MSP-2 e MSP-5 no material obtido, realizou-se eletroforese da membrana de *Anaplasma* e a transferência das frações para membrana de nitrocelulose (*western blotting*). Posteriormente, realizou-se a incubação da membrana de nitrocelulose com os anticorpos monoclonais ANA050A2 e ANA16C1, respectivamente contra a MSP-2 e MSP-5. Na revelação das bandas, foi utilizada anti-IgG de camundongo

conjugado com peroxidase e cromógeno diamino benzidina (DAB). Também foram realizados dot-blots com a membrana de *Anaplasma* em nitrocelulose, seguido de incubação do monoclonal anti-MSP-5 ANA16C1, e da revelação, utilizando anti-IgG de camundongo conjugada com peroxidase e éster de acridina. A técnica de eletroforese foi realizada como descrita no projeto 06.2000.198.01.

1.3. Produção dos peptídeos sintéticos da MSP-2 e MSP-5

Os peptídeos sintéticos estão sendo obtidos por meio da Universidade Federal de Viçosa. A produção destes peptídeos será realizada com o complexo MSP2, com número de acesso U07863 no PDB e MSP-5, acesso número Q07408 do Swiss-Prot. Baseado nos resultados obtidos na caracterização molecular dos isolados de *A. marginale*, será utilizado o isolado da região Centro-Oeste. Para determinar a seqüência, serão purificados corpúsculos iniciais desse isolado. Para isso, serão obtidos complexos protéicos que serão seqüenciados. O sangue parasitado será processado segundo técnica descrita por PATARROYO et al. (1994). A purificação das proteínas de superfície de *A. marginale* será realizada através de eletroeluição de fragmentos em gel SDS-PAGE redutor com corpúsculos de inclusão, em aparelho eletroeluidor, modelo 422 BIO-RAD. Os complexos protéicos serão transferidos para Inmobilon-PSQ e Inmobilon-CD Charge para seqüenciamento das regiões N- e C-terminais e a parte interna da proteína. As técnicas usadas para esta transferência foram as descritas por LEGENDRE & MATSUDAIR (1988). A partir destas membranas, será feita a seqüência em fase gasosa, empregando o aparelho Applied Biosystem, modelo 470. Determinadas as seqüências e comparadas com as inferidas a partir do Suiss-protein e do PDB, estas serão submetidas à análise computacional para determinar algumas características, tais como hidrofiliicidade, hidrofobicidade, potenciais de α e β hélice, cargas elétricas, predição de epítomos T e B reativos e outros parâmetros. A otimização geométrica ajudará a escolher os peptídeos a serem sintetizados e testados. Os peptídeos sintéticos serão construídos de acordo

com as técnicas de sínteses múltipla em fase sólida, descrita por HOUGHTEN (1985). Os peptídeos construídos serão testados quanto a antigenicidade. Para isto, serão inoculados camundongos Balb/c pela via intraperitoneal com 500 µg de peptídeo por animal, mais 250 µg de saponina como adjuvante. As inoculações serão realizadas três vezes. Seis dias após a última inoculação, os camundongos serão sangrados para coleta de soro, com a finalidade de detectar anticorpos contra os peptídeos, usando um ensaio de imunoadsorção enzimática.

1.4. Grupos experimentais de imunização

Este projeto encontra-se em fase de formação do grupo experimental da vacina 1. Os grupos experimentais serão compostos por cinco bovinos da raça Holandesa, que deverão ser inoculados três vezes no intervalo de três semanas. Os seguintes grupos experimentais serão formados: Vacina 1: membrana de corpúsculos iniciais (MCI) + adjuvante (Quil A) + imunoestimulante (elementos da parede celular de micobactéria). Vacina 2: MSP-2 e MSP-5 sintéticas + adjuvante (Quil A) + imunoestimulante. Vacina 3: MSP-2 e MSP-5 recombinantes + adjuvante (Quil A) + imunoestimulante. Grupo controle 1: MCI + adjuvante. Grupo controle 2: MSP-2 e MSP-5 sintéticas + adjuvante. Grupo controle 3: MSP-2 e MSP-5 recombinantes + adjuvante. Grupo controle 4: adjuvante + imunomodulador. Grupo controle 5: animais sem imunização ou inoculação. Baseados em trabalhos anteriores, as MSPs sintéticas serão inoculadas na concentração de 50 µg por vacina e a membrana de corpúsculo inicial na concentração de 100 µg da mistura das duas camadas de membranas separadas no gradiente de sacarose.

2. RESULTADOS

Até o momento, o procedimento descrito permitiu a obtenção de corpúsculos iniciais com pequena contaminação por estroma de hemácias. No *western blot* e no *dot-blot*, verificou-se a presença da MSP-5, bem definida,

na membrana do isolado Agreste/Pernambuco de *Anaplasma* (Figura 2). No entanto, não foi possível detectar a MSP-2 pelo *Western blot*, o que provavelmente ocorreu devido ao polimorfismo genético, já que esta proteína é codificada por uma família multigênica.

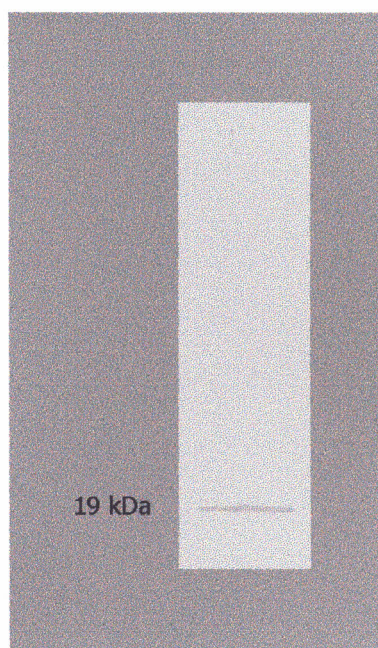


Figura 2. Revelação da proteína principal de superfície (MSP) – 5 de *Anaplasma marginale* obtida por ultracentrifugação em gradiente de sucrose. Imunodeteccção por meio de *western blotting* utilizando anticorpo monoclonal.

3. CONSIDERAÇÕES

3.1. Continuidade do projeto

Os peptídeos sintéticos da MSP-2 e MSP-5 encontram-se em fase de produção na Universidade Federal de Viçosa. As próximas etapas, imediatas, previstas serão a produção e purificação das proteínas recombinantes MSP-2 e MSP-5, e a formação e desafio dos grupos experimentais.

Em seguida será realizada a mensuração dos parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos dos animais experimentais, a avaliação da resposta imune celular e humoral, e a análise estatística dos dados.

3.2. Situação e expectativas do projeto

As atividades deste projeto encontram-se em pleno andamento e o cronograma está dentro do prazo previsto. As expectativas são do projeto ser concluído na íntegra e dentro da previsão.

Este projeto contribuirá na obtenção de um método mais seguro e eficiente de imunização contra *A. marginale*, evitará a utilização da premunicação e os problemas resultantes desta forma de imunização.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBET, A.F., BLENTLINGER, R., YI, J., LUNDGREN, A.M., BLOUIN, E.F., KOCAN, K.M. Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture, tick salivary glands, and cattle. *Infect. Immun.*, v.67, n.1, p.102-107, 1999.
- BROWN, W.C., SHKAP, A, ZHUE, D., McGUIRE T.C., TUO, W., McELWAIN T.F., PALMER, G.H. CD4 T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infect. Immun.*, v.66, p.5406-5413, 1998.
- BROWN, F. The development of chemically synthesized vaccines. *Advances Vet. Sci. Comp. Med.*, v.33, p.173-193, 1989.
- BROWN, W.C., ZHU, D., SHKAP, V., McGUIRE, T.C., BLOUIN, E.F., KOCAN, K.M., PALMER, G.H. The repertoire of *Anaplasma marginale* antigens recognized by CD4(+) T-lymphocyte clones from protectively immunized cattle is diverse and includes major surface protein 2 (MSP-2) and MSP-3. *Infect. Immun.*, v.66, n.11, p.5414-5422, 1998.
- CANTOR, G.H., PONTZER, C.H., PALMER, G.H. Opsonization of *Anaplasma marginale* mediated by bovine antibody against surface protein MSP-1. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.37, n.3-4, p. 343-350, 1993.
- EID, G., FRENCH, D.M., LUNDGREN, A.M., BARBET, A.F., McELWAIN T.F., PALMER, G.H. Expression of major surface protein 2 antigenic variants during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia. *Infect. Immun.*, v.64, n.3, p.836-841, 1996.
- GALE, K.R., GARTSIDE, M., DIMMOCK, C.M., ZACKREWSKI, H., LEATCH, G. Peripheral blood lymphocyte proliferative responses in cattle infected with or vaccinated against *Anaplasma marginale*. *Parasit. Res.*, v.82, p.551-562, 1996.
- HENRY, E.T., NORMAN, B.B., FLY, D.E., WICHMANN, R.W., YORK, S.M. Effects and use of a modified live *Anaplasma marginale* vaccine in beef heifers in California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.183, n.1, p.66-69, 1983.

- HOUGHTEN, R.A. General method for the rapid solid-phase synthesis of large number of peptides: specificity or antigen-antibody interaction at the level of individual aminoacids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.82, p.5131-5139, 1985.
- KEMP, M., THEANDER, T.G., KHARAZNI, A. The contrasting roles of CD4 T cells in intracellular infections in humans: leishmaniasis as an example. *Immun. Today*, v.17, p.13-15, 1996.
- KNOWLES, D., TORIONI, D.E., ECHAIDE, S., PALMER, G.H., McGUIRE, T.C., STILLER, D., McELWAIN, T.F. Antibody against *Anaplasma marginale* MSP-5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *J. Clin. Microb.*, v.34, p.2225-2230, 1996.
- LEGENDRE, N., MATSUDAIRA, P. Direct protein microsequencing from Immobilon-P Transfer Membrane. *Biotechniques*, v.6, n.2, p.154-159, 1988.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E REFORMA AGRÁRIA. Secretaria de Defesa Sanitária Animal (Brasília, DF). *Carrapato, berne e bicheira no Brasil*. Brasília, D.F., 1984, 153 p.
- MONTENEGRO-JAMES, S., JAMES, M.A, BENITEZ, M.T., LEON, E., BAEK, B.K., GUILLEN, A T. Efficacy of purified *Anaplasma marginale* initial bodies as a vaccine against anaplasmosis. *Parasit. Res.*, v.77, p.93-101, 1991.
- MUNODZANA, D., McELWAIN, T.F., KNOWLES, D.P., PALMER, G.H. Conformational dependence of *Anaplasma marginale* major surface protein 5 surface-exposed B-cell epitopes. *Infect. Immun.*, v.66, n.6, p.2619-2624, 1998.
- OLIVEIRA, J.B. *Identificação e caracterização dos isolados brasileiros de Anaplasma marginale Theiler, 1910, Rickettsiales, Anaplasmatocae, através da imunofluorescência indireta e Western blotting com anticorpos monoclonais*. Rio de Janeiro, 1999, 123p. Tese (Doutorado)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- PALMER, G.H. *Anaplasma* vaccines. In: WRIGHT, I.G. *Veterinary Protozoan and Hemoparasite Vaccines*. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 1989. p.1-29.
- PALMER, G.H., BARBET, A.F., DAVIS, W.C., McGUIRE, T.C. Immunization with an isolate-common surface protein protects cattle against anaplasmosis. *Science*, v.231, p.1299-1302, 1986.
- PALMER, G.H., McELWAIN T.F. Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Veterinary Parasitology*, v.37, p.233-253, 1995.
- PALMER, G.H., OBERLE, S.M., BARBET, A.F., GOFF, W.L., DAVIS, W.C., McGUIRE, T.C. Immunization of cattle with a 36-kilodalton surface protein induces protection against homologous and heterologous *Anaplasma marginale* challenge. *Infect. Immun.*, v.56, n.6, p.1526-1531, 1988.

- PATARROYO, J.H., HENCKEL, D.J., PRATES, A.A., MAFRA, C.L. Antigenic profile of a pure isolate of *Anaplasma marginale* of Brazilian origin, using a western blot technique. *Vet. Parasitol.*, v.52, n.1-2, p.129-137, 1994.
- RURANGIRWA, F.R., STILLER, D., FRENCH, D.M., PALMER, G.H. Restriction of major surface protein 2 (MSP2) variants during tick transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.96, n.6, p.3171-3176, 1999.
- SCHENK, M.A.M., KESSLER, R.H. Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 1998.
- SHARMA, S.P. Non specific immunization against *Anaplasma marginale* by using *Mycobacterium phlei*. *Ind. J. Vet. Med.*, v.8, p.125-127, 1988.
- TEBELE, N., McGUIRE, T.C., PALMER, G.H. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infect. Immun.*, v.59, n.9, p.3199-3204, 1991.
- ZAUGG, J.L. Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation. *Am. J. Vet. Parasit.*, v.46, p.570-572, 1985.



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte
Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Rodovia BR 262 km 4, CEP 79002-970 Campo Grande, MS
Telefone (67) 768 2064 Fax (67) 763 2700
www.cnpqg.embrapa.br*

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA
E DO ABASTECIMENTO**



Trabalhando em todo o Brasil