

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**ENSAIO DE IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA COM  
MSP5 RECOMBINANTE TRUNCADA PARA A  
DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Anaplasma*  
*marginale* EM BOVINOS**

**Elaine Silva de Pádua Melo**

CAMPO GRANDE  
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL  
DEZEMBRO DE 2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL**  
**PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**ENSAIO DE IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA COM  
MSP5 RECOMBINANTE TRUNCADA PARA A  
DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Anaplasma*  
*marginale* EM BOVINOS**

**Elaine Silva de Pádua Melo**

Orientador: Dr. Cleber Oliveira Soares  
Co-Orientador: Dr. Flávio Ribeiro de Araújo

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Mato Grosso do Sul, como  
requisito à obtenção do título de Mestre  
em Ciência Animal. Área de concentração:  
Saúde Animal

CAMPO GRANDE  
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL  
2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Coordenadoria de Biblioteca Central – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil)

M528e Melo, Elaine Silva de Pádua.  
Ensaio de imunoadsorção enzimática com MSP5 recombinante truncada para a detecção de anticorpos contra Anaplasma marginale em bovinos / Elaine Silva de Pádua Melo. -- Campo Grande, MS, 2006.  
54 f. ; 30 cm.

Orientador: Cleber Oliveira Soares.  
Co-orientador: Flávio Ribeiro de Araújo.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

1. Anaplasmose. 2. Bovino - Doenças. I. Soares, Cleber Oliveira. II. Araújo, Flávio Ribeiro de. III. Título.

CDD (22) – 636.20896922

# ELAINE SILVA DE PÁDUA MELO

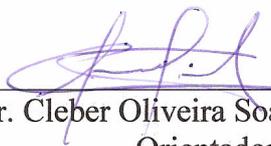
**“Ensaio de imunoabsorção enzimática com MSP5 recombinante truncada para a detecção de anticorpos contra *Anaplasma marginale* em bovinos”**

**“Enzyme-linked immunosorbent based on recombinant truncated MSP5 protein for detection of antibodies against *Anaplasma marginale* in cattle”**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Saúde Animal

APROVADA: 18/12/2006



---

Dr. Cleber Oliveira Soares  
Orientador



Dra. Carina Elisei de Oliveira



---

Dr. Cristiano Marcelo Espínola Carvalho

*O meio mais eficiente para a avaliação  
de uma pessoa é o conhecimento  
do grau do seu espírito de justiça.*

*Meishu-Sama*

## AGRADECIMENTOS

À Deus e a Meishu-Sama, pela proteção e bênçãos recebidas a cada dia.

Aos meus pais, pelo apoio e confiança.

Ao Dr. Flávio Ribeiro de Araújo, pela amizade e pela orientação neste trabalho, principalmente no laboratório.

Ao Dr. Cleber Oliveira Soares, pelo apoio profissional.

À grande amiga Midori Miguita, pelos valiosos ensinamentos.

À Dra. Carina Elisei, pela amizade e incentivo.

Ao Dr. Cláudio Roberto Madruga, por tudo que me ensinou.

Ao meu querido Carlos Alberto, por seu companheirismo, pelo apoio no laboratório, pelas valiosas correções do trabalho escrito e por toda força que me deu para concluir este trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Gado de Corte, especialmente Michelle do Carmo, Maristeli Oliveira e Rodrigo.

Aos amigos, Renata Flores, Helena Kogushi, Livia Russi, Dina Karla e Manoel Sebastião, que sempre me deram muita força.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), pelo apoio financeiro.

À Embrapa Gado de Corte por possibilitar a utilização dos laboratórios.

## SUMÁRIO

	“Páginas”
1.0 INTRODUÇÃO .....	09
1.1 TAXONOMIA .....	09
1.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA .....	09
1.3 TRANSMISSÃO .....	10
1.4 CICLO EVOLUTIVO .....	12
1.5 PATOGENIA .....	12
1.6 CONTROLE .....	13
1.7 PROTEÍNAS PRINCIPAIS DE SUPERFÍCIE .....	14
1.7.1 Proteína MSP5 .....	15
1.8 DIAGNÓSTICO .....	16
1.8.1 Ensaio Molecular .....	16
1.8.2 Ensaio Sorológicos .....	17
1.8.2.1 Ensaio de imunoadsorção enzimática utilizando corpúsculo inicial como antígeno .....	18
1.8.2.2 Ensaio de imunoadsorção enzimática utilizando proteínas principais de superfície (MSPs) como antígeno .....	19
REFERÊNCIAS .....	20
ARTIGO	
Ensaio de imunoadsorção enzimática com MSP5 recombinante truncada para o diagnóstico de <i>Anaplasma marginale</i> em bovinos .....	29
Abstract .....	29
Resumo .....	30
Introdução .....	32
Material e Métodos .....	34
Clonagem e expressão de MSP5 truncada .....	34
Solubilização da MSP5 truncada .....	35
Purificação e avaliação da antigenicidade de MSP5 truncada .....	35
Padronização e avaliação do ELISA com MSP5 truncada .....	35
Análise estatística .....	37
Resultados e Discussão .....	37
Agradecimentos .....	41
Referências .....	41

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	“Páginas”
Quadro 1. Resultados do ELISA com MSP5 recombinante truncada com soros de bovinos livres de infecção e infectados experimentalmente por <i>Anaplasma marginale</i> .	48
Quadro 2. Desempenho do ELISA com MSP5 recombinante truncada na detecção de anticorpos contra <i>Anaplasma marginale</i> .	49
Quadro 3. Concordância entre os resultados dos ELISAs com MSP5 e MSP1a recombinantes na detecção de anticorpos contra <i>Anaplasma marginale</i> utilizando soros provenientes de regiões distintas do Brasil (Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais), Uruguai e Costa Rica.	50
Figura 1. Amplificação do gene <i>msp5</i> de isolado brasileiro (Pernambuco-Zona da Mata) de <i>Anaplasma marginale</i> por PCR.	51
Figura 2. Expressão de <i>msp5</i> de isolado brasileiro (Pernambuco-Zona da Mata) de <i>Anaplasma marginale</i> .	52
Figura 3. <i>Western Blot</i> com anticorpo monoclonal anti-MSP5 ANAF16C1 e com anti-histidina.	53
Figura 4. Avaliação da resposta de anticorpos contra MSP5 recombinante truncada desenvolvida por seis bovinos infectados experimentalmente com <i>Anaplasma marginale</i> .	54

## 1.0 INTRODUÇÃO\*

### 1.1 TAXONOMIA

*Anaplasma marginale* é uma bactéria classificada na ordem Rickettsiales, que foi recentemente reorganizada em duas famílias, Anaplasmataceae e Rickettsiaceae, baseada na análise genética de 16S rRNA, *groELS* e genes que codificam para proteínas de superfície (Dumler et al. 2001). A família Anaplasmataceae é composta por quatro gêneros de organismos intracelulares obrigatórios, com diferentes graus de similaridades, que se replicam exclusivamente em vacúolos formados pela invaginação da membrana da célula hospedeira: *Anaplasma* com 96,1%, *Ehrlichia* com 97,7%, *Wolbachia* com 95,6% e *Neorickettsia* com 94,9% (Dumler et al. 2001). O gênero *Anaplasma* inclui atualmente três patógenos, *A. marginale*, *A. centrale* e *A. ovis* e foram incluídos recentemente a este gênero *A. bovis*, classificado anteriormente como *Ehrlichia bovis*, *A. platys* (*E. platys*), *A. phagocytophilum* (classificada anteriormente em três espécies, *E. phagocytophilum*, *E. equi* e o agente da erliquiose granulocítica humana – HGE) e *Aegyptianella* (Dumler et al. 2001). O organismos pertencentes ao gênero *Anaplasma* são gram-negativos, pequenos, geralmente pleomórficos, cocóides a elipsoidais, são encontrados em vacúolos citoplasmáticos, isoladamente ou formando inclusões compactas (mórulas), estão presentes em células hematopoiéticas maduras ou imaturas como neutrófilos e eritrócitos no sangue periférico e em tecidos como o baço, fígado e medula óssea de hospedeiros mamíferos e apresentam geralmente duas formas de células grandes reticuladas e células pequenas com protoplasma condensado (Popov et al. 1998).

### 1.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

*Anaplasma marginale* é uma bactéria intraeritrocítica de bovinos e outros ruminantes, distribuída por todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, incluindo América do Sul e do Norte, África, Caribe, Rússia e Europa, com taxas de prevalência

---

\* Referências seguem as normas da revista “Pesquisa Veterinária Brasileira”

de infecção nas regiões tropicais variando entre 50 a 90% (Eriks et al. 1993, Kocan et al. 2000).

A anaplasmose é particularmente importante nas regiões de instabilidade enzoótica, nas quais há uma grande percentagem de animais susceptíveis à infecção por *A. marginale*. Nesta situação, a maioria dos animais não se infecta nos primeiros meses de vida, quando são menos susceptíveis a essa infecção. Em áreas de estabilidade enzoótica, populações de animais que são introduzidos provenientes de áreas livres de carrapato ou de rebanhos sob controle intensivo de carrapatos e bezerros na faixa etária de 30 a 120 dias com baixa imunidade apresentam maior risco de anaplasmose (Madruça et al. 1985).

### 1.3 TRANSMISSÃO

A transmissão de *A. marginale* pode ser biológica, mecânica ou transplacentária. A transmissão biológica é realizada pelos carrapatos. Mais de 20 espécies de ixodídeos com capacidade de transmitir a riquetsia para bovinos já foram descritos (Ewing 1981). *Anaplasma marginale* é transmitida pelo carrapato *Dermacentor* sp. em regiões temperadas como na América do Norte e por *Boophilus* sp. e outros gêneros nas outras regiões geográficas (Kocan et al. 1992, Ribeiro e Lima 1996). Sabe-se que os carrapatos são capazes de transmitir patógenos de forma transovariana, transestadial e intraestadial, porém a transmissão transovariana de *A. marginale* não tem sido confirmada (Stich et al. 1989, Ribeiro e Lima 1996, Kocan et al. 2000, Ruiz et al. 2005). Isto indica que a riquetsia apresenta níveis distintos de adaptação ao carrapato que pode ou não atuar como seu vetor biológico em condições naturais (Ruiz et al. 2005).

Existe uma correlação positiva entre o nível médio de riquetsemia em bovinos infectados e a taxa de infecção dos carrapatos após repasto, sendo que a taxa de infecção dos carrapatos adultos corresponde a 80% e dos carrapatos adultos expostos quando ninfas a 50%, sugerindo que a transmissão intraestadial de *A. marginale* é mais eficiente que a transmissão transestadial (Eriks et al. 1993). A transmissão intraestadial pelos carrapatos machos é o mecanismo mais importante, porque eles podem se infectar durante um curto período de repasto em bovinos com infecção crônica e podem

transmitir a riquetsia durante repetidos repastos para vários bovinos susceptíveis (Kocan et al. 2000).

Os carrapatos que se infectam por meio de repasto sanguíneo nos bovinos com infecção crônica, são capazes de transmitir *A. marginale* para outros bovinos susceptíveis, inclusive bezerros, mesmo com nível de riquetsemia menor que  $10^4$  eritrócitos infectados por mL de sangue (Eriks et al. 1993). No Brasil o carrapato *Boophilus microplus* é o único vetor biológico conhecido de *A. marginale*, confirmado pela observação de formação de colônias nas células epiteliais do intestino do carrapato por microscopia eletrônica (Ribeiro e Lima 1996).

A transmissão mecânica realizada por dípteros hematófagos dos gêneros *Tabanus* e *Stomoxys* (Ewing 1981, Foil 1989) é diretamente dependente do nível de riquetsemia durante o repasto, por isso esta transmissão só é possível durante a fase de infecção aguda dos bovinos. Apesar da transmissão mecânica ser menos eficiente do que a transmissão biológica pelos carrapatos, este mecanismo é importante do ponto de vista epidemiológico, pois representa uma das principais maneiras de disseminação de *A. marginale* em regiões das Américas e África, onde não ocorrem seus vetores biológicos (Ewing 1981), principalmente, devido às condições climáticas favoráveis, encontradas nestas regiões, para o desenvolvimento destes dípteros hematófagos (Ruiz et al. 2005). A transmissão mecânica também pode ser efetuada por meio de fômites contaminados com sangue, como agulhas, instrumentos de descorna, de tatuagem, de colocação de brincos e de castração (Kocan et al. 2003).

A transmissão transplacentária ocorre geralmente durante o 2º e 3º trimestre de gestação e é importante, especialmente quando a taxa de transmissão está correlacionada com a atividade do vetor ou com a transmissão mecânica (Zaugg 1985, Potgieter e Van Rensburg 1987). Em alguns casos de transmissão vertical, foram detectados bezerros com sinais clínicos de anaplasmoze aguda, com riquetsemia variando de 9,7% a 30%, e casos de aborto (Zaugg 1985). Já Potgieter e Van Rensburg (1987) não observaram sinais clínicos, nem a ocorrência de abortos, apesar de uma incidência de 15,6% de transmissão transplacentária, o que é significativo para a epidemiologia da doença.

## 1.4 CICLO EVOLUTIVO

O ciclo de desenvolvimento de *A. marginale*, em carrapatos machos infectados quando adultos, é um processo complexo e coordenado com o ciclo de alimentação dos carrapatos. Estes se contaminam com a riquetsia quando ingerem eritrócitos infectados durante o repasto sangüíneo. O desenvolvimento da riquetsia ocorre nas células intestinais, que depois infecta outros tecidos do carrapato, como a glândula salivar, a partir da qual, as riquetsias são transmitidas para os vertebrados durante a alimentação (Kocan et al. 1992, Eriks et al. 1993, Ge et al. 1996). A riquetsia se desenvolve em vacúolos ligados à membrana ou colônias, sendo que a primeira forma a ser visualizada é a reticulada (vegetativa), que se divide por fissão binária, formando grandes colônias que podem conter centenas de organismos. Estes então mudam para a forma densa, que é a fase infectante e pode sobreviver fora das células do hospedeiro. Os bovinos se tornam infectados com *A. marginale* quando as formas densas são transmitidas durante a alimentação dos carrapatos, via glândula salivar (Kocan et al. 2003).

## 1.5 PATOGENIA

O primeiro estágio da infecção aguda por *A. marginale* nos bovinos resulta em um rápido aparecimento de sinais clínicos, caracterizada pela elevação da temperatura, perda de apetite e diminuição na produção de leite (Jatkar e Kreier 1967). O animal desenvolve severa anemia hemolítica durante o curso da infecção, que é o principal sinal clínico da anaplasiose, resultando em perda de peso, icterícia sem hemoglobinemia e hemoglobinúria, quando 40% a 50% dos eritrócitos são lisados no processo de fagocitose e casos de aborto e morte também são observados (Jatkar e Kreier 1967, Palmer et al. 1999, Kocan et al. 2000). Os animais que sobrevivem à esta fase tornam-se portadores crônicos da doença, caracterizadas por baixas riquetsemias cíclicas, difíceis de serem detectadas microscopicamente, com ciclo de riquetsemia ocorrendo com intervalo de aproximadamente cinco semanas, o que pode permanecer por toda a vida do animal (Kieser et al. 1990, Eriks et al. 1993).

Nos casos de infecção aguda, a riquetsemia pode atingir picos maiores que  $10^8$  eritrócitos infectados por mL de sangue, mas apresenta grande variação durante o curso

da infecção. Já nos bovinos com infecção persistente, a riquetsemia varia num intervalo de  $10^3$  a  $10^6$  eritrócitos infectados por mL de sangue. Esta variação pode refletir uma multiplicação cíclica de variantes de *A. marginale* não reconhecida previamente pelo sistema imunológico do hospedeiro. Desta forma existe uma similaridade temporal no desenvolvimento da riquetsemia na infecção aguda e crônica, sugerindo uma resposta imune primária do hospedeiro, que pode controlar ambos os ciclos. Com base neste fato, os variantes antigênicos surgem durante o parasitismo intracelular e permitem que um novo ciclo de invasão e multiplicação nos eritrócitos se inicie, proporcionando um mecanismo de persistência do parasito, em face a uma resposta imune competente (Kieser et al. 1990).

Esta persistência da infecção é fundamental para continuar a transmissão da riquetsia e promover um reservatório para a transferência mecânica e biológica de eritrócitos infectados para bovinos susceptíveis. Desta forma, os bovinos com infecção crônica, quando desafiados com *A. marginale*, desenvolvem uma resposta imunológica efetiva, diminuindo a ocorrência de sinais clínicos como a anemia, mas não elimina a riquetsia, o que sugere que esta persistência envolve um mecanismo de escape da resposta imune (Palmer et al. 1999). Os bezerros são menos susceptíveis à infecção por *A. marginale*, e quando infectados, são pouco susceptíveis à doença clínica, desenvolvendo infecção persistente e imunidade para anaplasiose (Kocan et al. 2003).

## 1.6 CONTROLE

As estratégias de controle da anaplasiose variam com a localização geográfica e têm sido focadas não só no controle de infecções agudas, mas também na diminuição da população de bovinos cronicamente infectados, por meio da redução das populações de vetores, utilizando acaricidas e antibióticos ou por vacinação (Eriks et al. 1993, Kocan et al. 2000). O controle de artrópodes não é prático em muitas áreas e protege apenas parcialmente contra a transmissão de *A. marginale*, uma vez que esta bactéria possui outras vias de transmissão (Kocan et al. 2000).

A quimioprofilaxia, principalmente com tetraciclina, tem se mostrado eficaz para controlar o desenvolvimento de riquetsemias elevadas de *A. marginale*, no entanto esta eficiência depende do momento em que é administrada aos animais. Ela age inibindo a multiplicação do agente, mantendo a riquetsemia em níveis sub-clínicos, sem

interferir com o estabelecimento do estado de portador (Ribeiro et al. 2003). No entanto, a utilização de tetraciclina é dispendiosa e seu uso intensivo pode levar à seleção de cepas de *A. marginale* resistentes (Kocan et al. 2003).

A vacinação tem sido uma das formas mais econômicas e eficientes de controlar a anaplasmoze bovina, utilizando métodos de imunização tradicionais baseado principalmente em vacinas vivas e mortas de *A. marginale* ou *A. centrale* provenientes de eritrócitos infectados. Ambas as vacinas induzem imunidade protetora, que reduz ou previne a doença clínica, porém não impede que o bovino permaneça infectado com *A. marginale*, servindo como reservatório da infecção para transmissão mecânica ou biológica (Kocan et al. 2000). Outra limitação no uso destas vacinas são os efeitos adversos causados em alguns animais como vacas prenhes e animais adultos, a possibilidade de veiculação de outros agentes patogênicos (no caso da premunicação), a sensibilização de vacas contra grupos sanguíneos e conseqüente isoeritrólise neonatal em bezerros (Brizuela et al. 1998, Kessler e Schenk 1998). Atualmente, as pesquisas para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes e seguras tem sido focadas nas proteínas de membrana dos corpúsculos iniciais de *A. marginale*. Essas proteínas são expostas na superfície da bactéria, sendo facilmente acessíveis ao sistema imunológico do hospedeiro, e também desempenham importantes funções para a sobrevivência do parasito (Arulkanthan et al. 1999), tais como aderência e invasão nos eritrócitos do hospedeiro (McGarey et al. 1994, Fuente et al. 2001). Os estudos realizados a respeito da variação antigênica destas proteínas e a identificação dos principais epítomos envolvidos na resposta imunológica humoral e celular dos bovinos contra *A. marginale*, têm possibilitado o desenvolvimento de métodos de diagnóstico eficazes e rápidos que permitem estabelecer medidas apropriadas de tratamento da anaplasmoze, assim como medidas preventivas de controle (Garfias et al. 2003).

## **1.7 PROTEÍNAS PRINCIPAIS DE SUPERFÍCIE**

Seis proteínas principais de superfície (MSPs: MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5) foram inicialmente identificadas em *A. marginale* derivado de eritrócitos bovinos e também em *A. marginale* derivado de tecidos de carrapatos (Barbet et al. 1987, Oberle et al. 1988, Bowie et al. 2002). MSP1a, MSP4 e MSP5 são codificadas por um único gene e não variam antígenicamente durante a multiplicação da

riquetússia (Visser et al. 1992, Bowie et al. 2002, Molad et al. 2004). A conservação destas proteínas é importante para definir os epítomos comuns e específicos que podem ser usados para o desenvolvimento de testes sorodiagnóstico e vacinas para anaplasmose (Barbet et al. 1999, Kano et al. 2002). Já as proteínas MSP1b, MSP2 e MSP3 são codificadas por famílias multigênicas e podem variar antigenicamente durante os ciclos de riquetsemia persistentes (Alleman e Barbet 1996, French et al. 1999, Bowie et al. 2002), inclusive em isolados brasileiros (Kano et al. 2002). Recentemente, novas proteínas de membrana de *A. marginale* foram descobertas, por fracionamento protéico (Riding et al. 2003) e por análise genômica (Brayton et al. 2005).

### 1.7.1 Proteína MSP5

A MSP5 é uma proteína de 19 kDa, codificada por uma única cópia de gene, altamente conservada entre diferentes espécies de *Anaplasma*, como *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis* e *A. phagocytophilum* (Visser et al. 1992, Barbet et al. 1999, Molad et al. 2004, Brayton et al. 2005, Dreher et al. 2005). Estudos indicam a conservação de MSP5 também entre isolados da África, Israel, e Américas (Visser et al. 1992, Reyna-Bello et al. 1998, Molad et al. 2004, Dreher et al. 2005), inclusive nos isolados brasileiros Zona da Mata, Agreste e Sertão - Pernambuco e Campo Grande - Mato Grosso do Sul (Oliveira et al. 2003), São Paulo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Paraná (Kano et al. 2002). A identidade de MSP5 entre *A. marginale* e *A. centrale* foi de 92,9% na seqüência protéica e de 86,8% na seqüência de nucleotídeos (Molad et al. 2004). A similaridade de MSP5 de *A. phagocytophilum*, *A. marginale* e *A. centrale* foi 63% a 65% (Dreher et al. 2005). Esta proteína ocorre na forma monomérica, contendo pontes dissulfeto intramoleculares, e dimérica, apresentando pontes dissulfeto intermoleculares, na membrana de *A. marginale* (Vidotto et al. 1994, Munodzana et al. 1998). A análise de topologia da proteína sugere que a MSP5 de *Anaplasma* sp. contém um domínio citoplasmático N-terminal pequeno com uma única região transmembrana de 6 a 24 aminoácidos (Dreher et al. 2005). Consistindo com a estrutura secundária e terciária de MSP5 (Munodzana et al. 1998).

Um epítomo imunodominante de MSP5 é reconhecido pelo anticorpo monoclonal ANAF16C1, o qual requer regiões hidrofílicas amino e carboxi terminais de

MSP5, indicando sua natureza conformacional (Visser et al. 1992, Munodzana et al. 1998, Dreher et al. 2005). Além disso um anticorpo policlonal induzido por imunização com MSP5 nativa também reconheceu epítomos conformacionalmente dependentes na superfície de *A. marginale*. Isto indica que a ligação dos anticorpos a todos os epítomos imunodominantes de MSP5 são conformacionalmente dependentes, principalmente com relação as pontes dissulfeto que mantém a estrutura secundária e terciária da proteína (Munodzana et al. 1998). A conservação, a localização na membrana, e a presença de MSP5 em todas as espécies de *Anaplasma* já testadas, sugerem que a proteína MSP5 é importante no ciclo de vida de *Anaplasma* sp. E a presença de anticorpos para o epítomo definido pelo anticorpo monoclonal ANAF16C1 em soros de bovinos infectados, indica que este epítomo é um antígeno potencial para o uso na identificação de bovinos persistentemente infectados (Visser et al. 1992).

## 1.8 DIAGNÓSTICO

Para o diagnóstico da anaplasmoze bovina várias técnicas tem sido utilizadas, dentre elas a microscopia óptica, os ensaios moleculares e os sorológicos. Os casos de anaplasmoze aguda podem ser diagnosticados pela detecção direta do parasito, por distensões sangüíneas em microscopia óptica. No entanto, a riquetsemia de animais cronicamente infectado é geralmente baixa sendo difíceis de serem detectadas microscopicamente (Palmer 1986).

### 1.8.1 Ensaios Moleculares

O diagnóstico molecular baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR) e na hibridização de ácidos nucléicos tem se mostrado eficaz na detecção de *Anaplasma* sp. em portadores crônicos da doença e em carrapatos, devido principalmente à sua maior sensibilidade (Corona et al. 2000). Eriks et al. (1989) desenvolveram uma sonda de RNA baseada no fragmento de gene que codifica uma proteína de superfície de *A. marginale* denominada 105L, capaz de identificar e quantificar baixos níveis de riquetsemia em bovinos infectados cronicamente. Esta sonda de RNA apresentou uma sensibilidade 4.000 vezes maior que a microscopia óptica, identificando parasitemias

de 0,0025% a 0,000025% e foi capaz de detectar eritrócitos parasitados 12 dias antes que a microscopia. Resultado semelhante foi encontrado por Corona et al. (2000), que desenvolveram uma PCR capaz de detectar até 3pg de DNA genômico de *A. marginale*, equivalente a 0,0000037% de parasitemia. Uma *nested* PCR baseada na seqüência do gene *msp5* de *A. marginale* foi desenvolvida por Torioni de Echaide et al. (1998), na qual obtiveram uma alta sensibilidade e especificidade de 96% e 95% respectivamente, com capacidade de detectar baixos níveis de riquetsemia em animais persistentemente infectados. Molad et al. (2006) desenvolveram um ensaio de hibridização (*Reverse line blot* – RLB) baseado no gene 16S rRNA e uma *nested* PCR com base no gene *msp1b* que foram capazes de detectar a parasitemia com uma sensibilidade de 50 eritrócitos infetados por mL de sangue.

### 1.8.2 Ensaios Sorológicos

Muitas técnicas sorológicas para o diagnóstico da anaplasiose têm sido desenvolvidas nas últimas décadas, como a fixação de complemento, aglutinação, imunofluorescência e o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (Palmer et al. 1986). O teste de fixação de complemento apresenta uma adequada sensibilidade para levantamentos sorológicos, semelhante aos resultados obtidos com ELISA indireto (Thoen et al. 1980, Winkler et al. 1987) porém sua aplicação tem sido limitada devido principalmente à sua complexidade (Nielsen et al. 1996).

Dentre estes testes, o ELISA para detecção de anticorpos, é um dos mais utilizados, principalmente porque permite o processamento de várias amostras simultaneamente (Madruga et al. 2000), são rápidos e menos complexos que o teste de fixação de complemento (Winkler et al. 1987) e pode ser automatizado, evitando problemas com interpretações duvidosas que são comuns em teste de imunofluorescência. Os ensaios de imunoabsorção enzimática já desenvolvidos têm utilizado uma variedade de preparações de antígenos e sistemas diferentes de detecção, em geral considerados mais sensíveis e específicos que os ensaios convencionais para anticorpo, como o ensaio de imunofluorescência indireta e teste de fixação de complemento, especialmente quando detectam anticorpos na fase crônica da doença (Nielsen et al. 1996).

### 1.8.2.1 Ensaios de Imunoadsorção Enzimática utilizando Corpúsculo Inicial como Antígeno

Corpúsculos iniciais de *A. marginale* parcialmente purificados de eritrócitos bovinos infectados têm sido amplamente empregados como antígenos na padronização de ELISA indireto e utilizados em estudos epidemiológicos (Araújo et al. 1998, Souza et al. 2000, Mas et al. 2000). Thoen et al. (1980) desenvolveram um ELISA indireto, com proteína “A” de *Staphylococcus aureus*/peroxidase como conjugado e obtiveram 100% de concordância com os resultados obtidos no teste de fixação de complemento e teste de cartão, porém não alcançaram alta sensibilidade, com detecção máxima de anticorpos no soro com diluição de 1:80. Barry et al. (1986) realizaram um ELISA indireto mais sensível, capaz de detectar anticorpos em bovinos portadores por mais de três anos, em contraste com o teste de fixação de complemento que detectou infecção por menos de um ano. A eficiente discriminação entre os soros positivos e negativos deste estudo foi atribuída ao uso de conjugado anti-espécie (anti-IgG bovina de coelho/fosfatase alcalina).

Um ELISA indireto com corpúsculo inicial lisado com 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) foi desenvolvido por Winkler et al. (1987), que obtiveram uma alta sensibilidade comparado ao ELISA com antígeno particulado, talvez devido à acessibilidade adicional dos sítios antigênicos expostos após a lise com SDS. Este teste teve 100% de concordância com os resultados do teste de fixação de complemento. Duzgun et al. (1988) padronizaram um ELISA indireto, no qual utilizaram dois antígenos, um preparado a partir de sangue de bovino infectado com 80-85% de parasitemia e outro com sangue de animal de área livre de *A. marginale* e o resultado foi obtido por meio da diferença entre as densidades ópticas das leituras com os dois antígenos. Este teste apresentou uma alta sensibilidade e especificidade, e uma menor taxa de reação cruzada em relação aos trabalhos descritos anteriormente, devido principalmente ao uso dos dois antígenos e de uma pré-adsorção do soro com antígeno de eritrócito não infectado. Montenegro-James et al. (1990) desenvolveram um *dot* ELISA que apresentou 92% (isolado Venezuela) e 93% (isolado Estados Unidos) de concordância com os resultados obtidos na imunofluorescência, indicando uma similar sensibilidade entre os testes na detecção de anticorpos contra *A. marginale*. Todavia o *dot* ELISA apresentou vantagens devido ao menor consumo de tempo para a execução

da técnica e por ser mais objetivo, não requerendo também equipamentos de microscopia fluorescente. Nielsen et al. (1996) padronizaram um ELISA indireto, com antígeno preparado em pH neutro e com cátions divalentes (EDTA), fatores que resultaram no aumento da estabilidade do antígeno (especificidade de 99,6%) e na diminuição de interações inespecíficas com proteínas do soro.

### **1.8.2.2 Ensaios de Imunoadsorção Enzimática utilizando Proteínas Principais de Superfície (MSPs) como Antígeno**

A principal desvantagem dos testes que utilizam corpúsculo inicial de *A. marginale* parcialmente purificado de eritrócitos infectados é a ocorrência de um maior número de reações falso-positivas, devido à presença de contaminação com proteínas de eritrócitos no antígeno que reagem com anticorpos antieritrócitos presentes no soro, o que interfere diretamente na especificidade do teste (Duzgun et al. 1988). Neste sentido, com o intuito de melhorar o diagnóstico sorológico da anaplasose bovina, as pesquisas têm sido focadas na identificação e caracterização de antígenos de *A. marginale* pela clonagem de genes e produção de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*, que sejam apropriadas para o uso em testes de diagnóstico (Reyna-Bello et al. 1998). Entre estes antígenos de interesse estão as MSPs, que desempenham importantes funções para a sobrevivência do parasito (Arulkanthan et al. 1999), tais como aderência e invasão dos eritrócitos (McGarey et al 1994, Fuente et al 2001) e que por estarem expostas na superfície da riquetsia, são facilmente acessíveis ao sistema imunológico do hospedeiro (Arulkanthan et al. 1999). As proteínas MSP1, MSP2 e MSP4 têm sido utilizadas para o diagnóstico sorológico da anaplasose (Trueblood et al. 1991, Araújo et al. 2005), mas têm sido empregadas principalmente no desenvolvimento de vacinas (Palmer et al. 1994, Barbet 1995). Já as proteínas MSP3 e MSP5 tem mostrado maior potencial para o uso em ensaios sorológicos (Alleman e Barbet 1996, Knowles et al. 1996, Barros et al. 2005). Além disso MSP5 induz altos títulos de anticorpos em animais infectados com *A. marginale* e *A. ovis* (Visser et al. 1992, Ndung'u et al. 1995, Torioni de Echaide et al. 1998).

Devido às características de conservação do epítipo de MSP5 reconhecido pelo anticorpo monoclonal ANAF16C1, entre diferentes espécies e isolados de *Anaplasma* sp., o mesmo foi utilizado para o desenvolvimento de um ELISA competitivo, capaz de

detectar anticorpos contra *A. marginale* e *A. ovis* com alta sensibilidade e especificidade (Visser et al. 1992, Ndung'u et al. 1995). Posteriormente, um ELISA competitivo usando proteína de ligação à maltose (maltose binding protein - MBP) fusionada à MSP5 e anticorpo monoclonal ANAF16C1 foi desenvolvido, apresentando uma alta especificidade e sensibilidade, detectando anticorpos tanto na fase aguda da doença como em animais persistentemente infectados (Knowles et al. 1996, Torioni de Echaide et al. 1998). Este ELISA competitivo tem sido aplicado em estudos de soroprevalência (Vidotto et al. 1998, Molloy et al. 1999, Dreher et al. 2005). No entanto, tem apresentado resultados falso-positivo, o que pode ser devido a uma reação inespecífica entre anticorpos anti-MBP presente no soro bovino e o antígeno MSP5-MBP, o que bloqueia a ligação do anticorpo monoclonal ANAF16C1 à proteína MSP5 por uma obstrução estérica, mesmo realizando uma adsorção de MBP antes da adição do soro, não eliminando a possibilidade de que algum anticorpo anti-MBP residual produza uma reação, resultando em reações falso positivas (Knowles et al. 1996, Torioni de Echaide et al. 1998).

## REFERÊNCIAS

- Alleman A.R. & Barbet A.F. 1996. Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen. J. Clin. Microbiol. 34: 270- 276.
- Araújo F.R., Madruga C.R., Leal C.R.B., Bastos P.A.S. & Marques A.P.C. 1998. Freqüência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da Bahia. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 50: 243-246.
- Araújo F.R., Melo V.S.P., Ramos C.A.N., Madruga C.R., Soares C.O., Kessler R.H., Almeida N.F., Araújo G.S., Torres R.A.A.Jr., Fragoso S.P., Arauco P.R.C., Bacanelli G., Oliveira M.B. & Santos L.R. 2005. Development of enzyme-linked immunoadsorbent assays based on recombinant MSP1a and MSP2 of *Anaplasma marginale*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 100: 765-769.

- Arulkanthan A., Brown W.C., McGuire T.C. & Knowles D.P. 1999. Biased immunoglobulin G1 isotype responses induced in cattle with DNA expressing *mspla* of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.* 67: 3481-3287.
- Barbet A.F., Palmer G.H., Myler P.J. & McGuire T.C. 1987. Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for polypeptide Am105L. *Infect. Immun.* 55: 2428-2435.
- Barbet A.F. 1995. Recent developments in the molecular biology of anaplasmosis. *Vet. Parasitol.* 57: 43-49.
- Barbet A.F., Blentlinger R., Yi J., Lundgren A.M., Blouin E.F. & Kocan K.M. 1999. Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture, tick salivary glands, and cattle. *Infect. Immun.* 67: 102-107.
- Barros S.L., Madruga C.R., Araújo F.R., Menk C.F., Almeida M.A.O., Melo E.P.S. & Kessler R.H. 2005. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 100: 513-517.
- Barry D.N., Parker R.J., De Vos A.J., Dunster P. & Rodwell B.J. 1986. A microplate enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibody to *Anaplasma marginale* in cattle serum. *Aust. Vet. J.* 63: 76-79.
- Bowie M.V., Fuente J., Kocan K.M., Blouin E.F. & Barbet A.F. 2002. Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. *Gene.* 282: 95-102.
- Brayton K.A., Kappmeyer L.S., Herndon D.R., Dark M.J., Tibbals D.L., Palmer G.H., McGuire T.C. & Knowles D.P.Jr. 2005. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. Unit. Stat. Am.* 102: 844-849.

- Brizuela C.M., Ortellado C.A., Sanabria E., Torres O. & Ortigosa D. 1998. The safety and efficacy of Australian tick-borne disease vaccine strains in cattle in Paraguay. *Vet. Parasitol.* 76: 27-41.
- Corona B., Mazorra L.M., Blandino T. & Martínez S. 2000. Detección de *Anaplasma marginale* mediante amplificación del gen msp5. *Rev. Sal. Animal.* 22: 168-173.
- Dreher U.M., Fuente J., Hofmann-Lehmann R., Meli M.L., Pusterla N., Kocan K.M., Woldehiwet Z., Braun U. & Regula G. 2005. Serologic cross-reactivity between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12: 1177-1183.
- Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y. & Rurangirwa F.R. 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 phagocytophilum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 2145-2165.
- Duzgun A., Schuntner C.A., Wright I.G., Leatch G. & Waltisbuhl D.J. 1988. A sensitive ELISA technique for the diagnosis of *Anaplasma marginale* infections. *Vet. Parasitol.* 29: 1-7.
- Eriks I.S., Palmer G.H., McGuire T.C., Allred D.R. & Barbet A.F. 1989. Detection and quantitation of *Anaplasma marginale* in carrier cattle by using a nucleic acid probe. *J. Clin. Microbiol.* 27: 279-284.
- Eriks I.S., Stiller D. & Palmer G.H. 1993. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2091-2096.

- Ewing S.A. 1981. Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. p. 395-423. In: R. J. Hidalgo and E. W. Jones (ed.), Proceedings of the 7<sup>th</sup> National Anaplasmosis Conference. Mississippi State University, Mississippi State.
- Foil L.D. 1989. Tabanids as vectors of disease agents. Parasitol. Today. 5: 88-96.
- French D.M., Brown W.C. & Palmer G.H. 1999. Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. Infect. Immun. 67: 5834-5840.
- Fuente J., Garcia-Garcia J.C., Blouin E.F. & Kocan K.M. 2001. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. Int. J. Parasitol. 31: 145-153.
- Garfias C.R.B., Alva G.P., Azoulay Y.R. & Fernández J.O. 2003. Study of the humoral and cellular immune response in the experimental infection and reinfection of bovines with *Anaplasma marginale*. Vet. Mex. 34: 247-259.
- Ge N.L., Kocan K.M., Blouin E.F. & Murphy G.L. 1996. Developmental studies of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) infected as adult using nonradioactive *in situ* hybridization. J. Med. Entomol. 33: 911-920.
- Jatkar P.R. & Kreier J.P. 1967. Pathogenesis of anemia in *Anaplasma* infection. Ind. Vet. J. 44: 393-399.
- Kano F.S., Vidotto O., Pacheco R.C., Vidotto M.C. 2002. Antigenic characterization of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. Vet. Microbiol. 87: 131-138.
- Kessler R.H. & Schenk M.A.M. 1998. Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos. Embrapa Gado de Corte: Campo Grande, p. 157.
- Kieser S.T., Eriks I.S. & Palmer G.H. 1990. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. Infect. Immun. 58: 1117-1119.

- Knowles D.P., Torioni de Echaide S., Palmer G., McGuire T., Stiller D. & McElwain T. 1996. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2225-2230.
- Kocan K.M., Stiller D., Goff W.L., Claypool P.L., Edwards W., Ewing S.A., McGuire T.C., Hair J.A. & Barron S.J. 1992. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from infected to susceptible cattle. *Am. J. Vet. Res.* 53: 499-507.
- Kocan K.M., Blouin E.F. & Barbet A. F. 2000. Anaplasmosis control past, present, and future. *Ann. NY Acad. Sci.* 916: 501-509.
- Kocan K.M., Fuente J., Guglielmone A.A. & Melendez R.D. 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 698-712.
- Madruga C.R., Kessler R.H., Gomes A., Schenk M.A.M., Andrade D.F. 1985. Níveis de anticorpos e parasitemia de *Anaplasma marginale* em área enzoótica, nos bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. *Pesq. Agrop. Bras.* 20: 135-142.
- Madruga C.R., Marques A.P., Leal C.R.B., Carvalho C.M.E., Araújo F.R. & Kessler R.H. 2000. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against *Anaplasma marginale*. *Pesq. Vet. Bras.* 20: 109-112.
- Mas J.J.C., Widdowson M.A., Cuéllar A.M., Ribera H. & Walker A.R. 2000. Risk of babesiosis and anaplasmosis in different ecological zones of Santa Cruz Department, Bolivia. *Vet. Parasitol.* 93: 29-38.
- McGarey D.J. Barbet A.F., Palmer G.H., McGuire T.C. & Allred D.R. 1994. Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b. *Infect. Immun.* 62: 4594-4601.

- Molad T., Brayton K.A., Palmer G.H., Michaeli S. & Shkap V. 2004. Molecular conservation of MSP4 and MSP5 in *Anaplasma marginale* and *A. centrale* vaccine strain. *Vet. Microbiol.* 100: 55-64.
- Molad T., Mazuz M.L., Fleiderovitz L., Fish L., Savitsky I., Krigel Y., Leibovitz B., Molloy J., Jongejan F. & Shkap V. 2006. Molecular and serological detection of *A. centrale* and *A. marginale* infected cattle grazing within an endemic area. *Vet. Microbiol.* 113: 55-62.
- Molloy J.B., Bowles P.M., Knowles D.P., McElwain T., Bock R., Kingston T., Blight G. & Dalgliesh R. 1999. Comparison of a competitive inhibition ELISA and the card agglutination test for detection of antibodies to *Anaplasma marginale* e *Anaplasma centrale* in cattle. *Aust. Vet. J.* 77: 245-249.
- Montenegro-James S., Guillen A.T., Ma S.J., Tapang P., Abdel-Gawad A., Toro M. & Ristic M. 1990. Use of the dot enzyme-linked immunosorbent assay with isolated *Anaplasma marginale* initial bodies for serodiagnosis of anaplasmosis in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 51: 1518-1521.
- Munodzana D., McElwain T.F., Knowles D. & Palmer G.H. 1998. Conformational dependence of *Anaplasma marginale* major surface protein 5 surface-exposed B-cell epitopes. *Infect. Immun.* 66: 2619-2624.
- Ndung'u L.W., Aguirre C., Rurangirwa F.R., McElwain T.F., McGuire T.C., Knowles D. & Palmer G.H. 1995. Detection of *Anaplasma ovis* infection in goats by major surface protein 5 competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 33: 675-679.
- Nielsen K., Smith P., Gall D., Torione de Echaide S., Wagner G. & Dajer A. 1996. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Anaplasma marginale* in bovine sera. *Vet. Parasitol.* 67: 133-142.
- Oberle S.M., Palmer G.H., Barbet A.F. & McGuire T.C. 1988. Molecular size variations in an immunoprotective protein complex among isolates of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.* 56: 1567-1573.

- Oliveira J.B, Madruga C.R., Schenck M.A.M., Kessler R.H., Miguita, M. & Araújo F.R. 2003. Antigenic characterization of Brazilian isolates of *Anaplasma marginale*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 98: 395-400.
- Palmer G.H., Barbet A.F., Kuttler K.L. & McGuire T.C. 1986. Detection of an *Anaplasma marginale* common surface protein present in all stages of infection. J. Clin. Microbiol. 23: 1078-1083.
- Palmer, G. H.; Eid, G.; Barbet, A. F.; McGuire T.C. & McElwain T.F. 1994. The immunoprotective *Anaplasma marginale* major surface protein 2 is encoded by a polymorphic multigene family. Infect. Immun. 62: 3808-3816.
- Palmer G.H., Rurangirwa F.R., Kocan K.M. & Brow W.C. 1999. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. Today. 15: 253-300.
- Popov V.L., Han V.C., Chen S.M., Dumler J.S., Feng H.M., Andreadis T.G., Tesh R.B. & Walker D.H. 1998. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. J. Med. Microbiol. 47: 235-251.
- Potgieter F.T. & Van Rensburg L. 1987. The persistence of colostral *Anaplasma* antibodies and incidence of *in utero* transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. Onderst. J. Vet. Res. 54: 557-560.
- Reyna-Bello A., Cloeckert A., Vizcaíno N., Gonzatti M.I., Aso P.M., Dubray G. & Zygmunt M.S. 1998. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in Venezuela. Clin. Diag. Lab. Immunol. 5: 259-262.
- Ribeiro M.F.B. & Lima J.D. 1996. Morphology and development of *Anaplasma marginale* in midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. Vet. Parasitol. 61: 31-39.

- Ribeiro M.F.B., Facury Filho E.J., Passos L.M.F., Saturnino H.M & Malacco M.A.F. 2003. Uso de inóculo padronizado de *Anaplasma marginale* e da quimioprofilaxia no controle da anaplasmosose bovina. Arq. Bras. Med. Vet. Zoot. 55.
- Riding G., Hope M., Waltisbuhl D. & Willadsen P. 2003. Identification of novel protective antigens from *Anaplasma marginale*. Vaccine. 21: 1874-1883.
- Ruiz P.M.G., Passos L.M.F. & Ribeiro M.F.B. 2005. Lack of infectivity of a Brazilian *Anaplasma marginale* isolate for *Boophilus microplus* ticks. Vet. Parasitol. 128: 325-331.
- Souza J.C., Soares C.O., Massard C.L., Scofield A. & Fonseca A.H. 2000. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. Pesq. Vet. Bras. 20: 97-101.
- Stich R.W., Kocan K.M., Palmer G.H., Ewing S.A., Hair J.A. & Barron S.J. 1989. Transstadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentor variabilis*. Am. J. Vet. Res. 50: 1377-1380.
- Thoen C.O., Blackburn B., Mills K., Lomme J. & Hopkins M.P. 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in cattle in a herd in which anaplasmosis was diagnosed. J. Clin. Microbiol. 11: 499-502.
- Torioni de Echaide S., Knowles D., McGuire T.C., Palmer G.H., Suarez C.E. & McElwain T.F. 1998. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. J. Clin. Microbiol. 36: 777-782.
- Trueblood E.S., McGuire T.C. & Palmer G.H. 1991. Detection of *Anaplasma marginale* rickettsemia prior to onset of clinical signs by using an antigen capture enzyme linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 29: 1542-1544.

- Vidotto M.C., McGuire T.C., McElwain T.F., Palmer G.H. & Knowles D.P.Jr. 1994. Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. Infect. Immun. 62: 2940-2946.
- Vidotto M.C., Andrade G.M., Palmer G. H., McElwain T.F. & Knowles D.P. 1998. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in cattle in Parana State, Brazil, by MSP5 competitive ELISA. Ann. NY Acad. Sci. 849: 424-426.
- Visser E.S., McGuire T.C., Palmer G.H., Davis W.C., Shkap V., Pipano E. & Knowles D. 1992. The *Anaplasma marginale msp5* gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. Infect and Immun. 60: 5139-5144.
- Winkler G.C., Brown G.M. & Lutz H. 1987. Detection of antibodies on *Anaplasma marginale* by an improved enzyme-linked immnosorbent assay with sodium dodecyl sulfate-disrupted antigen. J. Clin. Microbiol. 25: 633-636.
- Zaugg J.L. 1985. Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation. Am. J. Vet. Res. 46: 570-572.

**Ensaio de imunoadsorção enzimática com MSP5 recombinante  
truncada para detecção de anticorpos contra *Anaplasma marginale* em  
bovinos\***

Elaine S.P. Melo<sup>1</sup>, Flávio R. Araújo<sup>2\*</sup>, Carlos A.N. Ramos<sup>1</sup>, Cleber O.  
Soares<sup>2</sup>, Grácia M. S. Rosinha<sup>2</sup>, Carina Elisei<sup>3</sup>, Cláudio R. Madruga<sup>2</sup>

**ABSTRACT.**- Melo E.S.P., Araújo F.R., Ramos C.A.N., Soares C.O., Rosinha G.M.S., Elisei, C., Madruga, C.R. **ELISA based on recombinant truncated MSP5 for detection of antibodies against *Anaplasma marginale* in cattle.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* xx(x):xx-xx. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, (UFMS) Campo Grande, MS. \*Autor para correspondência: flabio@cnpqc.embrapa.br

The objectives of this work were the production and solubilization of recombinant truncated MSP5 of *Anaplasma marginale* and the evaluation of its performance in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect antibodies against the rickettsia in cattle. The fragment of *msp5* gene, except the hydrophobic N-terminal region, was amplified by PCR, cloned in pTrcHis-TOPO plasmid and expressed in *Escherichia coli*. Solubilization of the recombinant protein was evaluated in different pHs and concentrations of urea. The sensibility and specificity of the assay were evaluated with 66 sera from cattle experimentally-infected and 96 sera from cattle free of *A. marginale* defined by polymerase chain reaction for *msp5* gene. Serum

---

\* Normas da revista "Pesquisa Veterinária Brasileira"

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, (UFMS) Campo Grande, MS.

<sup>2</sup> Embrapa Gado de Corte, Área de Sanidade Animal, Rodovia BR 262 Km 4, Cx. Postal 154, 79002-970, Campo Grande, MS.

<sup>3</sup> Bolsista DCR CNPq

samples from 1,666 cattle from Brazil - states of Rio Grande do Sul (73), Mato Grosso do Sul (91), Pernambuco (86), Bahia (314) and Minas Gerais (267), Uruguay (32) and Costa Rica (803) were tested by ELISAs with recombinant truncated MSP5 and with recombinant MSP1a, and the agreement between both ELISAs was calculated. ELISA with recombinant truncated MSP5 protein detected infected animals with sensibility of 96.97% and specificity of 100%. In cattle experimentally-infected, the ELISA detected antibodies from the 12<sup>th</sup> day post-infection (DPI) to the end of the experiment, at the 37<sup>th</sup> DPI. The agreement between the ELISAs with truncated MSP5 and MSP1a antigens was 95.67%, with a kappa index of 0.81. Disagreement results showed significant difference ( $p < 0.001$ ). Antibodies for *A. marginale* were detected in animals of the all the region analyzed. The ELISA with recombinant truncated MSP5 showed a good performance in ELISA for detection of antibodies against *A. marginale*, with high sensitivity and specificity, representing an important tool for the diagnosis of anaplasmosis bovine in epidemiological studies.

INDEX TERMS: *Anaplasma marginale*, ELISA, MSP5, solubilization, recombinant protein.

**RESUMO.- [ELISA com MSP5 recombinante truncada para detecção de anticorpos contra *Anaplasma marginale* em bovinos].** Os objetivos deste estudo foram produzir e solubilizar a proteína MSP5 recombinante truncada de *Anaplasma marginale*, e avaliar seu desempenho em um ensaio de imunoadsorção enzimática indireto (ELISA) para detecção de anticorpos contra a riquetsia. O gene *msp5*, exceto a região N-terminal hidrofóbica, foi amplificada por PCR, clonada em plasmídeo *pTrcHis-TOPO* e expressa em *Escherichia coli*. A solubilização da proteína recombinante foi avaliada em diferentes pHs e concentrações de uréia. A sensibilidade e

a especificidade do ensaio foram avaliados testando-se 66 soros de animais infectados experimentalmente com *A. marginale* e 96 soros negativos, com o estado de infecção destes animais confirmado por PCR. Um total de 1.666 amostras de soros bovino, provenientes do Brasil - Rio Grande do Sul (73), Mato Grosso do Sul (91), Pernambuco (86), Bahia (314) e Minas Gerais (267)-, Uruguai (32) e Costa Rica (803) foram testadas nos ELISAs com MSP5 truncada e com MSP1a recombinantes e a concordância entre os dois testes foi avaliada. O ELISA indireto com MSP5 truncada foi capaz de detectar animais infectados com 96,97% de sensibilidade e 100% de especificidade. Nos animais infectados experimentalmente, o ELISA detectou anticorpos do 12º até o último dia de observação. Os ELISAs para MSP5 e MSP1a apresentaram concordância de 95,67%, com índice *kappa* de 0,81. Os resultados discordantes apresentaram uma diferença significativa ( $p < 0,001$ ). Anticorpos contra *A. marginale* foram detectados em animais de todas as regiões estudadas. O ELISA com MSP5 recombinante truncada apresentou bom desempenho na detecção de anticorpos contra *A. marginale*, com alta sensibilidade e especificidade, representando uma importante ferramenta para o diagnóstico da anaplasmoze bovina em estudos epidemiológicos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Anaplasma marginale*, ELISA, MSP5, solubilização, proteína recombinante.

## INTRODUÇÃO

*Anaplasma marginale* é uma bactéria intraeritrocítica obrigatória que causa anaplasmosose em bovinos e outros ruminantes (Palmer 1999). É classificada na Ordem Rickettsiales, que foi recentemente reorganizada em duas Famílias Anaplasmataceae e Rickettsiaceae baseada na análise genética de 16S rRNA, *groELS* e genes que codificam para proteínas de superfície (Dumler et al. 2001). A anaplasmosose é uma doença economicamente importante em muitas regiões tropicais e subtropicais do mundo, por determinar perdas econômicas devido à mortalidade, redução do peso e da produção de leite e custos com tratamentos (Kocan et al. 2003).

Muitas técnicas sorológicas têm sido descritas para o diagnóstico de infecções por *A. marginale*, incluindo teste de aglutinação em cartão (Amerault e Roby 1968), imunofluorescência, fixação de complemento (Gonzalez et al. 1978), radioimunoensaio (Schuntner e Leatch 1988) e ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) (Thoen et al. 1980). Dentre estes, o ELISA é o teste mais aplicado (Thoen et al. 1980, Winkler et al. 1987, Duzgun et al. 1988, Nielsen et al. 1996). No entanto, existem problemas de especificidade nestes ELISAs que utilizam como antígeno, corpúsculos iniciais parcialmente purificados de eritrócitos infectados, que podem reagir inespecificamente com anticorpos anti-eritrócitos presente no soro dos animais testados (Duzgun et al. 1988).

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, que possibilitou a produção de grandes quantidades de proteínas heterólogas em culturas bacterianas, as pesquisas voltadas para o desenvolvimento de testes sorológicos foram focadas nas proteínas de membrana dos corpúsculos iniciais de *A. marginale* (Torione de Echaide et al. 1998). Seis proteínas principais de superfície (major surface proteins-MSPs: MSP1a,

MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5) foram inicialmente identificadas em *A. marginale* derivado de eritrócitos bovinos e de tecidos de carrapatos (Barbet et al. 1987, Oberle et al. 1988, Bowie et al. 2002). Essas proteínas são expostas na superfície da riquétsia, são facilmente acessíveis ao sistema imunológico do hospedeiro, e desempenham importantes funções para a sobrevivência do parasito (Arulkanthan et al. 1999).

A proteína MSP5 tem mostrado maior potencial para ser utilizada como antígeno em diagnóstico sorológico, devido suas características de conservação entre diferentes espécies e isolados de *Anaplasma* sp. (Visser et al. 1992, Ndung'u et al. 1995). No entanto, diferentes técnicas utilizadas para sua produção e purificação, têm influenciado negativamente a exequibilidade dos ensaios. Como exemplos, no ELISA competitivo, ocorrem problemas de especificidade, provavelmente relacionados à reação de anticorpos anti-proteína de ligação à maltose, a qual está fusionada à MSP5 (Torione de Echaide et al. 1998). Já no ELISA indireto com MSP5, padronizado por Silva et al. (2006), a expressão de todo o gene, incluindo a região hidrofóbica N-terminal, inviabilizou a purificação da proteína por cromatografia de afinidade em resina de agarose-níquel, dificultando a execução do teste.

Outro problema relacionado aos testes que empregam proteínas recombinantes produzidas em *Escherichia coli* consiste na eficiente solubilização das mesmas, já que, em muitos casos, são formados corpúsculos de inclusão altamente insolúveis na bactéria e os métodos de solubilização rotineiramente empregam agentes altamente desnaturantes, que alteram a conformação da proteína, e, conseqüentemente, sua antigenicidade (Patra et al. 2000).

Os objetivos deste estudo foram produzir a MSP5 recombinante truncada, excetuando o domínio hidrofóbico N-terminal da proteína, solubilizar a proteína e

avaliar seu desempenho como antígeno em um ELISA indireto para o diagnóstico de *A. marginale* em bovinos.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Clonagem e expressão de MSP5 truncada** - A extração de DNA de *A. marginale* foi realizada a partir de sangue infectado com isolado Pernambuco - Zona da Mata (PE-ZM), utilizando o *kit* Easy DNA (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. A amplificação do fragmento gênico de *msp5* foi realizada por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores *msp5* F: 5' CGCAGATCTAGCAAAATCGGCGAGAGGTTTACCACTTC 3' e *msp5* R: 5' GCGCTGCAGTGGCGCAAAATGCCCGACATACC 3', que amplificam todo o gene, exceto a região N-terminal hidrofóbica, determinado pelo programa Protean (DNASStar). Dessa forma, foi amplificado um fragmento de 543 pb (nucleotídeos 91 a 633). O produto da reação de amplificação foi utilizado para ligação ao plasmídeo *pTrcHis-TOPO* (Invitrogen), conforme metodologia descrita pelo fabricante. O plasmídeo resultante *pTrcHis-TOPO/msp5* foi utilizado para transformar células de *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen), quimicamente competentes, que posteriormente foram semeadas em meio Luria-Bertani (LB) ágar com 100 µg/mL de ampicilina, as quais foram incubadas por 12 horas a 37°C. Para verificar a presença e orientação dos insertos foi realizada PCR de colônia com os oligonucleotídeos iniciadores *msp5 forward* e *pTrcHis reverse* (vetor). A indução da expressão do gene *msp5* foi realizada com 1 mM de isopropil-tio-β-D-galactopiranosídeo (IPTG) por seis horas a 37 °C sob agitação (250 x g).

***Solubilização da MSP5 truncada*** - Após indução, 400 mL da cultura foram centrifugados a 12.000 x g a 4°C por 10 minutos e o sedimento suspenso e homogeneizado em 20 mL de tampão (tris-HCL 50 mM, EDTA 5 mM (pH 8,5), 2% de triton X-100 e 0,16 mg/mL de lisozima) e incubado por uma hora em temperatura ambiente. A solução foi sonicada oito vezes, por 30 segundos (*output* 40) (Branson Sonifier 250) em gelo e centrifugada a 10.000 x g por 20 minutos a 4°C. O sedimento foi suspenso em tris-base 100 mM, em diferentes concentrações de uréia e pHs. O sedimento foi homogeneizado e centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C para obtenção das frações solúvel e insolúvel. A fração solúvel foi diluída lentamente em 10 mL de tris-base 50 mM, uréia 2 M e o pH de toda a solução ajustado para 8,0.

***Purificação e avaliação da antigenicidade de MSP5 truncada*** - A purificação da proteína foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de agarose-níquel (ProBond, Invitrogen), em condições nativas, adicionando-se às soluções 2 M de uréia. A proteína foi concentrada em filtro Centricon YM-10 (Millipore) e sua concentração avaliada pelo método de Bradford (Protein Assay, Bio-Rad) de acordo com instruções do fabricante. A antigenicidade de MSP5 truncada recombinante foi verificada por *Western blot*, com os anticorpos monoclonais ANAF16C1 anti-MSP5 (1:500) e anti 6x-histidina (1:3.000) (Amersham Pharmacia).

***Padronização e avaliação do ELISA com MSP5 truncada*** - Para a padronização do ELISA com MSP5, diluições ótimas do antígeno, soros, conjugado e tampões utilizados no ensaio, assim como o tempo de parada da reação enzimática, foram avaliados com seis amostras de soros de bovinos negativos e seis positivos para *A. marginale* por PCR.

O ELISA foi realizado em microplacas (Costar 3590, Corning) sensibilizadas com 13 ng/poço de MSP5 recombinante truncada, diluída em PBST e incubadas a 4°C

por 12 horas. As placas foram bloqueadas com PBST contendo 5% de soro equino livre de imunoglobulinas (100 µL/poço) por uma hora a 37°C. Após cinco lavagens com PBST, os soros testes, controles positivos e negativos, diluídos 1:600 em PBST (100 µL/poço), foram adicionados e as placas incubadas por uma hora a 37°C. Após mais cinco lavagens, foi adicionado o conjugado anti-IgG bovina/peroxidase (Sigma), diluído 1:10.000 em PBST (100 µL/poço), seguido de incubação por 30 minutos a 37°C. Após cinco lavagens o cromógeno/substrato ortofenilenodiamina (OPD; Sigma)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 µL/poço) foi adicionado. A reação enzimática foi parada após cinco minutos pela adição H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 N (100 µL/poço) e os resultados obtidos em espectrofotômetro para microplacas (EL-800, Bio-Tek), com comprimento de onda de 490 nm.

O cálculo da linha de corte (*cutoff*) foi determinado para cada placa de acordo com Frey et al. (1998), utilizando 12 controles negativos e estabelecendo o nível de confiança de 99,0%.

A determinação da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e precisão do ELISA com MSP5 foi realizada de acordo com Coggon et al. (1993). Para a avaliação destes parâmetros foram testadas 162 amostras de soros, sendo 96 soros negativos e 66 soros de animais infectados experimentalmente com isolado PE-ZM de *A. marginale* obtidos do banco de soros da Área de Sanidade Animal da Embrapa Gado de Corte. O estado de infecção destes animais foi confirmado por PCR para o gene *mSP5*. Destes animais infectados experimentalmente, seis foram acompanhados a partir de uma semana antes da inoculação até 37 dias após inoculação.

Um total de 1.666 amostras de soros foram testadas no ELISA com MSP5 e no ELISA com MSP1a recombinante descrito por Araújo et al. (2005), para avaliar a concordância entre os testes. Os soros testados foram provenientes de regiões distintas do Brasil: Rio Grande do Sul (73), Mato Grosso do Sul (91), Pernambuco (86), Bahia

(314) e Minas Gerais (267), além do Uruguai (32) e da Costa Rica (803). Esses soros estavam estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , no banco de soros da Embrapa Gado de Corte e foram escolhidos baseado na disponibilidade dos mesmos.

**Análise estatística** - A avaliação da concordância entre os ELISAs com MSP5 e MSP1a foi determinada pelo índice *kappa* de acordo com Kramer e Feinstein (1981). Para avaliar a significância dos resultados discordantes entre os ELISAs foi aplicado o teste de qui-quadrado com nível de significância de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação do fragmento gênico que codifica para a porção hidrofílica de *msp5*, como esperado, resultou em um produto de cerca de 543 pb (Figura 1). Os amplicons clonados em *pTrcHis-TOPO*, geraram os plasmídeos recombinantes *pTrcHis-TOPO/MSP5*, confirmados por PCR de colônia. A expressão do fragmento do gene *msp5* atingiu produção máxima após seis horas de indução com IPTG e resultou em uma proteína truncada de aproximadamente 16 kDa, que corresponde à massa molecular esperada da porção hidrofílica de MSP5 (~13 kDa) e a do peptídeo N-terminal codificado pelo vetor *pTrcHis-TOPO* (3 kDa), que corresponde a cauda de seis histidinas (Figura 2).

A proteína, presente em corpúsculos de inclusão insolúveis, foi solubilizada eficientemente quando empregou-se 2M de uréia, em pH 12,5. A solubilização possibilitou a purificação por cromatografia de afinidade e a obtenção de uma proteína pura. Silva et al. (2006), em estudo semelhante, empregando o mesmo sistema de expressão, não obteve o mesmo êxito na purificação por cromatografia de afinidade ao utilizar proteína MSP5 integral, o que só foi possível por eletroeluição, que é um

método de baixo rendimento, e portanto pouco vantajoso para produção de proteína em larga escala. Desta forma, a maior capacidade de solubilização e purificação pode ser atribuída à utilização da proteína MSP5 truncada e fusionada à seqüência N-terminal de seis histidinas.

Trabalhos anteriores demonstraram que MSP5 é uma proteína codificada por uma única cópia de gene, altamente conservada entre diferentes isolados de *A. marginale*, bem como *A. centrale*, *A. ovis* e *A. phagocytophilum*, no que diz respeito ao epítopo definido pelo anticorpo monoclonal ANAF16C1 (Visser et al. 1992, Molad et al. 2004, Dreher et al. 2005). Conforme confirmado neste estudo, em que a proteína MSP5 truncada foi reconhecida especificamente por este anticorpo e pelo anticorpo monoclonal anti-histidina (Figura 3), mesmo após tratamento com uréia. Visser et al. (1992) e Munodzana et al. (1998) relatam uma perda parcial da capacidade de ligação do anticorpo monoclonal ANAF16C1 quando há alterações na estrutura secundária da MSP5, caracterizando o epítopo reconhecido como conformacional. A proteína manteve sua atividade antigênica após o procedimento de solubilização, evidenciando que não houve alterações apreciáveis de sua conformação, o que foi fundamental para a realização do ensaio sorológico.

Os resultados do ELISA com MSP5 truncada estão demonstrados no Quadro 1 e serviram como base para o cálculo dos parâmetros (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e precisão) para avaliar o desempenho do ensaio (Quadro 2). O ELISA indireto com MSP5 recombinante truncada foi capaz de detectar bovinos experimentalmente infectados com *A. marginale* com uma sensibilidade de 96,97%. A sensibilidade deste ELISA foi superior ao encontrado nos ELISAs indiretos com antígeno bruto de Nielsen et al. (1996) (87,3%), Montenegro-James et al. (1990) (93%) e no ELISA competitivo desenvolvido por Torione de

Echaide et al. (1998) (96%). No entanto, foi inferior ao ELISA indireto com antígeno bruto reportado por Madruga et al. (2000) (100%). Duas explicações para este resultado podem ser: i) maior diversidade de epítopos presente no antígeno com corpúsculo inicial e ii) o teste padrão utilizado por Madruga et al. (2000) para determinar o estado de infecção dos animais que foi a imunofluorescência indireta, com sensibilidade e especificidade inferior à PCR. Baseado nestas observações, verifica-se que um teste de diagnóstico em desenvolvimento, deve sempre ser comparado a outro de maior sensibilidade e especificidade.

A especificidade do ELISA com MSP5 foi superior ao ELISA competitivo de Torione de Echaide et al. (1998) (95%). Resultado este que pode ser devido à utilização de proteína de ligação à maltose (maltose binding protein - MBP) fusionada à MSP5 como antígeno no ELISA competitivo. A MBP pode induzir reações falso positivas decorrentes de interações inespecíficas entre anticorpos anti-MBP e MBP-MSP5, bloqueando a ligação do anticorpo monoclonal ANAF16C1, mesmo depois de realizar uma pré-adsorção do soro à MBP (Torione de Echaide et al. 1998). A especificidade deste ELISA também foi superior aos ELISAs com corpúsculo inicial desenvolvido por Montenegro-James et al. (1990) (96%), Nielsen et al. (1996) (99,6%) e Madruga et al. (2000) (96%). Nesses ensaios, provavelmente ocorreram contaminação dos antígenos com proteínas de eritrócitos, as quais podem reagir inespecificamente com anticorpos presentes no soro, resultando assim em reações falso positivas, que interferem diretamente na especificidade do teste (Barry et al. 1986).

Com relação ao acompanhamento dos animais experimentalmente infectados, o ELISA com MSP5 truncada recombinante detectou anticorpos específicos a partir do 12º dia após inoculação até o 37º quando foi realizada a última análise (Figura 4), enquanto que a PCR começou a detectar riquetsemia a partir do 9º dia, uma diferença

pouco importante, ao considerar que a PCR é sabidamente uma técnica de alta sensibilidade (Corona et al. 2000).

Os ELISAs com MSP5 e MSP1a detectaram 166 animais infectados e 1.428 não infectados, o que correspondeu a alta concordância de 95,67% definido pelo índice  $\kappa$  de 0,81 (Quadro 3) (Ansari-Lari 2005). Os ELISAs foram capazes de detectar bovinos infectados em todas as regiões brasileiras estudadas (Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Bahia e Minas Gerais), assim como do Uruguai e da Costa Rica. A concordância entre os ELISAs e o reconhecimento destas proteínas pelo soro de bovinos de diferentes regiões deveu-se provavelmente ao uso de proteínas com epítomos conservados, pois as proteínas MSP1a e MSP5 utilizadas neste estudo são baseadas no fragmento do gene *mSP1a* e *mSP5* respectivamente, que codificam para o domínio hidrofílico da região C-terminal de MSP1a e N-terminal de MSP5, que são conservados. Este resultado também ressalta o bom desempenho do ELISA com MSP5, uma vez que apresentou alta concordância com um ensaio de 99% de sensibilidade e 100% de especificidade (Araújo et al. 2005).

Em relação aos resultados discordantes entre os ELISAs com MSP1a e MSP5 recombinantes, encontrou-se um número significativamente maior ( $p < 0,001$ ) de soros negativos no ELISA com MSP5 truncada e positivos no ELISA com MSP1a, evidenciando que, com soros de animais naturalmente infectados, ocorre uma maior sensibilidade nesse último teste. No entanto, é provável que essa diferença de sensibilidade não reflita em alterações na interpretação da situação epidemiológica.

O ELISA com MSP5 recombinante truncada apresentou bom desempenho na detecção de anticorpos contra *A. marginale*, com alta sensibilidade e especificidade, representando uma importante ferramenta para o diagnóstico da anaplasmoze bovina em estudos epidemiológicos.

**Agradecimentos** - Este trabalho recebeu suporte da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

## REFERÊNCIAS

- Alleman A.R. & Barbet A.F. 1996. Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen. J. Clin. Microbiol. 34: 270- 276.
- Amerault T.E. & Roby T.O. 1968. A rapid card agglutination test for bovine anaplasmosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 153: 1828-1834.
- Ansari-Lari M. 2005. Comparison between two tests results,  $\kappa$  statistic instead of simple overall agreement. Vet. Parasitol. 133: 369-370.
- Araújo F.R., Melo V.S.P., Ramos C.A.N., Madruga C.R., Soares C.O., Kessler R.H., Almeida N.F., Araújo G.S., Torres R.A.A.JR., Fragoso S.P., Arauco P.R.C., Bacanelli G., Oliveira M.B. & Santos L.R. 2005. Development of enzyme-linked immunoadsorbent assays based on recombinant MSP1a and MSP2 of *Anaplasma marginale*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 100: 765-769.
- Arulkanthan A., Brown W.C., McGuire T.C. & Knowles D.P. 1999. Biased immunoglobulin G1 isotype responses induced in cattle with DNA expressing *m脾1a* of *Anaplasma marginale*. Infect. Immun. 67: 3481-3287.

- Barry D.N., Parker R.J., De Vos A.J., Dunster P. & Rodwell B.J. 1986. A microplate enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibody to *Anaplasma marginale* in cattle serum. *Aust. Vet. J.* 63: 76-79.
- Barbet A.F., Palmer G.H., Myler P.J. & McGuire T.C. 1987. Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for polypeptide Am105L. *Infect. Immun.* 55: 2428-2435.
- Bowie M.V., Fuente J., Kocan K.M., Blouin E.F. & Barbet A.F. 2002. Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. *Gene.* 282: 95-102.
- Coggon T., Rose G. & Barker D.J. 1993. Measurement, error and bias. In: Coggon T., Rose G., Barker D.J. *Epidemiology for the uninitiated.* BJM Publishing Group. 3: 20-25.
- Corona B., Mazorra L.M., Blandino T. & Martínez S. 2000. Detección de *Anaplasma marginale* mediante amplificación del gen msp5. *Rev. Sal. Animal.* 22: 168-173.
- Dreher U.M., Fuente J., Hofmann-Lehmann R., Meli M.L., Pusterla N., Kocan K.M., Woldehiwet Z., Braun U. & Regula G. 2005. Serologic cross-reactivity between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12: 1177-1183.

- Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y. & Rurangirwa F.R. 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 phagocytophilum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 2145-2165.
- Duzgun A., Schuntner C.A., Wright I.G., Leatch G. & Waltisbuhl D.J. 1988. A sensitive ELISA technique for the diagnosis of *Anaplasma marginale* infections. *Vet. Parasitol.* 29: 1-7.
- Frey A., Canzio J. & Zurakowski D. 1998. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *J. Immunol. Meth.* 221: 35-41.
- Fuente J., Garcia-Garcia J.C., Blouin E.F. & Kocan K.M. 2001. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. *Int. J. Parasitol.* 31: 145-153.
- Gonzales E.F., Long R.F. & Todorovic R.A. 1978. Comparisons of the complement-fixation, indirect fluorescent antibody, and card agglutination tests for the diagnosis of bovine anaplasmosis. *Am. J. Vet. Res.* 39: 1538-1541.
- Knowles D.P., Torioni de Echaide S., Palmer G., McGuire T., Stiller D. & McElwain T. 1996. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and

erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2225-2230.

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

Kramer M.S. & Feinstein A.R. 1981. Clinical biostatistics. LIV. The biostatistics of concordance. *Clin. Pharmacol. Ther.* 29: 111-123.

Madruga C.R., Marques A.P., Leal C.R.B., Carvalho C.M.E., Araújo F.R. & Kessler R.H. 2000. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against *Anaplasma marginale*. *Pesq. Vet. Bras.* 20: 109-112.

McGarey D.J. BARBET A.F., PALMER G.H., McGuire T.C. & ALLRED D.R. 1994. Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b. *Infect. Immun.* 62: 4594-4601.

Molad T., Brayton K.A., Palmer G.H., Michaeli S. & Shkap V. 2004. Molecular conservation of MSP4 and MSP5 in *Anaplasma marginale* and *A. centrale* vaccine strain. *Vet. Microbiol.* 100: 55-64.

Montenegro-James S., Guillen A.T., Ma S.J., Tapang P., Abdel-Gawad A., Toro M. & Ristic M. 1990. Use of the dot enzyme-linked immunosorbent assay with isolated

- Anaplasma marginale* initial bodies for serodiagnosis of anaplasmosis in cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 51: 1518-1521.
- Munodzana D., McElwain T.F., Knowles D. & Palmer G.H. 1998. Conformational dependence of *Anaplasma marginale* major surface protein 5 surface-exposed B-cell epitopes. Infect. Immun. 66: 2619-2624.
- Ndung'u L.W., Aguirre C., Rurangirwa F.R., McElwain T.F., McGuire T.C., Knowles D. & Palmer G.H. 1995. Detection of *Anaplasma ovis* infection in goats by major surface protein 5 competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 33: 675-679.
- Nielsen K., Smith P., Gall D., Torione de Echaide S., Wagner G. & Dajer A. 1996. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Anaplasma marginale* in bovine sera. Vet. Parasitol. 67: 133-142.
- Oberle S.M., Palmer G.H., Barbet A.F. & McGuire T.C. 1988. Molecular size variations in an immunoprotective protein complex among isolates of *Anaplasma marginale*. Infect. Immun. 56: 1567-1573.
- Palmer G.H., Rurangirwa F.R., Kocan K.M. & Brow W.C. 1999. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. Today. 15: 253-300.

- Patra, A. K.; Mukhopadhyay, R.; Mukhija, R.; Krishnan, A.; Garg, L. C.; Panda, A. K. 2000. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Prot. Expres. Purif.* 18: 182-192.
- Schuntner C.A. & Leatch G. 1988. Radioimmunoassay for *Anaplasma marginale* antibodies in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 49: 504-507.
- Silva V.M.G., Araújo F.R., Madruga C.R.M., Soares C.O., Kessler R.H., Almeida M.A.O., Fragoso S.P., Santos L.R., Ramos C.A.N., Bacanelli G. & Torres Júnior R.A.A. 2006. Comparison between indirect enzyme-linked immunosorbent assays for *Anaplasma marginale* antibodies with recombinant major surface protein 5 and initial body antigens. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 5: 511-516.
- Thoen C.O., Blackburn B., Mills K., Lomme J. & Hopkins M.P. 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in cattle in a herd in which anaplasmosis was diagnosed. *J. Clin. Microbiol.* 11: 499-502.
- Torioni de Echaide S., Knowles D., McGuire T.C., Palmer G.H., Suarez C.E. & McElwain T.F. 1998. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *J. Clin. Microbiol.* 36: 777-782.
- Trueblood E.S., McGuire T.C. & Palmer G.H. 1991. Detection of *Anaplasma marginale* rickettsemia prior to onset of clinical signs by using an antigen capture enzyme linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1542-1544.

Visser E.S., McGuire T.C., Palmer G.H., Davis W.C., Shkap V., Pipano E. & Knowles D. 1992. The *Anaplasma marginale msp5* gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infect and Immun.* 60: 5139-5144.

Winkler G.C., Brown G.M. & Lutz H. 1987. Detection of antibodies on *Anaplasma marginale* by an improved enzyme-linked immunosorbent assay with sodium dodecyl sulfate-disrupted antigen. *J. Clin. Microbiol.* 25: 633-636.

Quadro 1. Resultados do ELISA com MSP5 recombinante truncada com soros de bovinos livres de infecção e infectados experimentalmente por *Anaplasma marginale*.

<b>ELISA MSP5</b>	<b>Estado de infecção dos bovinos (PCR)</b>		
	Positivo	Negativo	<b>Total</b>
Positivo	64	0	64
Negativo	2	96	98
<b>Total</b>	66	96	162

Quadro 2. Desempenho do ELISA com MSP5 recombinante truncada na detecção de anticorpos contra *Anaplasma marginale*.

<b>Parâmetros</b>	<b>%</b>
Sensibilidade	96,97
Especificidade	100,00
Valor Preditivo Positivo	100,00
Valor Preditivo Negativo	97,96
Precisão	98,76

Quadro 3. Concordância entre os resultados dos ELISAs com MSP5 e MSP1a recombinantes na detecção de anticorpos contra *Anaplasma marginale* utilizando soros provenientes de regiões distintas do Brasil (Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais), Uruguai e Costa Rica.

ELISA		MSP1a			Índice k
		Positivo	Negativo	Total	
	Positivo	166	29	195	
<b>MSP5</b>	Negativo	43	1428	1471	0,81
	Total	209	1457	1666	

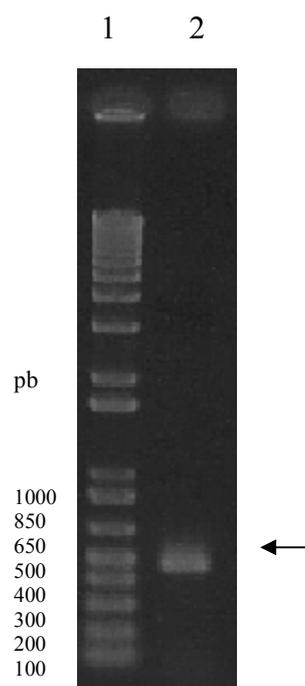


Figura 1: Amplificação do gene *msp5* de isolado brasileiro (Pernambuco-Zona da Mata) de *Anaplasma marginale* por PCR. Linha 1: Marcador de pares de base 1Kb Plus (Invitrogen); linha 2: Fragmento do gene *msp5* amplificado.

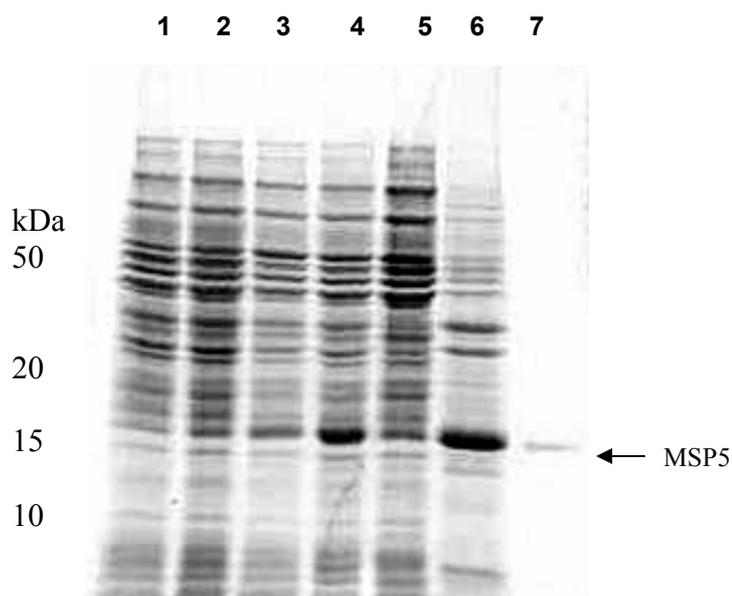


Figura 2: Expressão de *msp5* de isolado brasileiro (Pernambuco-Zona da Mata) de *Anaplasma marginale*. Linha 1: *Escherichia coli* TOP10 transformada com *pTrcHis-TOPO/msp5* sem indução com IPTG; linha 2: indução por 2 h com IPTG; linha 3: indução por 4 h com IPTG; linha 4: indução por 6 h com IPTG; linha 5: fração insolúvel; linha 6: fração solúvel; linha 7: MSP5 recombinante purificada (16kDa).

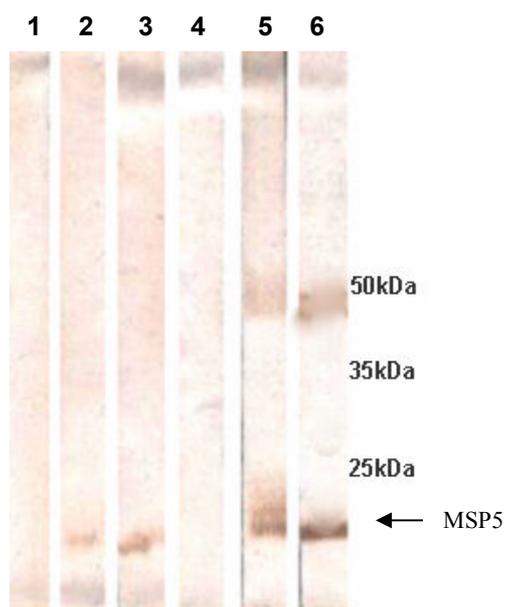


Figura 3: *Western Blot* com anticorpo monoclonal anti-MSP5 ANAF16C1 (Linhas 1-3) e com anti-histidina (Linhas 4-6). Linhas 1 e 4: *Escherichia coli* TOP10 transformada com *pTrcHis-TOPO/msp5* sem indução com IPTG; linhas 2 e 5: *E. coli* TOP10 transformada com *pTrcHis-TOPO/msp5* após 6h de indução com IPTG; linhas 3 e 6: MSP5 recombinante truncada purificada (16kDa).

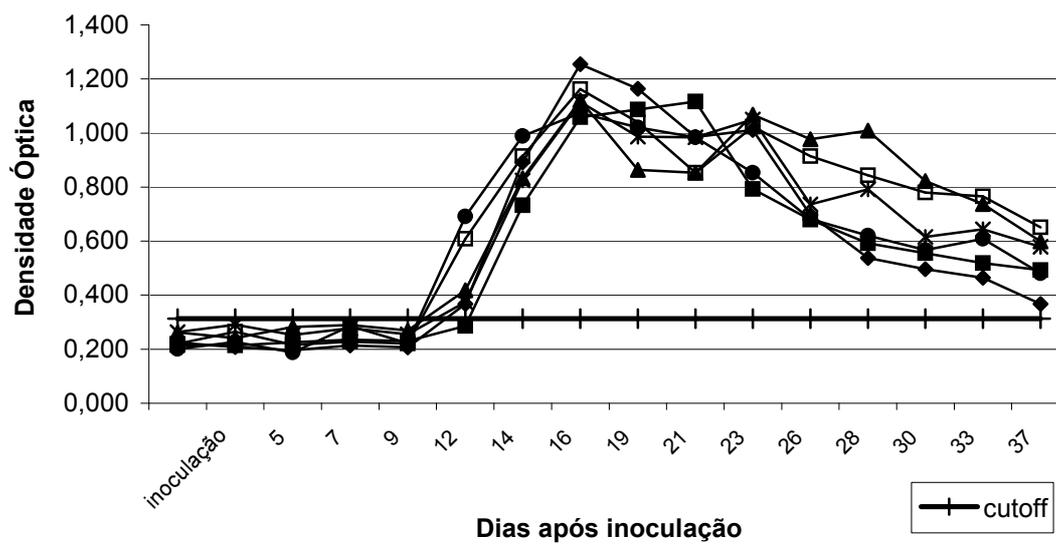


Figura 4: Avaliação da resposta de anticorpos contra MSP5 recombinante truncada desenvolvida por seis bovinos infectados experimentalmente com *Anaplasma marginale*.