

# Identificación de antígenos IgG2 específicos en tres cepas mexicanas de *Anaplasma marginale*

## Identification of IgG2 specific antigens in three Mexican *Anaplasma marginale* strains

Robert Barigye<sup>a</sup>, Miguel Ángel García-Ortiz<sup>b</sup>, Edmundo Enrique Rojas Ramírez<sup>b</sup>, Sergio D. Rodríguez Camarillo<sup>b</sup>

### RESUMEN

Con objeto de identificar antígenos de *Anaplasma marginale* asociados a la protección, animales susceptibles se vacunaron tres veces con cuerpos iniciales de la cepa Méx-17, mezclados con saponina o un adyuvante oleoso, y desafiados 164 días después de la primera inmunización con la cepa Méx-30. Los bovinos inmunizados mostraron cambios mínimos de los parámetros clínicos en comparación con los testigos. Al Elisa, los sueros de los bovinos inmunizados mostraron valores positivos y ninguna respuesta para los testigos. Los índices de estimulación (IE) ( $\geq 2.0$ ) para células mononucleares de sangre periférica cultivadas en presencia de extractos de cada una de las tres cepas de *A. marginale* fueron positivos sólo en los bovinos inmunizados; al desafío, los IE para los bovinos inmunizados y testigos también fueron positivos. Al inmunoblot, se reconocieron proteínas de entre 15 a 209 kDa de las cuales, 11 fueron específicamente reconocidas por IgG2 en la cepas Méx-17 y Méx-30 y adicionalmente una proteína de 52 kDa en Méx-15 sólo por los sueros de los bovinos inmunizados y protegidos. El inmunoblot de dos dimensiones de la cepa Méx-17 mostró una proteína adicional de 37 kDa que co-migraba con una proteína que corresponde a MSP-2. Los resultados indican que estas 11 proteínas específicamente reconocidas por IgG2 de animales protegidos, participaron en la respuesta protectora; cuatro de éstas corresponden a las MSPs ya caracterizadas, y siete son nuevos antígenos nunca antes publicados por sus propiedades inmunoprotectoras.

**PALABRAS CLAVE:** *Anaplasma marginale*, Inmunoglobulina 2, Antígeno IgG2-específico, Linfoproliferación, Bovino.

### ABSTRACT

In order to identify *Anaplasma marginale* antigens associated with protection, susceptible animals were inoculated on three occasions with inactivated Mex-17 *A. marginale* initial bodies mixed with saponin or an oil-based adjuvant. Animals were challenge inoculated with strain Mex-30 on d 164. With the exception of two animals which died at challenge, all other immunized animals showed minimum clinical signs compared with control animals. At ELISA, positive antibody titers were observed in immunized whereas no titers were detected in controls. In vitro proliferation indexes (PI) for mononuclear cells cultured in the presence of extracts of the three strains were positive ( $\geq 2.0$ ) for all immunized bovines, whereas all both vaccinated and control animals developed PI after challenge inoculation. Western blot (WB) analysis of vaccinates sera showed recognition of antigens in a range between 15 to 209 kDa, of which eleven were specifically recognized by IgG2 in Mex-17 and Mex-30 strains. Additionally, a 52 kDa protein was observed in the Mex-15 extract by the sera of immunized and protected bovines. Two-dimension WB analysis of Mex-17 showed an additional 37 kDa protein that co-migrated with a band of similar molecular weight of MSP-2. Our results indicate that these eleven IgG2 specific proteins are associated with an immunoprotective response induced by vaccination. Four of these proteins correspond to previously characterized major-surface proteins and seven are novel antigens previously unreported for their immunoprotective properties.

**KEY WORDS:** *Anaplasma marginale*, Immunoprotective antigen, IgG2-specific antigen, Vaccine candidate antigens.

Recibido el 14 de abril de 2003 y aceptado para su publicación el 3 de julio de 2003.

a Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

b CENID-Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), AP 206 CIVAC, 62500 Jiutepec, Morelos, México. rodrigus@pavet.inifap.conacyt.mx. Correspondencia al cuarto autor.

El presente trabajo corresponde a la tesis para la obtención del grado de Doctor en Ciencias del primer autor.

## INTRODUCCIÓN

La anaplasmosis bovina, causada por la rickettsia *Anaplasma marginale*, es una enfermedad de gran importancia económica, y es transmitida por artrópodos hematófagos. La rickettsia infecta los eritrocitos, ocasionando una anemia severa asociada con anorexia, fiebre, pérdida de peso, disminución en la producción de leche y muerte en los casos severos de animales no tratados<sup>(1)</sup>.

Inmunógenos inactivados a partir de la rickettsia se han utilizado en la prevención de la enfermedad, evitando el desarrollo de rickettsemias altas y cuadros clínicos agudos<sup>(2)</sup>. Recientemente los esfuerzos se dirigen hacia la identificación de los mecanismos involucrados en la respuesta inmune y de antígenos asociados a esta inmunidad inducida<sup>(3,4)</sup>. El estudio de la respuesta inmune de animales protegidos contra la anaplasmosis indica que la protección está asociada a una actividad fagocitaria aumentada de los macrófagos, inducida a su vez por linfocitos CD4<sup>+</sup> productores de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), interleucina (IL) 2, IL-12 y factor de necrosis tumoral (TNF) $\alpha$ , que a su vez inducen la producción de inmunoglobulina (IgG)2 hacia antígenos de superficie de la rickettsia, y la producción de óxido nítrico por parte de los macrófagos activados, compuesto altamente tóxico para las rickettsias<sup>(5,6,7,8,9)</sup>.

Acorde a este modelo, el uso de líneas de células-T como sondas ha ayudado a identificar y caracterizar epítomos inmunoprotectores en un grupo reducido de antígenos de la superficie de la membrana de esta rickettsia (MSP's por sus siglas en inglés, "major surface proteins")<sup>(3)</sup>, que se asocian con la producción de IgG2 y citocinas tipo Th1 como IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$ <sup>(6)</sup>. De las seis MSP's identificadas en cepas de *A. marginale* provenientes de zonas geográficas distantes, la MSP-1a o la MSP-2 de la cepa Florida mezcladas con saponina como adyuvante, indujeron protección en terneros contra desafíos homólogos<sup>(10)</sup>, y un menor grado de protección contra desafíos heterólogos. Sin embargo, la edad de los animales experimentales (menos de un año de edad) pone en duda la confiabilidad de los resultados, ya que animales de esa edad son, de manera no específica, resistentes a la anaplasmosis<sup>(11)</sup>.

## INTRODUCTION

Bovine anaplasmosis, caused by the rickettsia organism *Anaplasma marginale*, is a disease of great economic importance which is transmitted by hematophagous arthropods. The rickettsia infects bovine erythrocytes causing a severe anaemia associated with anorexia, fever, loss of weight and in milk production and death in the severe cases of untreated animals<sup>(1)</sup>.

Inactivated immunogens derived from the rickettsia used as prophylactic means against the disease have lessened high rickettsemias and acute clinical syndrome<sup>(2)</sup>. Recently, efforts have been oriented towards the identification of the immune mechanisms involved and of antigens associated to this immunity<sup>(3,4)</sup>. Studies of the immune response of protected animals against anaplasmosis indicate that protection is associated to a macrophage increased phagocytic activity which is induced by gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) and interleukin (IL) 2, IL-12 and tumor necrosis factor (TNF) $\alpha$  producing CD4<sup>+</sup> lymphocytes which in turn induce the production of immunoglobulin (IgG)2 towards antigens on surface of rickettsia and the production of nitric oxide by activated macrophages, a highly toxic compound for rickettsias<sup>(5,6,7,8,9)</sup>.

In agreement with this model, the use of T-cells lines as probes has helped in the identification and characterization of immunoprotective epitopes in a reduced group of Major Surface Protein antigens of this rickettsia<sup>(3)</sup>. These antigens are associated with the production of IgG2 and Th1 type cytokines such as IL-2, IL-12 and IFN- $\gamma$ <sup>(6)</sup>. Out of the six MPS's identified in *A. marginale* strains from distant geographic areas, MSP-1a or MSP-2 from the Florida strain mixed with saponin as adjuvant, induced protection in bull calves against homologous challenge<sup>(10)</sup> and a lower level of protection against heterologous challenge. Nevertheless, the age of the experimental animals (less of a year of age) makes these results doubtful as animals of that age are, in a nonspecific way, resistant to the anaplasmosis<sup>(11)</sup>.

In addition to the MPS's, a variable number of proteins recognized by Ig's of protected animals

Aún cuando se ha informado de un número variable de proteínas reconocidas por Ig's de animales protegidos adicionales a las ya mencionadas<sup>(6,12)</sup>, éstas no han sido estudiadas con respecto a sus propiedades inmunoprotectoras contra la anaplasmosis.

En estudios hechos en México<sup>(13)</sup> con bovinos adultos vacunados con cuerpos iniciales de tres cepas mexicanas de *A. marginale*, se mostró protección completa al desafío homólogo y protección parcial pero sustantiva (75 %) contra el desafío heterólogo. A pesar de estos resultados, se desconocen los antígenos responsables de inducir dicha protección y se considera que, además de las MSP's ya caracterizadas, existen otras proteínas IP en estas cepas mexicanas.

El objetivo de este estudio fue la identificación de antígenos, diferentes de los MSP's ya conocidos, con capacidad de inducir la producción de IgG2 y la linfoproliferación *in vitro*, a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de bovinos adultos inmunizados con un inmunógeno inactivado y, desafiados en forma heteróloga.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Cepas de A. marginale*

Se utilizaron cepas mexicanas Méx-15, Méx-17 y Méx-30 de *Anaplasma marginale* previamente caracterizadas con respecto de su virulencia en y en forma molecular con respecto de sus MSP-1 y MSP-4<sup>(14,15,16)</sup>.

### *Animales experimentales*

Para los experimentos de inmunización, se utilizaron 10 vaquillas de raza Hereford de 18 meses de edad provenientes de Coahuila, México, de hatos libres de brucelosis, tuberculosis y garrapatas, negativos a la anaplasmosis por ELISA, se trasladaron al CENID-PAVET en donde fueron mantenidos en condiciones libres de garrapatas.

### *Preparación del inmunógeno experimental*

Cuerpos iniciales usados para la inmunización y como antígeno para los experimentos de linfoproliferación

have been reported,<sup>(6,12)</sup> yet, these have not been studied with respect to their immunoprotective properties against Anaplasmosis.

Studies performed in Mexico<sup>(13)</sup> with adult bovines vaccinated with initial bodies of three Mexican strains of *A. marginale*, showed complete protection against homologous challenge and partial but substantial protection (75 %) against heterologous challenge. In spite of these results, the antigens responsible for the induction of this protection are not known and we believe that, in addition to the MSP's already characterized, there exist other immunoprotective proteins in these Mexican strains.

## MATERIALS AND METHODS

### *Anaplasma marginale strains.*

Mexican *Anaplasma marginale* strains Mex-15, Mex-17 and Mex-30 have been previously characterized with regards to virulence and molecularly, with regards to their MSP-1 and MSP-4<sup>(14,15,16)</sup>.

### *Experimental animals*

For the immunization experiments, 10 cross-bred heifers, 18 mo of age bought in the state of Coahuila, Mexico and free of anaplasmosis, babesiosis, brucellosis, tuberculosis and ticks were used. The bovines were transported to the CENID-PAVET where they were maintained in tick-free stables.

### *Preparation of the experimental immunogen*

Initial bodies (IB) used for the vaccination experiments and at the *in vitro* lymphocyte proliferation assay were prepared from infected blood by a combination of sonication and differential centrifugation in Puck's saline solution pH 7.4<sup>(17)</sup> as previously described<sup>(13)</sup>: infected blood with the strain of interest, was thawed at 37 °C and diluted 1:3 in Puck's saline solution and centrifuged to 1000 xg, 4 °C for 10 min to sediment white cell nuclei. The sediment was discarded and the supernatant was washed by centrifugation for 30 min at 25,000 xg, 4 °C to eliminate the hemoglobin, every time recovering the sediment composed of erythrocyte membranes and *A. marginale* IB. The

*in vitro*, se prepararon a partir de sangre infectada por una combinación de sonicación y centrifugación diferencial en solución salina de Puck, pH 7.4<sup>(17)</sup> como se ha descrito<sup>(13)</sup>; sangre infectada con las cepas en cuestión, se descongeló a 37 °C y se diluyó 1:3 en solución salina de Puck, y se centrifugó a 1000 xg, a 4 °C por 10 min para sedimentar los núcleos de las células blancas. El sedimento se desechó y el sobrenadante fue lavado por 30 min a 25,000 xg, a 4 °C para eliminar la hemoglobina, recuperando el sedimento de membranas eritrocíticas y los cuerpos iniciales (CI). El sedimento se diluyó 1:3 en solución salina de Puck y se sonicó<sup>(15)</sup>. Para eliminar al máximo posible la contaminación con membranas de eritrocitos en el antígeno, éste se centrifugó en un gradiente de densidad de Percoll (30 % concentración inicial) formado *in situ* a 25,000 xg por 30 min<sup>(18)</sup>. Para evitar la degradación de los extractos, la solución para lavados se suplementó con los inhibidores de proteasas fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) y EDTA a una concentración final de 1 mM. El antígeno purificado se suspendió en solución salina de Puck/gentamicina a 50 mg/ml. La concentración de proteínas se cuantificó por la técnica de Bradford (Bio-Rad, Hercules, Ca.).

#### *Inmunización*

Se formaron dos grupos de bovinos, nombrados de acuerdo al adyuvante mezclado con el antígeno, cada uno de tres animales. Los días 0, 21 y 93, los bovinos fueron inmunizados vía subcutánea con 100 µg de proteína de *A. marginale* cepa Méx-17; para los animales del grupo saponina, el antígeno se mezcló en 2 ml de saponina Quil-A (Superfos Bio-Sector a/s Dinamarca) a una concentración final de 3 mg/ml en solución salina de Puck, mientras que para el grupo IMS, la misma cantidad de antígeno se mezcló en 2 ml del adyuvante Montanide IMS 1313 (SEPPIC, Francia). El inmunógeno para la primera y segunda inmunizaciones se inactivó en glutaraldehído 1 % a 37 °C, mientras que el inmunógeno para la tercera inmunización no recibió tratamiento alguno. Para cada grupo, un animal testigo fue inoculado con un placebo del adyuvante correspondiente.

sediment was diluted 1:3 in Puck's saline solution, sonicated and processed as described<sup>(15)</sup>. In order to eliminate in as much as possible the erythrocyte membranes, the IB were centrifuged in a 30% Percoll<sup>®</sup> gradient formed *in situ* at 25,000 xg for 30 min<sup>(18)</sup>. Phenylmethanesulfonyl fluoride and EDTA both at 1 mM final concentration were added in every washing step to avoid degradation of the antigen preparation. The purified IB were suspended in Puck's saline solution supplemented with 50 g/ml gentamicin and the protein concentration was determined by the Bradford technique (Bio-Rad, Hercules, Ca.).

#### *Immunization*

For the immunization, two groups of three bovines each and named according to the adjuvant mixed with the antigen were used. The animals were subcutaneously inoculated on d 0, 21 and 93, with 100 µg of protein of Méx-17 strain of *A. marginale*. For the saponin group, the antigen was mixed in 2 ml of Quil-A saponin (Superfos Bio-Sector a/s Denmark) at 3 mg/ml final concentration in Puck's saline solution, whereas for IMS group, the same amount of antigen was mixed with 2 ml of adjuvant Montanide IMS 1313 (SEPPIC, France). The immunogen for the first and second immunizations was inactivated in 1% glutaraldehyde at 37 °C, whereas the immunogen for the third immunization was not inactivated. For each group, a control animal was inoculated with a placebo corresponding to adjuvant alone.

#### *Challenge inoculation*

Méx-30 strain used for the confrontation was thawed in a water bath at 37 °C with agitation and inoculated in two animals successively. When the rickettsia was in the logarithmic growth phase in the second animal, blood was drawn by venipuncture of the jugular vein. Immunized and control animals were challenge-inoculated intramuscularly on d 164 (23 wk) after the first immunization, with  $1 \times 10^8$  infected red blood cells.

During the immunization and challenge periods, rectal temperatures (rT) and packed cell volume (PCV) were registered, at the same time Giemsa-

### *Desafío*

La cepa Méx-30 de confrontación, se descongeló a 37 °C y se inoculó sucesivamente en dos de los animales. Cuando la rickettsia se encontraba en fase de crecimiento logarítmico en el segundo animal, se obtuvo sangre y todos los bovinos inmunizados y testigos fueron desafiados vía intramuscular con  $1 \times 10^8$  eritrocitos infectados el día 164 después de la primera inmunización.

Durante el periodo de la inmunización y posdesafío se registraron las temperaturas rectales (Tr) y el volumen celular aglomerado (VCA); paralelamente se examinaron frotis teñidos con el colorante de Giemsa para evaluar la presencia de *A. marginale* en los glóbulos rojos (GR). En casos positivos, el porcentaje de eritrocitos infectados (PEI) fue cuantificado y registrado.

### *Cinética de IgG*

Muestras de sueros colectadas semanalmente de los animales experimentales se probaron por ELISA para determinar la cinética de IgG. El ensayo indirecto de ELISA se llevó a cabo tal como se ha descrito usando un extracto de la cepa Méx-31 como fuente de antígeno<sup>(13)</sup>. Diluciones 1:200 de los sueros problema se incubaron por duplicado o triplicado a 37 °C por 60 min. La reacción final se realizó con el sustrato p-nitrofenil fosfato a 0.075 % en amortiguador de Tris pH 7.5<sup>(15)</sup>, después de la incubación con un conjugado comercial cabra anti-IgG de bovino conjugado a fosfatasa alcalina (FA). La reacción se leyó en un espectrofotómetro a 405 nm.

### *Identificación de antígenos IgG1 e IgG2 específicos*

Los mismos sueros ensayados por ELISA fueron probados por inmunoblot, para determinar el perfil de antígenos reconocidos en las tres cepas mexicanas, y para identificar antígenos IgG1 e IgG2 específicos. Extractos de las tres cepas se separaron por electroforesis en geles discontinuos de poliacrilmida-SDS a una concentración de 4 % en la fase de preseparación y 10 % en la fase de separación, usando 10 µg de proteína por carril del antígeno parcialmente purificado y 2.5 µg del antígeno purificado en Percoll. La electrotransfe-

stained thin blood smears were examined to evaluate for the presence of inclusion bodies of *A. marginale* in erythrocytes. In positive cases, the percentage of infected erythrocytes (PEI) was determined and registered.

### *IgG Kinetics*

Serum samples were collected weekly and tested by ELISA to determine the IgG kinetics. The indirect ELISA was carried out as described using Méx-31 strain as antigen source, the antigen was solubilized in 0.1% of sodium dodecyl sulfate (SDS) diluted in carbonate buffer pH 9,6<sup>(13)</sup>. Serum samples were diluted 1:200 and incubated in duplicate or triplicate wells at 37 °C for 60 min; the final reaction was made with p-nitrophenyl phosphate substrate 0.075% in Tris buffer pH 7.5 as described<sup>(15)</sup> after incubation with a commercial alkaline phosphatase goat-anti bovine IgG conjugate. The reaction was read in an automatic ELISA reader at 405 nm.

### *Identification of IgG1 and IgG2 specific antigens*

Positive ELISA serum samples were tested by western blot analysis to identify all IgG1 and IgG2 specific antigens in all three Mexican *A. marginale* strains. Antigen extracts of all three strains were separated by discontinuous electrophoresis system with a 4% stacking upper gel and a 10% running gel and 10 µg protein per lane of partially purified antigen or 2.5 µg of Percoll® purified antigen. Electrophoresis was carried out under constant voltage (110 V) conditions and electro- transference at constant current at 200 mA for 3 h<sup>(19)</sup>. The transferred membranes were incubated overnight in 5% BSA in PBS-T, pH 7.4 at 4 °C to block empty reactive sites. The membranes were probed with sera for 120 min and then with a commercial alkaline phosphatase goat-anti bovine IgG conjugate and the bands resolved with BCIP/NTB substrate (SIGMA-ALDRICH, St. Louis. MO). For detection of IgG1 and IgG2 specific antigens, the membranes were blocked and dried after three washes in 1% BSA in PBS-T (PBS-T-1%). The dry membranes were cut in strips, and probed for IgG1 and IgG2-specific antigens as described<sup>(20)</sup>; briefly: after incubation with the bovine serum, the membranes

rencia se realizó de acuerdo a lo descrito<sup>(19)</sup> a 200 mA por 3 h. Las membranas transferidas se bloquearon en una solución de albúmina sérica bovina (ASB) al 5 % en PBS-T pH 7.4 durante la noche a 4 °C, y se probaron con los sueros problemas por 120 min, y después con un anticuerpo comercial cabra anti IgG bovina-FA; las bandas se revelaron con BCIP/NTB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Para la detección de antígenos IgG1 e IgG2-específicos, las membranas ya bloqueadas se lavaron tres veces con una solución de ASB a 1 % en PBS-T (PBS-T-1 %), se secaron, se cortaron en tiras, y después de la incubación con el suero en cuestión, las membranas se incubaron a 4 °C con agitación continua durante una noche con anticuerpos monoclonales (mAb) de ratón anti-IgG1 y anti-IgG2 de bovino [Serotec Ltd., Oxford, Reino Unido] diluidos 1:100 en PBS-T-1 %<sup>(20)</sup>. Después de un lavado con PBS-T-1 % y dos lavados con una solución de ASB 1 % en Tris/Tween-20 0.05 % (T-T-1 %), las membranas fueron incubadas durante una hora con un anticuerpo comercial cabra anti-IgG de ratón-FA y las bandas reveladas por 1 a 5 min con BCIP/NTB como se describió; la reacción se detuvo lavando dos veces con agua destilada. La identificación de las MSP's ya conocidas se hizo en membranas con extractos de la cepa Mex-17 y probadas con: mAb Ana22B1, suero murino MSP-2/3, y mAb AnaF16C1 específicos para MSP-1a, MSP-2/MSP-3 y MSP-5 respectivamente y un mAb no específico (anti-tripanosoma) Tryp1E1 como control negativo. El cálculo del peso molecular de las proteínas separadas se hizo con base en los marcadores Precision Plus TM Standards-Dual Color, (Bio-Rad, Hercules, Cal).

Para obtener una mejor definición de las proteínas IgG2 específicas, extractos de la cepa Mex-17 se separaron por electroforesis en dos dimensiones. Los geles para el enfoque isoeléctrico fueron preparados en tubos capilares (3 x 70 mm) según la técnica de O'Farrel<sup>(21)</sup> con las siguientes modificaciones; urea a 9.5 M, Nonidet al 2 % v/v, acrilamida al 4 % v/v, anfólitos de rango de pH 3-10 al 2 % v/v, glicerol al 10 % v/v y 2-mercaptoetanol al 2 % v/v; persulfato de amonio y TEMED, y se polimerizaron durante 1 hora. Los CI de *A. marginale* se solubilizaron durante 2 h en

were incubated overnight at 4 °C with continuous agitation with mouse monoclonal antibodies (mAb) anti bovine IgG1 or anti-IgG2 of (Serotec, Oxford, United Kingdom) diluted 1:100 in PBS-T-1%. After a washing with PBS-T-1% and two washings with 1% BSA in Tris/0.05% Tween 20 (T-T-1%), the membranes were incubated for one hour with a commercial alkaline phosphatase-goat anti murine IgG conjugate, and the bands revealed for 1 to 5 min with BCIP/NTB substrate as described. Color reaction was stopped by washing twice with distilled water. For the identification of the known MSP's, membranes with the Mex-17 strain extracts were probed with: MSP-1 specific mAb Ana22B1, MSP-2/MSP-3 SPECIFIC MSP-2/3 murine monospecific serum, MSP-5 SPECIFIC AnaF16C1 mAb and a nonspecific mAb (anti-tripanosome) Tryp1 E1 as negative control. Calculation of the apparent molecular weight of separated proteins the Molecular Precision Plus TM Standards-Dual Color, Bio-Rad, markers were used.

For a more detailed study of the IgG2 specific proteins, extracts of the Mex-17 strain were separated by 2-D electrophoresis. Isoelectric focusing gels were prepared in 3 x 70 mm capillaries according to the O'Farrel technique<sup>(21)</sup>. Briefly, gels of the first dimension; 9.5 M urea, 2% v/v Nonidet P-40, 4%v/v acrylamide to, 2% v/v ampholytes pH range 3 to 10, 10% v/v glycerol and 2% v/v 2-mercaptoethanol; ammonium persulfate and 8 µl TEMED, were added and polymerized for 1 h. A. marginale IB were solubilized for 2 h in lysis buffer (9M urea, 4% v/v NP-40, 2% ampholytes pH 3 to 10 to, 2% v/v 2-ME) and centrifuged at 200,000 xg, 4 °C, 2 h. A volume of the supernatant equivalent to 5 µg of protein was loaded in each one of gels followed by 10 µl focusing buffer (8 M urea, 5% NP-40, 5% 2-ME). Focusing was run in a vertical apparatus (Hoefer), with 20 mm NaOH buffer in the upper chamber and a 10 mm H3PO4 buffer in the lower chamber for 16 h at 700 V and increasing to 800 V in the last hour. For the second dimension, the gels were expelled from the tubes and equilibrated for 15 min in sample buffer (0.625M Tris HCl, 10% v/v glycerol, 2% p/v SDS, 5% v/v 2-ME). The focused gels were run in the second dimension

amortiguador de lisis (urea 9M, NP-40, 4 % v/v, anfolitos pH 3-10 al 2 % v/v; 2-ME, 2 % v/v) y después se centrifugó a 20,000 xg, 4 °C, por 2 h. Un volumen del sobrenadante equivalente a 5 mg de proteína se cargó en cada uno de los geles, seguido por 10 µl de amortiguador de enfoque (urea, 8 M; NP-40, 5 %; 2-ME, 5 %). El enfoque isoléctrico se realizó en un aparato vertical, durante 16 h a 700 V y 800 V por una hora más. Para la segunda dimensión, los geles se expulsaron de los tubos y se equilibraron durante 15 min en amortiguador de muestra (Tris HCl 0.625 M, glicerol 10 % v/v, SDS 2 % p/v, 2-ME 5 % v/v). Las proteínas separadas en la primera dimensión se fraccionaron en la segunda dimensión en un gel de poliacrilamida-SDS a 10 %, la electrotransferencia a membranas PVDF y el inmunoblot para antígenos IgG e IgG2 específicos se llevó a cabo como se describió anteriormente.

#### *Linfoproliferación in vitro*

El estado inmune de los animales vacunados y control también se siguió mediante el ensayo de linfoproliferación (LP) *in vitro*; para este propósito, células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se aislaron en gradientes de densidad de Ficoll-Paque™ Plus (Amersham-Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) de acuerdo al manual del productor, y cultivados en presencia de antígenos en el medio de RPMI-1640, suplementado con L-glutamina a 2 mM, 2-ME a 50 µM, penicilina 10,000 UI, estreptomycin 50 mg/ml, bicarbonato de sodio 2 g/l, HEPES 25 mM. Las células se contaron y se determinó la viabilidad utilizando el colorante azul de tripano. CMSP a una concentración de 5 x 10<sup>5</sup>/pozo; se cultivaron en placas de 96 pozos (Corning) en un volumen final de 200 µl<sup>(20)</sup>. Los extractos del antígeno de las tres cepas se titularon entre 0.156 y 5 µg/ml, y finalmente se seleccionaron las concentraciones de 2.5 y 5 µg/ml para los estudios. Pozos controles de concanavalina (Con) A y extractos de GR no infectados fueron incluidos en la placa. Las células se incubaron durante 5 días, en una atmósfera de 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C. La proliferación celular se determinó mediante el uso de un paquete comercial (Cell proliferation Elisa system, Versión 2 Code RPN 250 Amersham-Pharmacia, Upsala, Suecia) de acuerdo a las

in a SDS-PAGE with a 10% separating gel, transferred to PVDF membranes and blotted for IgG and IgG2 specific antigens as previously described.

#### *In vitro proliferation*

The immune status of the vaccinated and control animals was also followed by means of *in vitro* proliferation on peripheral blood mononuclear cells (PBMC). PBMC from jugular blood were separated by density gradient centrifugation on Ficoll-Paque Plus® (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) according manufacturer's instructions and cultivated in the presence of antigens in RPMI-1640 media, supplemented with 2 mM L-glutamine, 50 µ M2-ME, 10,000 IU penicillin, streptomycin 50 µg/ml, 2 g/L sodium bicarbonate, 25 mM HEPES. PBMC were cultivated at 5 x 10<sup>5</sup> cells/well in a 200 µl, in 96 well plates (Corning)<sup>(20)</sup>. Extracts the three Mexican *A. marginale* strains were used at 5 and 2.5 µg/ml. Concanavalin-A and uninfected red blood cells controls wells were included in each plate. PBMC were incubated for 5 d in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C. Cellular proliferation was determined by means of a commercial Kit (Cell proliferation ELISA system, Version 2 Code RPN250, Amersham-Pharmacia) according to manufacturer instructions. The reaction was read at 450 nm and stimulation index (SI) was calculated dividing the mean of OD values of the problem wells by the OD value of blank wells. SI were considered positive if ≥ 2.0.

#### *Statistical analysis*

The results were analyzed by the Student's t for comparison of clinical data of the vaccinated groups.

## RESULTS

#### *Immunization*

inoculation of the bovines with any of the preparations did not induce detectable changes in the Rt, hematocrit or general behavior. In spite of the several immunizations, only until one week after the third immunization it was possible to detect IgG and *in vitro* proliferation in the immunized

instrucciones del productor. La reacción fue leída a 450 nm y los índices de estimulación (IE) se calcularon dividiendo el promedio de los valores de densidad óptica (DO) del contenido en los pozos con tratamiento entre el valor de DO del blanco; se consideraron positivos aquellos valores  $\geq 2.0$ .

#### Análisis estadístico

Los resultados se analizaron por la prueba de t de Student en el caso de los promedios de los datos clínicos de los grupos vacunados.

## RESULTADOS

### Inmunización

La inoculación con el inmunógeno o placebo no indujo cambios detectables de la Tr, hematocrito o comportamiento. A pesar de las varias inmunizaciones, sólo hasta la semana posterior a la tercera inmunización se pudieron detectar repuestas de IgG por Elisa y de LP *in vitro* en los bovinos inmunizados (Figura 1a y b). Ambas respuestas fueron muy semejantes ( $P > 0.05$ ) en los animales vacunados independientemente del adyuvante usado, y continuaron en ascenso hasta cinco semanas después de la tercera inmunización, cuando se suspendió temporalmente el ensayo de LP. En contraste, los testigos de cada grupo, inoculados con los placebos de saponina y de IMS, se mantuvieron negativos a ambos ensayos. Cuando se ensayó la respuesta celular o LP *in vitro* 12 semanas después de la tercera inmunización (resultados no incluidos), los IE de los bovinos inmunizados habían descendido a valores inferiores a 2.0.

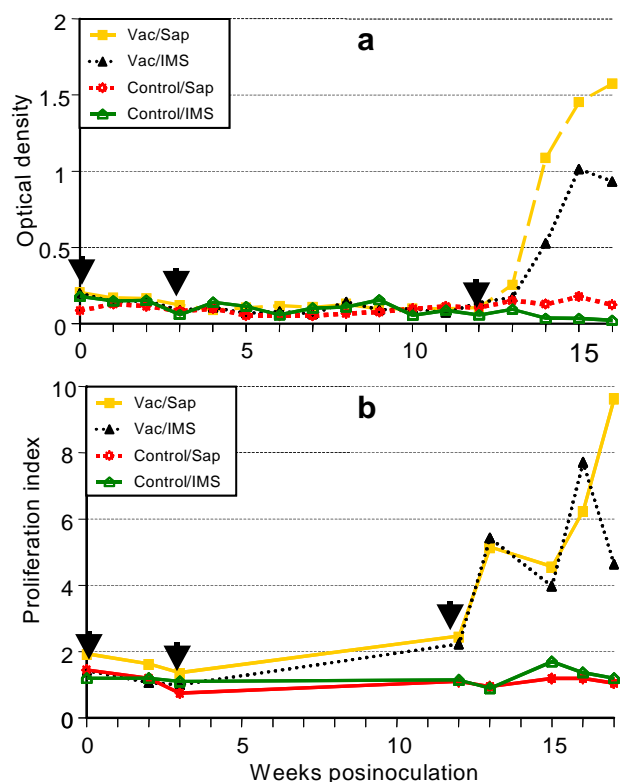
### Desafío

Tres semanas posteriores al desafío, dos animales inmunizados de cada grupo desarrollaron rickettsemias muy bajas y muy semejantes ( $P > 0.05$ ); en contraste, las pérdidas de VCA por grupo, fueron menores en los animales del grupo saponina. De los otros dos bovinos inmunizados, un animal del grupo IMS (No. 2624), desarrolló un PEI de 17.6 % acompañada con un VCA de 8 % antes de morir, y el otro bovino (No. 2417, grupo

bovinos (Figure 1). Responses for both variables were very similar ( $P > 0.05$ ) in vaccinates regardless of the adjuvant used. Likewise both responses, humoral and cellular increased up to five weeks after the third immunization when the *in vitro* LP *in vitro* assay was suspended temporarily. In contrast, both placebo-inoculated controls, remained negatives to indirect ELISA and *in vitro* LP. *In vitro* LP values 12 wk after the third immunization (results not shown), had come to baseline values ( $\geq 2.0$ ) in all the immunized bovines.

Figura 1. Cinética de las respuestas a) humoral y b) celular en bovinos inmunizados y testigos

Figure 1. Kinetics of a) humoral and b) cellular response in immunized and control animals in the pos-immunization period



↓: Arrows indicate immunization times. Vac/sap and Vac/IMS represent immunized groups with *A. marginale* (Méz-17) mixed with the adjuvants, saponin and IMS1313 respectively. Control/sap and Control/IMS represent controls inoculated with the adjuvants alone, saponin and IMS 1313 placebos respectively.



saponina) único gestante, parió durante el pico de la infección experimental, que se caracterizó por PEI de 7.5 % y VCA de 6 % (Cuadro 1) y murió 2 días después del parto.

Considerando los promedios de los grupos (Cuadro 1), el periodo de prepatencia para los dos grupos inmunizados fue de 22 días, mientras que para los testigos de los grupos saponina e IMS fue de 20 y 18 días respectivamente. Por grupo, no se observó fiebre en los animales del grupo saponina, mientras que se observó fiebre difásica típica de 40 y 40.1 °C para los bovinos del grupo IMS los días 22 y 28 pos-desafío. En el testigo del grupo IMS se observó una fiebre de 41.5 y 41.6 °C a los días 22 y 30 pos-desafío, una fiebre similar de 40.6 °C se observó en el testigo del grupo saponina al día 22 y posteriormente de 41.6 °C desde el día 26 hasta el día 28. Los dos testigos desarrollaron PEI de 30.4 % (grupo saponina) y 12.6 % (grupo IMS) con pérdidas de 83.3 y 77.1 % en el VCA

### Challenge-inoculation

Three weeks after challenge inoculation, two immunized animals of each group developed very low PIE's ( $P < 0.05$ ), nevertheless, the VCA losses in the saponin animals were lower. Out of the two immunized animals, one of the IMS group (no. 2624) developed a 17.6 % PIE and 8 % VCA just before dying whereas the other bovine (No. 2417, saponin group) appeared pregnant and calved at the onset of the infection, which was characterized by a 7.5 % PEI and a VCA of 6 % (Table 1) and died 2 d after calving.

The prepatent period for the immunized animals was 22 d, in comparison with 20 and 18 d for the saponin and IMS controls respectively (Table 1). Typical biphasic fever of 40 °C and 40.1 °C for the IMS bovines on d 22 and 28 pos-challenge inoculation yet, no fever was observed in the saponin group animals. Biphasic fever of 41.5 °C

Cuadro 1. Datos clínicos de los bovinos experimentales

Table 1. Clinical data of experimental bovines

Animal #	Max PIE <sup>a</sup>	Prepatent period <sup>b</sup>	Initial PCV <sup>c</sup>	Lowest PCV <sup>d</sup>	% PCV reduction <sup>e</sup>
Bovines immunized with <i>A. marginale</i> + saponin					
2411	2.4	24	38	16	57.8
2417 <sup>f</sup>	7.5	22	34	6	82.3
2420	2.3	20	30	16	46.6
Mean ± st dev	4.1 ± 3	22 ± 2	34 ± 4	12.7 ± 5.8	62.2 ± 18.3
2612 (Control)	30.4	20	36	6	83.3
Bovines immunized with <i>A. marginale</i> + IMS 1313					
2413	4.1	18	34	11	67.6
2419	4.5	24	34	11	67.6
2624 <sup>f</sup>	17.6	24	36	8	77.7
Mean ± st dev	8.7 ± 7.7	22 ± 3.5	34.7 ± 1.2	10 ± 1.7	71 ± 5.8
2608 (Control) <sup>f</sup>	12.6	18	35	8	77.1

a Maximum percentage infected erythrocytes (PIE) during experimental infection after challenge.

b Calculated as the time from inoculation with heterologous strain till the moment when positive by microscopy.

c PCV, packed cell volume, calculated as the average of the initial values.

d After challenge inoculation.

e Calculated by taking the lowest PCV value registered after challenge as a proportion of initial PCV.

f Calved coincident with onset of challenge and died despite receiving treatment.

respectivamente. Los animales testigos mostraron signos clínicos típicos de anaplasmosis aguda caracterizada por fiebre, anorexia y palidez y, el del grupo IMS murió a pesar de ser tratado con oxitetraciclina (20 mg/kg de peso).

La respuesta de IgG en los bovinos inmunizados también mostró un incremento notable dos semanas pos-desafío y llegó a un pico en las siguientes cuatro semanas antes de que empezara a disminuir (datos no mostrados). Los valores de densidad óptica promedio durante la cinética de IgG para los grupos, fueron similares ( $P>0.05$ ); en contraste, no hubo respuesta humoral detectable en los dos testigos durante el desafío.

A las dos semanas pos-desafío, los promedios de los IE (Cuadro 2), mostraron valores positivos de LP *in vitro* contra los antígenos de la cepa inmunizante Méx-17 y la Méx-30 de desafío en los animales inmunizados; esta respuesta fue similar para las dos cepas, aunque por lo general fue ligeramente más intensa contra la cepa Méx-17. El testigo del grupo IMS, desarrolló una respuesta de LP sólo contra la cepa Méx-17 en la tercera y cuarta semana antes de morir, mientras que para el testigo del grupo saponina la respuesta desapareció

and 41.6 °C on d 22 and 30 and 40.6 °C on d 22 and 41.6 °C from d 26 to 28 for IMS and saponin controls, respectively. Both controls developed PIE of 30.4 % (No. 2612, saponin control) and 12.6 % (No. 2608, IMS control) with VCA losses of 83.3 % and 77.1 % respectively (Table 1). The IMS control (No. 2608) died despite being treatment with oxytetracycline (20 mg/kg weight) whereas the saponin control (No. 2612) showed clinical anaplasmosis characterized by fever, anorexia and pallor but recovered.

IgG responses in the immunized bovines, also showed a remarkable increase 2 wk pos-challenge inoculation and peaked in following 4 wk before it began to decline (data non shown). Mean OD values for IgG during the experimental period for immunized groups were statistically similar ( $P>0.05$ ); in contrast, there was no detectable humoral response in any of the controls after challenge inoculation.

Two weeks pos-challenge inoculation, immunized animals showed positive SI for *in vitro* proliferation assays performed against both, the immunization Mex-17 and challenge Mex-30 strains (Table 2). Although the responses against both strains were

Cuadro 2. Índices de estimulación de linfoproliferación *in vitro*\*

Table 2. *In vitro* proliferation stimulation indices\*

	Weeks after challenge inoculation									
	2		3		4		5		7	
	M-17	M-30	M-17	M-30	M-17	M-30	M-17	M-30	M-17	M-30
Saponin group										
2411	2.7	3.3	1.6	1.3	1.3	1.2	1.3	1	1.2	1.2
2417	5.1	5.1	3.6	1.5	5.3	2.1				
2420	7.2	7.4	2.3	0.8	1.9	1.5	2.3	1.4		
2612 (Control)	3.7	5.5	2.2	1	1.3	1.4	2.4	1.2	1.1	1.1
IMS Group										
2413	1.5	1.9	4.5	3	3.3	3.1	2.1	1.6	1.3	1.3
2419	3.6	3.5	3	3.7	3.3	1.3	1.8	1.2	1.4	1.2
2624	1.8	1.4	4	3	2.6	1.1				
2608 (Control)	0.9	1	2.6	0.9	6.6	1.7				

\* Immunized bovines with an inactivated *A. marginale* Mex-17 strain and controls, challenge inoculated with Mex-30 strain

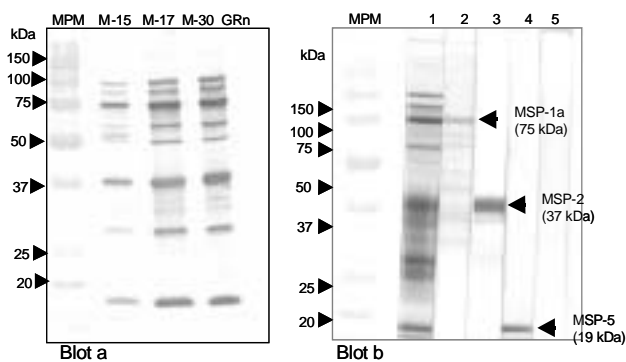
dos semanas pos-desafío, y fue ligeramente superior contra la cepa Méx-30. En todos los bovinos inmunizados la respuesta de LP bajó a niveles basales (<2.0) para la séptima semana pos-desafío.

*Perfil de antígenos IgG1 e IgG2 específicos*

El perfil comparativo de antígenos en las tres cepas mexicanas de *A. marginale* fue evaluado al inmunoblot. El análisis de las proteínas reconocidas por IgG's de los animales vacunados en los extractos de las cepas Méx-15, Méx-17 y Méx-30 mostró un gran número de proteínas con pesos moleculares que varían desde 15 hasta 209 kDa (datos no presentados). El mismo análisis de los antígenos reconocidos por IgG2 de un bovino vacunado, mostró diez bandas específicas en las cepas Méx-17 y Méx-30 (19, 28, 33, 37, 50, 56, 75, 84, 100, 170 kDa) con una proteína adicional de 52 kDa en la cepa Méx-15 (Figura 2a) que no se observó en las otras dos cepas. En el panel b de la misma figura se muestra el reconocimiento específico de MSP-1a, MSP-2 y MSP-5 usando mAb's o sueros específicos.

Figura 2. Perfil de reconocimiento al inmunoblot

Figure 2. Western Blot profile



Blot A: IgG2 specific antigens of the three Mexican *A. marginale* strains; lanes M-15, M-17 and M-30 contain the corresponding antigens, GRn and MPM contain non infected erythrocyte proteins and molecular weight markers. Blot B: Identification of the MSP-1a (lane 2), MSP-2 (lane 3) MSP-5 (lane 4). Lanes 1 and 5, were probed with an *Anaplasma* positive serum and an anti-Trypanosome monoclonal antibody as negative control.

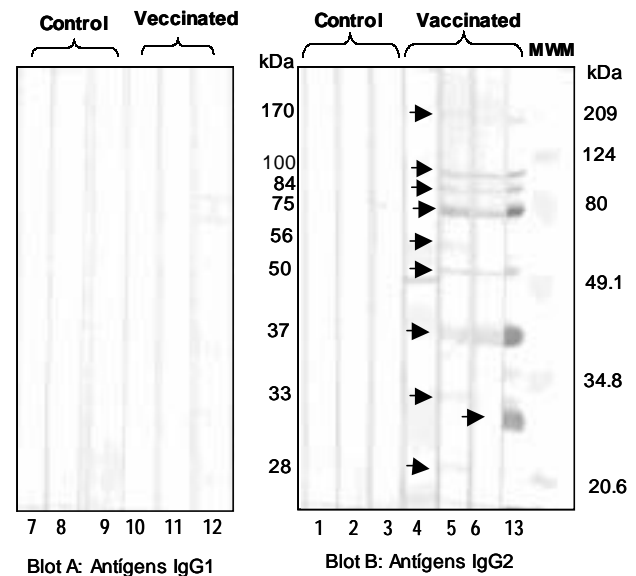
not statistically different, that to M-17 strain was slightly more intense. IMS control animal (No. 2608), responded only against the Méx-17 strain between the third and fourth week before dying (Table 2), whereas the response of the saponin control disappeared two weeks pos-challenge inoculation and was slightly higher against the Méx-30 strain. The LP responses in all the immunized bovines dropped to baseline values (<2.0) by the seventh week pos-challenge inoculation.

*IgG1 and IgG2 specific antigens*

The comparative profile of antigens in the three Mexican *A. marginale* strains was evaluated by immunoblot. The analysis of proteins recognized by the vaccinates IgG's in the extracts of the Méx-15,

Figura 3. Perfiles de antígenos IgG1 e IgG2 específicos en la cepa Méx-17 de *A. marginale*

Figure 3. Western blot analysis of IgG1 and IgG2 specific antigens in *A. marginale* Méx-17 strain

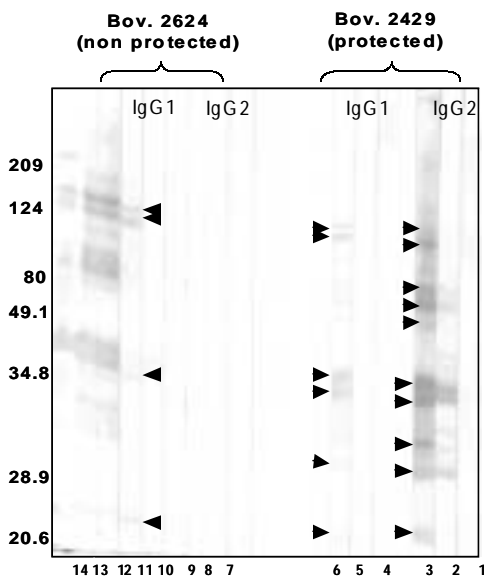


Lanes 1 and 7 were probed with pre-immunization serum, lanes 2 and 8 with pos-immunization serum and lanes 3 and 9 with pos-challenge serum of bovine 2612; whereas lanes 4 and 10 were probed with serum pre-immunization, 5 and 11 with serum pos-immunization and 6 and 12 with serum pos-challenge of bovine 2420. Lane 13 was probed for total IgG's.

El análisis individual de los sueros de los animales vacunados y testigos en inmunoblot contra un extracto de la cepa Mex-17, mostró una respuesta predominantemente de IgG2 en los vacunados, coincidente con las proteínas observadas en la Figura 2a, mientras que el patrón de reconocimiento por los animales testigos fue nulo con cualquiera de las inmunoglobulinas ensayadas (Figura 3). El análisis comparativo de IgG1 e IgG2 de un animal vacunado protegido y uno vacunado pero no protegido contra el desafío (Figura 4) muestra claramente que el suero del animal 2419 que resistió el desafío, correspondiente con lo observado en la Figura 3, es predominantemente de IgG2 y mínimo reconocimiento por IgG1, mientras que el perfil del animal 2624, vacunado y que murió al desafío presenta un perfil inverso donde predomina la IgG1.

Figura 4. Perfil de antígenos IgG1 e IgG2 específicos en la cepa Méx-17

Figure 4. IgG1 and IgG2 antigen profile in Mex-17 strain



Lanes 1, 4, 7, and 10 were probed with pre-immunization serum; lanes 2, 5, 8 and 11 with serums pos-immunization and 3, 6, 9, and 12 with serum pos-challenge. After incubation with corresponding sera lanes 1, 2, 3, 7, 8 and 9 were probed with mouse anti-bovine antibody IgG2 and lanes 4, 5, 6, 10, 11, and 12 with mouse anti-bovine IgG1 and reacted with a commercial alkaline phosphatase- antimouse IgG and NBT substrate.

Méx-17 and Méx-30 strains showed a large number of proteins with molecular weights ranging from 15 to 209 kDa (data not shown). Immunoblot analysis for IgG2-specific proteins using animal 2420 serum, showed ten specific IgG2 proteins in the Méx-17 and Méx-30 strains extracts (19, 28, 33, 37, 50, 56, 75, 84, 100, 170 kDa) with an additional 52 kDa antigen in the Méx-15 strain (Figure 2a) that was not observed in the other two strains. Panel b of the same figure shows the specific recognition of MSP-1, MSP-2 and MSP-5 by mAb's or specific sera.

Individual analysis at the immunoblot against Mex-17 antigen extract showed a predominant IgG2 response in vaccinates (Figure 2a), whereas there was no recognition of proteins by either IgG1 or IgG2 by the controls (Figure 3). The comparative analysis of IgG1 and IgG2 of animal 2419, which was vaccinated and resisted the challenge (Figure 4) shows a number of IgG2-specific bands which coincide with those observed in Figure 3 and minimum recognition by IgG1, in contrast, animal 2624 sera, whereas the profile of animal 2624, which died despite vaccination shows an inverse profile where IgG1 recognition predominates.

The 2-D profile of Percoll®-purified antigens of *A. marginale* (Méx-17) showed eight of the ten IgG2 specific antigens (19 kDa, 28 kDa, 33 kDa, two 37 kDa proteins, 50 kDa, 75 kDa, 84 kDa) previously observed in 1-D western blot (Figure 5). In this figure two 37 kDa IgG2 specific proteins of same molecular weight but different pI were observed. Based on the observed proteins in Figure 2b and what has been reported in the literature MSP's are marked in Figure 5 and we present the proteins 28 kDa, 33 kDa, 37 kDa 50 kDa, 56 kDa and 170 kDa as new IgG2 specific antigens. Although the sera of all vaccinated and protected animals recognized the same IgG2 specific proteins (Figure 4), a slight difference of intensity in the recognition by the different animals was observed. Nevertheless none of the IgG2 specific proteins were recognized by sera of the controls or of immunized and not protected bovine No. 2624 (Figures 3,4). In

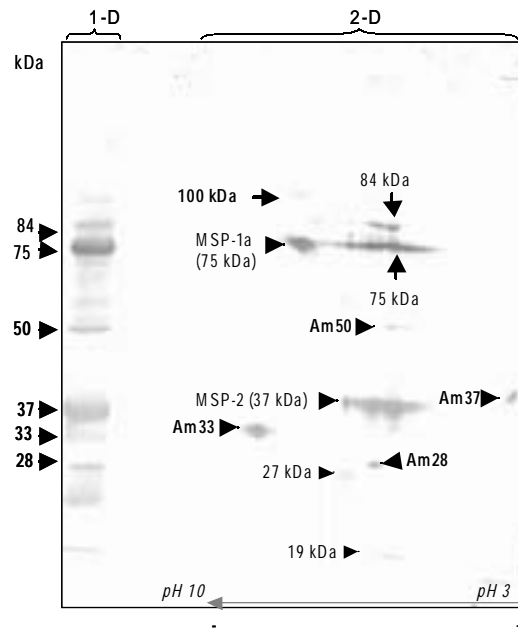
El perfil de antígenos de los CI de *A. marginale* (Méx-17) purificado por gradientes de densidad en Percoll® y separados en dos dimensiones mostró ocho de los diez antígenos IgG2 específicos (19, 28, 33, dos proteínas de 37, 50, 75, 84 kDa) anteriormente demostradas en inmunoblot de 1-D (Figura 5). En esta figura también se muestra una segunda proteína IgG2-específica de 37 kDa, que co-migra con otra proteína del mismo peso molecular pero diferente punto isoeléctrico. Con base en lo observado en la Figura 2b y en lo mencionado en la literatura, se presentan como antígenos nuevos las proteínas de 28, 33, 37, 50, 56 y 170 kDa. Aún cuando el perfil de reconocimiento por sueros de los animales vacunados y protegidos fue el mismo para la proteínas IgG2 específicas, se observó una ligera diferencia de intensidad en el reconocimiento por los diferentes animales. Sin embargo ninguna de las proteínas IgG2 específicas fueron reconocidas por sueros de los testigos ni del bovino No. 2624 inmunizado y no protegido.

## DISCUSIÓN

Células y anticuerpos de animales inmunizados y protegidos contra *marginale* se usaron para la identificación de antígenos asociados a la protección contra esta rickettsia. La inmunización con cuerpos iniciales de una cepa, mezclados con cualquiera de los adyuvantes, indujo protección al desafío heterólogo; estas observaciones coinciden con resultados ya publicados, donde al desafío heterólogo se ha podido proteger en grado variable, dependiendo de las condiciones del experimento<sup>(2,22)</sup>. La variación en el grado de protección también se ha observado por nuestro propio grupo y por otros<sup>(15,22)</sup>. Una posible explicación, al menos en el presente experimento, se puede atribuir al uso de la saponina como adyuvante, que ya se ha usado previamente para inmunógenos de *A. marginale* y para los que se mencionan respuestas adecuadas<sup>(2,6,18)</sup>, mientras que no existe información sobre el uso de IMS como adyuvante para este tipo de inmunógenos. Más aún, en un trabajo comparativo con la proteína recombinante Bm 86<sup>(23)</sup>, de la garrapata *B. microplus*, mezclada con saponina o IMS 888, se indican niveles más altos de IgG2 en los animales

Figura 5. Perfil de proteínas IgG2-específicas en dos dimensiones de la cepa Méx-17 de *A. marginale*

Figure 5. 2-D Western blot analysis IgG2 specific proteins in *A. marginale* (Méx-17)



The proteins were fractionated in a of 3-10 pH gradient in a 10% poliacrilamida-urea gel. 1-D separation of the same antigen was included (Lane 1-D) along with separation in the second dimension.

addition, the analysis of pos-immunization and pos-challenge sera showed that this animal (2624) did not develop any IgG2 response.

## DISCUSSION

Cells and antibody from immunized and protected animals against *Anaplasma marginale* were used for the identification of antigens associated to protection against this rickettsia. In agreement with published results where protection in variable degrees was achieved depending on particular conditions of the experiments<sup>(2,22)</sup> immunization with initial bodies mixed with either adjuvant induced protection against heterologous challenge. Variation in the degree of protection (Table 1) has been observed by our group and others<sup>(15,22)</sup>. A possible explanation, at least in our experiment

vacunados con la proteína asociada a la saponina. Esto se puede explicar también considerando que la saponina forma micelios, que son estructuras parecidas a los liposomas que semejan la estructura de la membrana celular<sup>(24)</sup>, en la cual las proteínas de *A. marginale* quedan atrapadas, y podrían estimular una mejor respuesta que las nanopartículas formadas por el tipo de adyuvantes oleosos como el IMS<sup>(25,26,27)</sup>. Más aún, se ha mencionado protección parcial contra desafíos heterólogos de *A. marginale* en desafíos en campo<sup>(22,28)</sup>, por lo que los datos obtenidos en este estudio, a pesar del reducido número de animales, refleja lo que se hubiera esperado con un número mayor de animales (Rodríguez *et al.*, en proceso de publicación).

Se ha postulado que la inducción de una respuesta de tipo Th1, caracterizada por la estimulación de células CD4<sup>+</sup>, con producción de IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  y la producción de IgG2 es necesaria para la protección contra *A. marginale*<sup>(6,18,20)</sup>. En el presente experimento se observó que a pesar de la producción de IgG e índices de estimulación importantes en todos los bovinos vacunados, uno de ellos murió al desafío. El inmunoblot con los sueros de este animal en los periodos correspondientes mostró ausencia de IgG2 pero presencia de IgG1, que indica una respuesta Th2. En contraste, se observa que los animales 2420 o 2419 y los otros en los que no se presentaron signos clínicos, presentan una clara respuesta de IgG2 y mínima presencia de IgG1, observación que está de acuerdo con lo que se ha publicado<sup>(20)</sup> sobre la asociación de IgG2 y la protección en bovinos inmunizados con membranas de cuerpos iniciales o MSP's de *A. marginale*. El análisis al inmunoblot de los sueros de los diferentes bovinos inmunizados mostró una ligera variación en el reconocimiento de los diferentes antígenos IgG2 específicos pero en todos los casos hubo una asociación del reconocimiento de antígenos IgG2 específicos, y protección contra el desafío. Considerando que el estudio se realizó con bovinos de más de 18 meses de edad, en contraste con los realizados por otros investigadores<sup>(6,10,20)</sup>, los resultados dan más peso aún, al papel que juega la IgG2 en la protección. Estos resultados fortalecen la credibilidad del uso de la especificidad de IgG2

could be attributable to the use of saponin as adjuvant which has already been used in *A. marginale* immunogens with adequate protection<sup>(2,6,18)</sup>, whereas information does not exist on the use of IMS as adjuvant for this type of immunogens. In immunizing studies with the recombinant protein Bm 86<sup>(23)</sup>, as vaccine against the cattle tick *Boophilus microplus*, saponin is reported as a better adjuvant in inducing an IgG2 response in comparison with IMS 888. This can be explained considering that saponin formulations forms micelles which resemble the structure of the cellular membrane<sup>(24)</sup> in which the proteins of *A. marginale* are trapped and stimulate a better response than nanoparticles formed with oil-based adjuvant like IMS<sup>(25,26,27)</sup>. Furthermore, the use of this adjuvant with IB induced substantial protection against heterologous challenge under field conditions<sup>(22,28)</sup>, therefore, the data presented in this report. Despite the small number of animals does reflect what is expected with a larger number of vaccinates (Rodríguez *et al.*, unpublished).

The induction of Th1 type immune response characterized by the stimulation of CD4<sup>+</sup> cells, with production of IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  and the production of IgG2 has been proposed essential for the protection against *A. marginale*<sup>(6,18,20)</sup>. In the present experiment, despite the presence of IgG and LP stimulation indexes one vaccinate (No. 2624) died at challenge (Figure 1). Immunoblot analysis of this animal serum in the corresponding periods showed an absence of IgG2 in the presence of an adequate IgG1 response, indicating a Th2 immune response. In contrast, animals 2420 (Figure 3) or 2419 (Figure 4) and others which showed no clinical signs presented a patent IgG2 response in the absence or negligible levels of IgG1. This observation is in agreement with the proposed model of protection associated with IgG2 in bovinos immunized with *A. marginale* initial bodies or their membranes<sup>(20)</sup>. The immunoblot analysis of the different immunized bovinos showed a slight variation in intensity in the recognition of the different IgG2 specific antigens (data not included) but in all cases there was a strong association of protection against challenge with those IgG2 specific antigens. The use of bovinos 18 mo or older in contrast to younger calves<sup>(6,10,20)</sup> gives more weight

como un marcador para identificar antígenos relevantes a la protección.

Una observación un poco confusa en este experimento, fue la intensa respuesta de LP que los testigos desarrollaron al desafío, sin embargo hay que notar también que ésta tardó en desarrollarse de tres a cuatro semanas, junto con la respuesta de anticuerpos que corrió paralela, pero que fue de poca intensidad, lo que no aminoró en ningún caso la presentación de signos clínicos y terminó con la muerte de un animal. Esta observación se puede explicar desde el contexto de la cepa de confrontación que es altamente virulenta<sup>(14,29)</sup>; es posible que la estimulación observada en los linfocitos, fue sobrepasada por la virulencia del agente, lo que implica que la adecuada estimulación del sistema inmune tanto en tiempo<sup>(30)</sup> como la presentación de los antígenos relevantes, es importante en el proceso de prevención de la enfermedad.

El análisis al inmunoblot de los sueros de animales vacunados y protegidos mostró 11 antígenos, de los cuales consideramos que siete son proteínas nuevas, nunca antes mencionados por su especificidad de IgG2 (28, 33, 37, 50, 52, 56 y 170 kDa) y otras tres, de acuerdo a los anticuerpos monoclonales usados para su identificación son MSP-1a, MSP-2 y MSP-5 de 75, 37 y 19 kDa respectivamente<sup>(3)</sup>, y por los pesos moleculares los antígenos de 84 y 75 kDa corresponden a MSP-1b y MSP-3 respectivamente<sup>(10,31)</sup>; esta última que comparte el mismo peso molecular con MSP1a, se resolvió sólo cuando el extracto de Mex-17 se sometió a separación en geles de dos dimensiones, donde se observó como una serie de isotipos con el mismo peso molecular y puntos isoeléctricos contiguos<sup>(31,32)</sup>.

La presencia de IgG2 específicas para las MSP's ya conocidas no es sorprendente, ya que se sabe que algunas de estas proteínas contienen epitopos IgG2. Así por ejemplo, la combinación de MSP-1a y MSP-1b inducen protección parcial al desafío heterólogo de terneros<sup>(10)</sup>. La MSP-2, codificada por una familia multigénica, se expresa como variantes con un solo peso molecular (33 a 36 kDa, dependiendo del aislado), pero con diferentes

to the role IgG2 in protection. Our results are thus, in agreement with the protection model against anaplasmosis with production of IgG2 consistent with the production of IFN- $\gamma$  by cells CD4<sup>+</sup><sup>(6)</sup>. These results strengthen the thesis that IgG2 can be used as marker for antigens associated with protection. These antigens in turn can be considered vaccine candidates.

The fact PBMC of control animals proliferated in the presence specific antigen seems confusing at first, yet this response was only observed after three to four weeks and was parallel to the antibody response (Table 2) which was of low intensity and did not diminish the onset of clinical signs and ended with the death of one animal, This observation can be explained in the context of a very virulent strain<sup>(14,29)</sup> which surpassed the immune response of the controls, which may imply that timely stimulation with the precise antigens<sup>(30)</sup> is important in the prevention of disease.

Inmunoblot analysis of vaccinated and protected animal showed the presence of at least eleven IgG2 specific antigens. We believe that seven of these proteins (28, 33, 37, 50, 52, 56 and 170 kDa) have not been previously reported for their IgG2 specificity; three other antigens with molecular weights of 75, 37 and 19 kDa respectively, correspond to MSP-1a, MSP-2 and MSP-5, according to the reported molecular weights and the monoclonal antibodies used for their identification<sup>(3)</sup>. Other two IgG2 specific proteins (75 and 84 of kDa) were observed in this analysis, correspond to MSP-1b and MSP-3 respectively<sup>(10,31)</sup>, this last one with the same MSP-1a molecular weight, was resolved only when Mex-17 extract was separated in 2-D gels and was observed as a series of isotypes with the same molecular weight and different iso-electric points<sup>(31,32)</sup>.

The specific role that each MSP'S observed protein in the present report is yet to be defined. Nevertheless, immunization with a combination of MSP-1a to and MSP-1b in young calves induces partial protection to heterologous challenge<sup>(10)</sup> MSP-2, coded for by multigenic family is expressed as variants with same molecular weight (33 to 36 kDa) and variable Isoelectric points<sup>(32)</sup> also include

puntos isoelectricos<sup>(32)</sup>, también incluye epitops IgG2 en la fracción no variable de la proteína e induce un grado parcial de protección<sup>(6,21,33)</sup>. En nuestro trabajo, la MSP-2 migró con peso molecular de 37 kDa con variantes de pI, pero también se demostró una segunda proteína con el mismo peso molecular, pero con pI distinto más ácido y distante de la MSP-2, por lo que se concluye que esta segunda proteína no se había mencionado antes, y se nombra Am37 de aquí en adelante.

El papel específico que cada proteína IgG2-específica, identificada en el presente reporte todavía no se conoce, sin embargo y con base en el modelo de protección, se puede hipotetizar que jugaron un papel importante en la protección de los bovinos inmunizados y desafiados con una cepa heteróloga de este y otros estudios. Esta hipótesis se fortalece con el reciente reporte<sup>(34)</sup> acerca de la protección de bovinos inmunizados con proteínas no mencionadas previamente, derivadas de una cepa australiana, cuyos PM coinciden con algunas de las que mencionamos nosotros. Aunque algunas de las publicadas<sup>(34)</sup> como la de 29 kDa, o la de 32 kDa difieren con valores mínimos en su PM con las encontradas en este estudio; estas diferencias se podrían resolver con la caracterización más fina, como el uso de espectroscopia de masas; alternativamente se puede deber a que la cepa australiana de *A. marginale* pueda tener pequeñas diferencias en la secuencia de aminoácidos de estas proteínas.

## CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Un total de doce proteínas IgG2 específicas se identifican en este estudio, lo que implica la presencia de por lo menos siete antígenos IgG2 específicos previamente no mencionados, y se nombran de aquí en adelante; Am28, Am33, Am37, Am50, Am52, Am56 y Am170. Se concluye que los nuevos antígenos identificados en este estudio juegan un papel importante en la protección de bovinos inmunizados con extractos crudos de cuerpos iniciales de la rickettsia y que cada una de ellas deberá ser estudiada en forma individual en cuanto a sus propiedades inmunoprotectoras. También deberán estudiarse las similitudes o

IgG2 epitopes in the conserved domain and induces a degree of protection<sup>(6,21,33)</sup>. In our work, MSP-2 migrated with as a 37 kDa protein with multiple pI variants yet, another protein with same mw but very distant and acidic pI was observed (Figure 5). We thus conclude this second 37 kDa protein with a different distribution profile is a new protein different from MSP-2 and is named Am37 from now on.

Based on the accepted model for protection against bovine anaplasmosis, we propose that all the IgG2 specific antigens reported in the present study played an important role in the protection of the bovines immunized and challenged with a heterologous strain of this and other studies. This hypothesis is strengthened by a recent report<sup>(34)</sup> of protection of bovines with previously non-reported proteins with mw similar to some of those reported in this study. Although some of these proteins<sup>(34)</sup> like the 29 kDa and 32 kDa show minor differences in mw with the ones reported here, these differences will be solved with the fine characterization of each one; yet the possibility there exists that indeed they are different proteins altogether.

## CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

A total of twelve IgG2 specific proteins were identified in this study which implies the presence of at least seven IgG2 specific antigens not reported previously and are named; Am28, Am33, Am37, Am50, Am52, Am56 and Am170 from now on. We conclude that the new antigens identified in this study have an additional role in the protection of the immunized bovines and are being studied with regards to their precise immunoprotective properties. These proteins and their sequences should also be studied to differentiate among the known Mexican strains and how they can be used effectively in the immunization of susceptible animals and animals where the rickettsia is endemic.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by CONACYT (a Mexican government agency), under grant



diferencias que existen entre las secuencias de estas proteínas dentro de cada aislado conocido para México, y cómo se pueden usar en forma efectiva en la inmunización de animales susceptibles y animales en zonas endémicas a la rickettsia, estudios que ya están en progreso en nuestro laboratorio.

No.30416B, while the Secretaría de Relaciones Exteriores (Foreign Affairs Ministry) of Mexico and The National University of Mexico through the School of Veterinary Medicine provided fellowships for Dr. Robert Barigye.

*End of english version*

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el CONACYT, en el proyecto No 30416B, mientras que la Secretaria de Relaciones Exteriores de México y la Universidad Nacional Autónoma de México otorgaron becas a Robert Barigye. Se agradece la amable donación de los anticuerpos monoclonales al Dr. Guy Palmer de la Universidad estatal de Washington, Pullman; y al Dr. Philippe de la Fair de SEPPIC, Paris, por la donación de adyuvantes.

## LITERATURA CITADA

- Potgieter FT, Van Rensburg. The persistence of colostral antibodies and the incidence of *in utero* transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. *Ondestepoort J Vet Res* 1987;54:557-560.
- Montenegro-James S, James MA, Toro Benitez, M, Leon E, Back BK, Guillen AT. Efficacy of purified *Anaplasma marginale* initial bodies as a vaccine against anaplasmosis. *Parasitol Res* 1991;77:93-101.
- Palmer GH. *Anaplasma* vaccines. In: Wright IG editor. *Veterinary protozoan and hemoparasite vaccines*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1989:1-29.
- Tebele N, McGuire TC, Palmer GH. Induction of protective immunity using *Anaplasma marginale* initial bodies membranes. *Infect Immun* 1991;59:3199-3204.
- McGuire TC, Musoke AJ, Kurti T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2 interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. *Immunology* 1979;38:249-256.
- Brown WC, Zhu D, Shkap V, McGuire TC, Blouin EF, Kocan KM, Palmer GH. The repertoire of *Anaplasma marginale* antigens recognized by CD4+ clones from protectively immunized cattle is diverse and includes major surface protein 2 (MSP-2) and MSP-3. *Infect Immun* 1998;66:5414-5422.
- Estes DM, Closer NM, Allen GK. IFN- $\gamma$  stimulates IgG2 production from bovine B-cells co-stimulated with anti- $\mu$  and mitogen. *Cell Immunol* 1994;154:287-295.
- Adler H, Peterhans E, Nicolet J, Jungi TW. Inducible L-arginine-dependent nitric oxide synthetase activity in bone marrow-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;198:510-515.
- Stich RW, Shoda LKM, Dreeves M, Adler B, Jungi TW, Brown WC. Stimulation of nitric oxide production by *Babesia bovis*. *Infect Immun* 1998;66:4130-4136.
- Palmer GH, Barbet AF, Cantor GH, McGuire TC. Immunization of cattle with the MSP-1 surface protein complex induces protection against a structurally variant *Anaplasma marginale* isolate. *Infect Immun* 1989;57:3666-3669.
- Jones EW, Kliever IO, Norman BB, Brock WE. *Anaplasma marginale* infection in young and aged cattle. *Am J Vet Res* 1968;29:535-544.
- Patarroyo JHS, Henckel DJ, Prates AA, Mafra CL. Antigenic profile of a pure isolate of *Anaplasma marginale* of Brazilian origin, using a Western blot technique. *Vet Parasitol* 1994;52:129-137.
- Rodríguez CSD, García OMA, Cantó AGJ, Hernández SG, Santos CN, Aboytes TR. Ensayo de una vacuna experimental inactivada contra *Anaplasma marginale* Téc Pecú Méx 1999;37(1):1-12.
- García OMA, Ángeles OLE, Hernández SG, García TD, Aboytes TR, Rodríguez CSD. Caracterización de la virulencia de un aislado mexicano de *Anaplasma marginale*. *Téc Pecú Méx*. 1998;36(3):197-202.
- Rodríguez SD, García-OMA, Hernández SG, Santos CN, Cantó AGJ. *Anaplasma marginale* inactivated vaccine: dose titration against a homologous challenge. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2000;23:239-252.
- De la Fuente J, Van den Bussche RA, García-García JC, Rodríguez SD, García MA, Guglielmone AA, *et al*. Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. *Vet Microbiol* 2002;88:275-285.
- Puck TT, Cieciora SJ, Robinson A. Genetics of somatic mammalian cells III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* 1958;108:945-955.
- Gale KL, Gartside MG, Dimmock CM, Zakrzewski H, Leatch. Peripheral blood lymphocyte responses in cattle infected with or vaccinated against *Anaplasma marginale*. *Parasitol Res* 1996;82:551-562.
- Towbin H, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 1979;76:4350-4.
- Brown WC, Shkap V, Zhu D, McGuire TC, Tuo W, McElwain TF, Palmer GH. CD4+ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infect Immun* 1998;66:5406-5413.

21. O'Farrel PH. High resolution of two dimensional electroforesis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250:4007.
22. Kuttler KL, Zaugg JL, Johnson LW. Serologic and clinical responses of pre-immunized, vaccinated and previously infected cattle to challenge exposure by two different *Anaplasma marginale*. *Am J Vet Res* 1984;45:2223-2226.
23. Rodríguez-Valle M, Montero C, Machado H, Juglar M. The evaluation of yeast derivatives as adjuvants for the immune response to the Bm86 antigen in cattle. *BMC Biotech* 2001;1:2.
24. Kersten GF, Spiekstra A, Beuvery EC, Crommelin DJ. On the structure of immune-stimulating saponin-lipid complexes (ISCOMS). *Biochim Biophys Acta* 1991;1062(2):165-71.
25. Morvat GM. A comparison of adjuvant effects of saponin and oil emulsion in foot and mouth vaccines for cattle. *Bull Off Int Epizootiol* 1974;81:1319-1324.
26. McColm AA, Bomford R, Dalton L. A comparison of saponin with other adjuvants for the potentiation of protective immunity by a killed *Plasmodium yoelli* vaccine in the mouse. *Parasite Immunol* 1982;4:337-347.
27. Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine* 2001;19(17-19):2666-2672.
28. Kreir JP, Ristic M. Anaplasmosis. XI. Immunoserologic characteristics of the parasites present in the blood of calves infected with the Oregon strain of *Anaplasma marginale*. *Am J Vet Res* 1963;24:688-696.
29. Figueroa MJV, Cantó AGJ, Ramos AJA, Rojas REE, Santiago VC, Granjeno CG, García OMA, Parrodi F. Evaluación en condiciones de campo de la vacuna inactivada de *Anaplasma marginale* denominada Plazvax. *Vet Méx* 1999;30(3):221-225.
30. Carson CA, Sells DM, Ristic M. Cell-mediated immunity in bovine anaplasmosis and correlation with protection induced by vaccination. *Vet Parasitol* 1976;2:75-81.
31. Allred DR, Barbet AF. Molecular basis for surface antigen polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale* Proc Natl Acad Sci, USA 1990;87:3220-3224.
32. Oberle SM, Palmer GH, Barbet AF, McGuire TC. Molecular size variations in an immunoprotective protein complex among isolates of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 1988;56:1567-73.
33. Palmer GH, Oberle AM, Barbet AF, Goff WL, Davis WC, McGuire TC. Immunization of cattle with a 36 kilodalton surface protein induces protection against homologous and heterologous *Anaplasma marginale* challenge. *Infect Immun* 1988;56:1526-1531.
34. Riding G, Hope M, Waltisbuhl D, Willadsen P. Identification of novel protective antigens from *Anaplasma marginale*. *Vaccine* 2003;21:1874-1883.