

+

Estudio de la respuesta inmune humoral y celular en la infección y reinfección experimental de bovinos con *Anaplasma marginale*

Study of the humoral and cellular immune response in the experimental infection and reinfection of bovines with *Anaplasma marginale*

Carlos Ramón Bautista Garfias*
Gustavo Pedraza Alva**
Yvonne Rosenstein Azoulay**
Javier Ontiveros Fernández***

Abstract

The variations of peripheral blood T CD2+, CD4+, and CD8+ lymphocytes, IgG anti-*Anaplasma* antibodies (Abs) and interferon gamma (IFN- γ) in sera and complete blood culture (CBC) from bovines experimentally infected or not with the same *Anaplasma marginale* isolate were evaluated. Seven 12 to 14 month old bovines were used. Four (Group I) were inoculated intravenously with 1×10^8 parasitized erythrocytes (PE)/ animal, which contained the *A. marginale* Morelos isolate, at day 0, and with 2×10^8 PE, at day 60; while the other three (Group C) were not infected. Peripheral blood samples and sera were collected from all animals to evaluate packed cell volume (PCV), percentage of parasitized erythrocytes (PEP), T CD2+, CD4+ and CD8+ lymphocytes by cytofluorometry as well as Abs and IFN- γ by ELISA. In Group I, the maximum average PEP was 5.2% at day 31 postinfection (p.i.), while the PCV reached an average of 6% at day 46 p.i. Following reinfection (r.i.), the PEP was 0 and the PCV was normal. The values of CD2+ were similar in both groups during the study; however the CD4+ and CD8+ values in Group I dropped significantly ($P < 0.05$) at day 45 p.i., later reaching similar values to those of Group C. A significant increase ($P < 0.05$) in fluorescence intensity (FI) in CD2+ and CD8+ lymphocytes from Group I r.i. (days 62 and 83), with respect to the FI obtained in lymphocytes from Group C, was observed. Abs levels in infected bovines increased above the basal values and those of the control animals, beginning at day 51 p.i. Similarly, IFN- γ levels in sera and CBC supernatant from infected bovines were significantly higher ($P < 0.05$), particularly after reinfection, than those from the non-infected animals.

Key words: BOVINE PERIPHERAL BLOOD T CD2+, CD4+, CD8+ LYMPHOCYTES, ANAPLASMAMARGINALE, IgG ANTIBODIES, INTERFERON GAMMA.

Resumen

Se determinaron las fluctuaciones de linfocitos T CD2+, CD4+ y CD8+, anticuerpos IgG anti-*Anaplasma* (Acs) e interferon gamma (IFN- γ) en el suero y en cultivo de sangre completa (CSC) de bovinos infectados con el

Recibido el 2 de diciembre de 2002 y aceptado el 8 de abril de 2003.

* Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, km 15.5, Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla, Jiutepec, 62550, Morelos, México.

** Laboratorio de Inmunología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.

*** Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, km 15.5, Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla, Jiutepec, 62550, Morelos, México.

mismo aislado de *Anaplasma marginale*. Se utilizaron siete bovinos de 12 a 14 meses de edad. El día 0 fueron inoculados cuatro de ellos (grupo I) por vía intravenosa con 1×10^8 eritrocitos parasitados (EP), con el aislado Morelos de *A. marginale*/animal, y con 2×10^8 EP el día 60; mientras que los otros tres bovinos (grupo T) no fueron infectados. Se colectaron muestras de sangre periférica y suero de todos los animales, para evaluar el volumen celular aglomerado (VCA), porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP), linfocitos T CD2+, CD4+ y CD8+ por citofluorometría y Acs e IFN- γ por ELISA. En el grupo I, el PEP alcanzó un promedio máximo de 5.2% el día 31 posinfección (pi), mientras que el VCA disminuyó hasta un promedio de 6% el día 46 pi. En la reinfección (ri), el PEP fue de 0 y el VCA fue normal. Los valores de CD2+ fueron similares en los dos grupos durante el estudio; en cambio, los de CD4+ y CD8+ en el grupo I disminuyeron significativamente ($P < 0.05$) en el día 45 pi, para después alcanzar valores similares a los del grupo T. Se observó un aumento ($P < 0.05$) de la intensidad de fluorescencia (IF) en los linfocitos CD2+ y CD8+ del grupo I después de la ri (días 62 y 83) con respecto a la IF determinada en los linfocitos del grupo T. Los niveles de Acs de los bovinos infectados aumentaron por encima de los valores basales y de los de los animales testigo, a partir del día 51 pi. Asimismo, los niveles de IFN- γ , tanto en el suero como en el sobrenadante de CSC de los bovinos infectados, fueron significativamente más altos ($P < 0.05$) que los de los animales no infectados, particularmente en la ri.

Palabras clave: LINFOCITOS CD2+, CD4+ Y CD8+ DESANGRE PERIFÉRICA DE BOVINO, ANAPLASMA MARGINALE, ANTICUERPOS IgG, INTERFERON GAMMA.

Introduction

Bovine anaplasmosis, a disease characterized by severe anemia, abortion and high mortality, is caused by the intraerythrocytic rickettsia *Anaplasma marginale* that is biologically transmitted by ticks of the Ixodidae family and mechanically transmitted by hematophagous diptera of the Tabanidae family.¹ Although *A. marginale* infection generates a humoral immune response,^{2,3} the transfer of antibodies from sera or colostrum to susceptible animals does not confer protection.³⁻⁵ Animals infected for the first time with virulent *A. marginale* strains develop a strong cellular immune response that corresponds to the development of clinical signs. Once the animal recovers from the acute infection phase it holds a solid cellular immune response and remains clinically protected and immune against reinfection, although the animal frequently becomes a subclinically infected carrier.⁶ Crude antigens from the rickettsia have been used to evaluate the cellular immune response in cattle.⁷⁻⁹

The protective role of the cellular immune response has been demonstrated in other intracellular infections such as those produced by *Cowdria ruminantium*,¹⁰⁻¹² *Rickettsia tsutsugamushi*,^{13,14} *Ehrlichia risticii*,^{15,16} *Theileria parva*,¹⁷ *Plasmodium* spp¹⁸ and other parasitic protozoa.¹⁹ Not only are the macrophages important in the protection against intracellular pathogens²⁰⁻²² but NK cells and T helper lymphocytes (Th) are too. The latter are so important that the use of Th1 lymphocyte clones has been proposed to help identify and characterize protective antigens and immune responses.^{23,24}

Introducción

La anaplasmosis bovina, enfermedad caracterizada por anemia severa, abortos y alta mortalidad, es causada por la rickettsia intraeritrocítica *Anaplasma marginale* que es transmitida biológicamente por garrapatas de la familia Ixodidae y mecánicamente por dípteros hematófagos de la familia Tabanidae.¹ Aunque la infección por *A. marginale* genera una respuesta inmune humoral,^{2,3} la transferencia de anticuerpos del suero o del calostro a animales susceptibles no confiere protección.^{3,5} Los animales que se infectan por primera vez con cepas virulentas de *A. marginale* desarrollan una respuesta inmune celular sólida que corresponde al desarrollo de signos clínicos; una vez que el animal se recupera de la fase aguda de la infección mantiene una inmunidad celular vigorosa y permanece clínicamente protegido e inmune contra la reinfección, aunque con frecuencia el animal se transforma en un portador subclínicamente infectado.⁶ Para evaluar la respuesta inmune celular en anaplasmosis bovina se han utilizado antígenos crudos de la rickettsia.⁷⁻⁹

Se ha demostrado el papel protector de la inmunidad celular en otras infecciones intracelulares, como las inducidas por *Cowdria ruminantium*,¹⁰⁻¹² *Rickettsia tsutsugamushi*,^{13,14} *Ehrlichia risticii*,^{15,16} *Theileria parva*,¹⁷ *Plasmodium* spp¹⁸ y otros protozoarios parásitos.¹⁹ No solamente los macrófagos desempeñan un papel importante en la protección contra patógenos intracelulares²⁰⁻²² sino también las células NK y los linfocitos T cooperadores (Th). Tan importantes son los últimos que se ha propuesto utilizar clones de linfocitos Th1 como sondas para identificar y caracterizar antígenos protectores y respuestas inmunes.^{23,24}

Con base en lo anterior, es necesario conocer los mecanismos inmunitarios protectores que operan en

Based on the previous information, it is necessary to know the protective immune mechanisms that operate in cattle against *Anaplasma marginale* before establishing effective immunoprophylactic control measures. In this context and with the objective of contributing to such knowledge, the current study presents data concerning the changes of peripheral T CD2, CD4 and CD8 lymphocytes (numbers and fluorescence intensity), IgG anti-*Anaplasma* antibodies and of interferon gamma (IFN- γ) in sera, as well as the production of this cytokine in response to a *rickettsia* antigen in *in vitro* complete blood cultures from cattle infected and reinfected with the same *A. marginale* isolate.

Material and methods

Anaplasma marginale isolate

The Mexican *Anaplasma marginale* isolate used in the study was obtained from infected cattle from the state of Morelos (MEX-17-029-01) and was kept in a stable state. The infected erythrocytes were suspended in a 1:1 31.2% (w/v) mixture of dimethylsulfoxide-phosphate buffered solution (PBS) pH 7.2 and then they were frozen in liquid nitrogen²⁵ until further use.

Experimental animals

Seven Swiss \times Holstein 12- to 14-month-old cattle crosses, from the state of Coahuila, Mexico, were used. Animals were free of tuberculosis as determined by the tuberculin test; of brucellosis, by serological tests; of babesiosis, by indirect immunofluorescence; and of anaplasmosis, by ELISA. Likewise, blood smears stained with Giemsa were analyzed to corroborate the absence of hemoparasites. Animals were allocated in pens with a concrete floor, where they were fed with hay and commercial food, and had drinking water *ad libitum*. After the experimental *A. marginale* infection of animals, parasitemia data were collected every other day. Each bovine in the infected group (I) was inoculated with 1×10^8 *Anaplasma marginale* (MEX-17-029-01 isolate) parasitized erythrocytes; while the other three animals were not infected and served as a control (C). Blood peripheral T lymphocytes, percentage of parasitized erythrocytes (PPE), packed cell volume (% PCV) and temperature were determined in the same animals at days 0, 8, 15, 23, 31, 37, 46, 51, 72, 82, 89, 96 and 98. The infected bovines were reinfected at day 60 with 2×10^8 *Anaplasma marginale* (MEX-17-029-01 isolate) per bovine.

los bovinos contra *Anaplasma marginale* antes de establecer medidas eficaces de control inmunoprolifático. En este contexto y con el objeto de contribuir a dicho conocimiento, en el presente estudio se presenta información sobre los cambios de linfocitos T CD2, CD4 y CD8 de sangre periférica (cantidad e intensidad de fluorescencia), de anticuerpos IgG anti-*Anaplasma* y de interferon gamma (IFN- γ) en el suero, así como de la producción de esta citocina en respuesta a un antígeno de la *rickettsia* en cultivos *in vitro* de sangre completa de bovinos infectados y reinfectedos con el mismo aislado de *A. marginale*.

Material y métodos

Aislado de *Anaplasma marginale*

El aislado mexicano de *Anaplasma marginale* usado en el estudio fue colectado de ganado infectado en Morelos, México (MEX-17-029-01), y se mantuvo como estabilizado. Los eritrocitos infectados fueron suspendidos 1:1 en solución 31.2% (w/v) de dimetilsulfóxido en solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF), pH 7.2 y se almacenaron en nitrógeno líquido²⁵ hasta su uso.

Animales experimentales

Se utilizaron siete bovinos cruce de Pardo Suizo \times Holstein, de 12 a 14 meses de edad, procedentes de Coahuila, México. Se determinó que los animales estaban libres de tuberculosis por medio de la prueba de tuberculina; de brucelosis por medio de pruebas serológicas; de babesiosis, por medio de inmunofluorescencia indirecta, y de anaplasmosis por medio de ELISA. Asimismo, se analizaron frotis de sangre teñidos con Giemsa, para confirmar la ausencia de hemoparasitos. Los animales se mantuvieron aislados en corrales con piso de concreto y consumieron alimento (alfalfa acicalada, paja de avena, alimento comercial) y agua *ad libitum*. Después de la infección experimental de los animales con *A. marginale*, se recolectaron los datos de parasitemia cada tercer día. Cada uno de los cuatro bovinos del grupo infectado (I) fue inoculado con 1×10^8 eritrocitos parasitados con *Anaplasma marginale* (aislado MEX-17-029-01); mientras que los otros tres animales no fueron infectados y permanecieron como grupo testigo (T). Los linfocitos T de sangre periférica, el porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP), el porcentaje del volumen celular aglomerado (%VCA) y la temperatura fueron evaluados en todos los animales los días 0, 8, 15, 23, 31, 37, 46, 51, 72, 82, 89, 96 y 98. Los cuatro bovinos infectados fueron reinfectedos el día 60 con 2×10^8 eritrocitos parasitados con *A. marginale* (aislado MEX-17-029-01)/bovino.

Percentage of parasitized erythrocytes (PPE), packed cell volume (% PCV) and temperature

The blood collected from animals was used to prepare blood smears which were stained with Giemsa to determine the PPE by light microscopy²⁶ and to evaluate the PCV (recorded as a percentage) by standard methods.²⁷ Body temperature (in °C) was assessed using a standard thermometer.

Peripheral blood T cells

Peripheral blood lymphocytes in blood samples were characterized by cytofluorometry (CF) at days 0, 8, 15, 23, 31, 37, 46, 51, 72, 82, 89, 96 and 98, using mouse anti-CD2⁺, anti-CD4⁺ and anti-CD8⁺ monoclonal antibodies (mAb) (Serotec, England) as described by Bautista *et al.*²⁸ To 100 µl of blood collected in tubes containing EDTA, 10 µl (diluted 1:100 in PBS) of anti-CD2⁺, CD4⁺ or anti-CD8⁺ mAb were added; this mixture was incubated for 30 min at 4°C in darkness, after which, 20 µl of goat anti-mouse immune globulin serum (diluted 1:100 in PBS), conjugated with fluorescein isothiocyanate,* were added; the mixture was incubated again for 30 min at 4°C in darkness. Next, 2 ml of lysis solution** were added and the mixture was incubated during 15 min at room temperature. Later the sample was centrifuged at 380 g for 5 min at 4°C, and the sediment obtained was resuspended in 2 ml of PBS and centrifuged at 380 g for 5 min at 4°C; finally, the supernatant was discarded and 0.5 ml of a 0.5% paraformaldehyde solution was added; the sample was kept at 4°C in the darkness for no longer than one week. Readings were carried out in a FACScan cytometer.*** The data, recorded as percentages, were analyzed with CellQuest software.† The fluorescence intensity in the analyzed samples was determined and registered.

Peripheral blood T cells/mm³

The quantity of CD2⁺, CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes per mm³ of peripheral blood in the cattle was determined according to Bautista *et al.*,²⁸ based upon the peripheral blood leukocyte differential count.

A. marginale purification

The *A. marginale* initial bodies were obtained from bovine erythrocytes parasitized with the *A. marginale* MEX-31-096-01 isolate according to the method described by Palmer and McGuire.²⁹ The parasitized erythrocytes (4 x 10⁹) were rinsed three times by centrifugation at 27 000 g. Before each rinse, the

Porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP), volumen celular aglomerado (VCA) y temperatura

Las muestras sanguíneas colectadas de los animales se utilizaron para la preparación de extendidos sanguíneos; con el fin de determinar el PEP por medio de microscopia de luz, se tiñeron con colorante de giemsa²⁶ y para la determinación del VCA (registrado como porcentaje) por medio de métodos estándar.²⁷ La temperatura (en °C) se midió con un termómetro rectal estándar.

Células T de sangre periférica

Los linfocitos de sangre periférica en las muestras sanguíneas fueron caracterizados por citometría de flujo (CF) los días 0, 8, 15, 23, 31, 37, 46, 51, 72, 82, 89, 96 y 98, usando anticuerpos monoclonales (AcM) de ratón anti-CD2⁺, anti-CD4⁺ y anti-CD8⁺ (Serotec, Inglaterra) de acuerdo con Bautista *et al.*,²⁸ a 100 µl de sangre colectada en tubos que contenían EDTA, se le añadieron 10 µl (diluida 1:100 en solución salina amortiguadora de fosfatos, SSAF) de AcM anti-CD2⁺, CD4⁺ o anti-CD8⁺; esta mezcla se incubó durante 30 min a 4°C en la oscuridad; luego se adicionaron 20 µl de suero de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón (diluido 1:100 en SSAF), conjugado con isotiocianato de fluoresceína,* la mezcla se incubó nuevamente durante 30 min a 4°C en la oscuridad. A continuación se añadieron dos ml de solución de lisis** y esta mezcla fue incubada durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente la muestra se centrifugó a 380 g durante 5 min a 4°C, y el sedimento obtenido fue resuspendido con 2 ml de SSAF y centrifugado a 380 g durante 5 min a 4°C; finalmente, el sobrenadante se decantó para luego adicionar 0.5 ml de una solución de paraformaldehído al 0.5%; la muestra se mantuvo a 4°C en la oscuridad durante un lapso no mayor de una semana. La CF se llevó a cabo con un citómetro FACScan.*** Los datos, registrados como porcentajes se analizaron con el programa CellQuest.† Asimismo, se determinó y registró como porcentaje la intensidad de fluorescencia en las muestras analizadas.

Células T/mm³ de sangre periférica

La cantidad de linfocitos CD2⁺, CD4⁺ y CD8⁺ por mm³ de sangre periférica en los bovinos se determinó de acuerdo con Bautista *et al.*,²⁸ con base en el conteo diferencial de leucocitos de sangre periférica.

* Sigma, Missouri, USA.

** Becton Dickinson, San Jose, CA, USA.

*** Becton Dickinson, San Jose, CA, USA.

† Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA.

sediment from the previous centrifugation was suspended in 40 ml of RPMI 1640 with 2 mM L-Glutamine and 25 mM HEPES. The sediment of the final centrifugation was suspended in 35 ml of culture medium, and then sonicated at 50 W for 2 min, and washed by suspension and centrifugation twice at 1 650 g for 15 min. The quantity of protein in the preparations was determined in accordance with Lowry *et al.*³⁰

Detection of IgG anti-Anaplasma marginale antibodies by ELISA

Serum samples were obtained before infection with *A. marginale*, and during days 8, 15, 23, 31, 37, 46, 51, 72, 82, 89, 96 and 98. IgG anti-*A. marginale* levels were determined by ELISA using *A. marginale* organisms as the antigen. These were washed with sodium dodecyl sulfate (SDS), then they were exposed to the bovine serum according to Winkler *et al.*³¹ and later exposed to rabbit serum anti-bovine IgG conjugated with alkaline phosphatase* in p-nitrophenyl phosphate, disodium** as a substrate. After an additional washing, the readings were carried out in an ELISA reader*** at an optical density (OD) of 405 nm. The sera, diluted 1:100, with optical densities greater than 0.200 (mean + two standard deviations of the results obtained with sera from *A. marginale*-free cattle) were considered positives to anti-*A. marginale* antibodies.

Determination of interferon gamma (IFN- γ) in serum and in supernatant from complete blood culture, by ELISA

The sera collected at days 0, 8, 15, 23, 31, 37, 46, 51, 72, 82, 89, 96 and 98 were analyzed using a commercial bovine IFN- γ ELISA kit.[†] Likewise, at days 0, 10, 23, 92 and 98, complete blood cultures from all animals were carried out (1 ml per animal/well in 24-well flat bottomed Falcon microplates) in the presence of 10 μ g of *A. marginale* antigen/sample in a humidified incubator, with 5% CO₂ at 37°C during 24 h. Once the time had elapsed the supernatants were collected and examined by the commercial bovine IFN- γ ELISA kit following the manufacturer's instructions. The readings were carried out in an ELISA reader[‡] at an optical density (OD) of 650 nm.

Statistical analysis

The comparison of data between groups was carried out by ANOVA.³² Values of P < 0.05 were considered significant.

Purificación de *A. marginale*

Los cuerpos iniciales de *A. marginale* se obtuvieron a partir de eritrocitos de bovino parasitados con el aislado MEX-31-096-01 de *A. marginale* de acuerdo con el método descrito por Palmer y McGuire.²⁹ Los eritrocitos parasitados (4×10^9) se lavaron tres veces por centrifugación a 27 000 g. Antes de cada lavado, el sedimento de la centrifugación previa fue resuspendido en 40 ml de medio RPMI 1640 con 2 mM L-Glutamina y 25 mM HEPES. El sedimento de la centrifugación final fue resuspendido en 35 ml de medio, sometido a sonicación a 50 W durante 2 min y lavado por centrifugación dos veces a 1 650 g durante 15 min. La cantidad de proteína en las preparaciones se determinó de acuerdo con Lowry *et al.*³⁰

Detección de anticuerpos IgG anti-Anaplasma marginale por medio de ELISA

Se obtuvieron muestras de suero antes de la infección con *A. marginale*, y durante los días 8, 15, 23, 31, 37, 46, 51, 72, 82, 89, 96 y 98. Los niveles de IgG anti-*A. marginale* se determinaron por ELISA usando *A. marginale* como antígeno; dichos organismos se lavaron con dodecil sulfato de sodio (SDS), se expusieron al suero de bovino de acuerdo con Winkler *et al.*³¹ y después fueron expuestos a suero de conejo anti IgG de bovino conjugado con fosfatasa alcalina* en p-Nitrophenyl Phosphate, Disodium** como sustrato. Se hizo un lavado adicional y las lecturas se llevaron a cabo en con lector de ELISA*** a una densidad óptica (DO) de 405 nm. Los sueros, diluidos 1:100, con densidades ópticas mayores a 0.200 (media + dos desviaciones estándar de los resultados obtenidos con sueros de bovinos libres de *A. marginale*) se consideraron positivos a anticuerpos anti-*A. marginale*.

Determinación de interferon gamma (IFN- γ) en suero y en sobrenadante de cultivo de sangre completa por medio de ELISA

Mediante un paquete comercial de ELISA[†] se analizaron los sueros colectados los días 0, 8, 15, 23, 31, 37, 46, 51, 72, 82, 89, 96 y 98. Asimismo, los días 0, 10, 23, 92 y 98 se llevaron a cabo cultivos de sangre completa heparinizada de cada uno de los animales infectados y testigo (1 ml por animal/pozo en microplacas de 24 pozos de fondo plano -Falcon-) en presencia de 10 μ g de antígeno de *A. marginale*/muestra en estufa humidificada, con 5% de CO₂ a 37°C durante 24 h. Transcurri-

* Sigma, Missouri, USA.

** pNPP, Sigma, Missouri, USA.

*** Multiskan Plus, Labsystems, Finland.

† IDEXX laboratories, Westbrook, Maine, USA.

‡ Multiskan Plus, Labsystems, Finland.

Results

In the infected group, the PPE reached a maximum average of 5.2% at day 31 posinfection (pi) that diminished to less than 1% at day 46, and later on the rickettsia was no longer detected in blood smears even after reinfection (Figure 1a). The PCV diminished until it reached an average of 6% at day 46 pi and was within normal limits from reinfection up to the end of the study (Figure 1b). The CD2+ values were similar in both groups during the study; while those of CD4+ and CD8+ in the infected group significantly diminished ($P < 0.05$) at day 44 pi and later reached values similar to those of the control group (Figure 2). A significant increase of fluorescence intensity (FI) in CD2+ and CD8+ lymphocytes from animals in the infected group after reinfection (days 62 and 83) ($P < 0.05$) with respect to the FI observed in the lymphocytes from the control group was noticed (Figure 3). Antibody titers (Abs) in the infected cattle increased above the basal values at day 51 pi and increased even more after reinfection. In the Control group, antibody titers were within basal values (Figure 4a). The interferon gamma (IFN- γ) levels in the sera from infected animals increased steadily, particularly following day 51 pi, while levels in the Control group remained within basal limits (Figure 4b). In the supernatants of complete blood cultures from infected animals, the IFN- γ levels were higher after reinfection than after the primary infection; while in the supernatants of blood from the control group those levels remained within the basal limits (Figure 5).

Discussion

It has been stressed that vaccination against anaplasmosis has been an effective measure for outbreak prevention; however the existent vaccines, live or attenuated, depend on bovine blood as a source of infection or of antigen.³³ Vaccines obtained from blood have the inconvenience of transmitting other bovine pathogens, that are imperceptible at the time of blood collection; besides, the different *Anaplasma marginale* geographical isolates frequently do not induce cross protection.³³ In this context, and taking into account recent studies on the different genotypes,^{34,35} and on *A. marginale* antigenic variation³⁶ it is mandatory to better understand the host immune mechanisms responsible for protection in bovine anaplasmosis, and to identify the rickettsial epitopes involved in the induction of both humoral and cellular immune responses³³ so as to design or establish effective immunoprophylactic control measures. With this in mind, the information generated by the present study contributes to the understanding of these mechanisms.

do ese tiempo se colectaron los sobrenadantes y se examinaron por medio del paquete comercial de ELISA, siguiendo las indicaciones del fabricante. Las lecturas se llevaron a cabo en un lector de ELISA[†] a una densidad óptica (DO) de 650 nm.

Análisis estadístico

La comparación de datos entre grupos se llevó a cabo por medio de un análisis de varianza.³² Valores de $P < 0.05$ fueron considerados como significativos.

Resultados

En el grupo infectado el PEP alcanzó un promedio máximo de 5.2% el día 31 posinfección (pi) para bajar a menos del 1% el día 46, y posteriormente ya no se detectó la *rickettsia* en los frotis sanguíneos aun después de la reinfección (Figura 1a). El VCA disminuyó hasta alcanzar un promedio de 6% el día 46 pi y se mantuvo dentro de los límites normales en la reinfección hasta el final del estudio (Figura 1b). Los valores de CD2+ fueron similares en los dos grupos a lo largo del estudio; en cambio los de CD4+ y CD8+ en el grupo infectado disminuyeron significativamente ($P < 0.05$) el día 44 pi y después alcanzaron valores similares a los del grupo testigo (Figura 2). Al examinar la intensidad de fluorescencia (IF) se apreció un aumento significativo ($P < 0.05$) de ésta en los linfocitos CD2+ y CD8+ de los animales del grupo infectado después de la ri (días 62 y 83) con respecto a la IF, determinada en los bovinos del grupo testigo (Figura 3). Se observó que los títulos de anticuerpos (Acs) de los bovinos infectados se incrementaron por arriba de los valores basales el día 51 pi y aumentaron más después de la ri. En el grupo de los animales testigo, dichos títulos se mantuvieron dentro de los límites basales (Figura 4a). Los niveles de interferon gamma (IFN- γ) en el suero aumentaron continuamente en el grupo de animales infectados, particularmente desde el día 51 pi; mientras que dichos niveles se mantuvieron dentro de los límites basales en el grupo de los bovinos testigo (Figura 4b). En los animales infectados, los niveles de IFN- γ en el sobrenadante de cultivos de sangre completa fueron más altos después de la ri, que después de la primoinfección; mientras que en el grupo de los bovinos testigo, los niveles se mantuvieron dentro de los límites basales (Figura 5)

Discusión

Se ha indicado que la vacunación contra la anaplasmosis bovina ha sido una medida efectiva para la prevención de brotes; sin embargo, las vacunas existentes, vivas o inactivadas, dependen de la sangre de bovino

Regarding the results, a plausible explanation for the marked decrease in CD4+ and CD8+ lymphocytes at day 45 after infection is that these cells were located in a higher proportion in secondary lymphoid organs

como fuente de infección o de antígeno.³³ Las vacunas derivadas de sangre tienen el inconveniente de transmitir otros patógenos de los bovinos, que son imperceptibles al tiempo de colectar la sangre; además, los

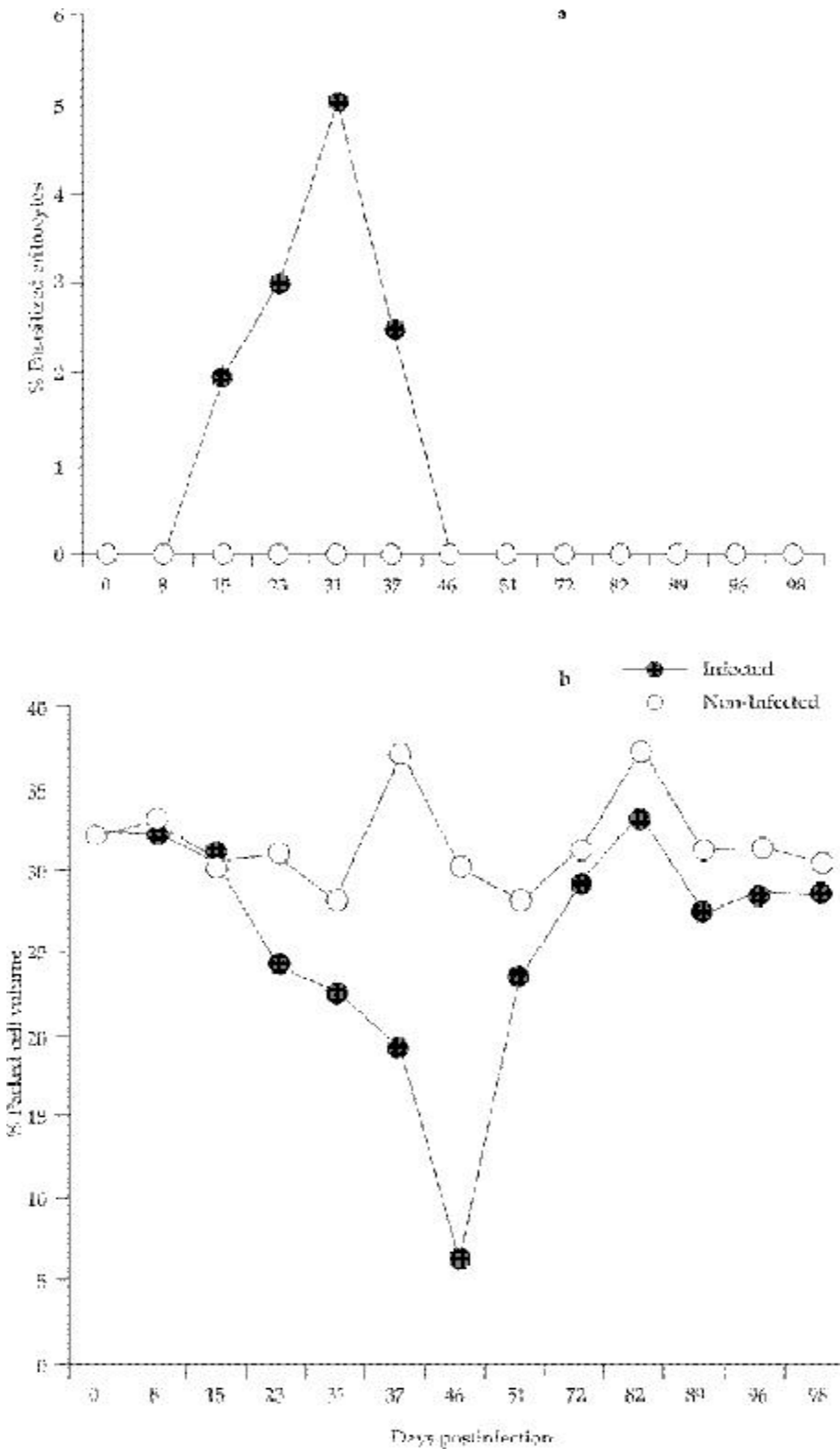


Figura 1. Promedio de eritrocitos parasitados **a)** y del volumen celular aglomerado **b)** en bovinos infectados y reinfectados (n=4, círculos negros) con el aislado MEX-17-029-01 de *Anaplasma marginale* (infección día 0 con 1×10^8 eritrocitos parasitados, EP; reinfección día 60 con 2×10^8 EP) o no infectados (n=3, círculos blancos). Cada punto representa el promedio \pm error estándar. Average parasitized erythrocytes **a)** and packed cell volume **b)** in infected and reinfected cattle (n=4, black circles) with the *Anaplasma marginale* MEX-17-029-01 isolate (infection at day 0 with 1×10^8 parasitized erythrocytes, PE; reinfection at day 60 with 2×10^8 PE) or non-infected (n=3, white circles). Each point represents the mean \pm standard error.

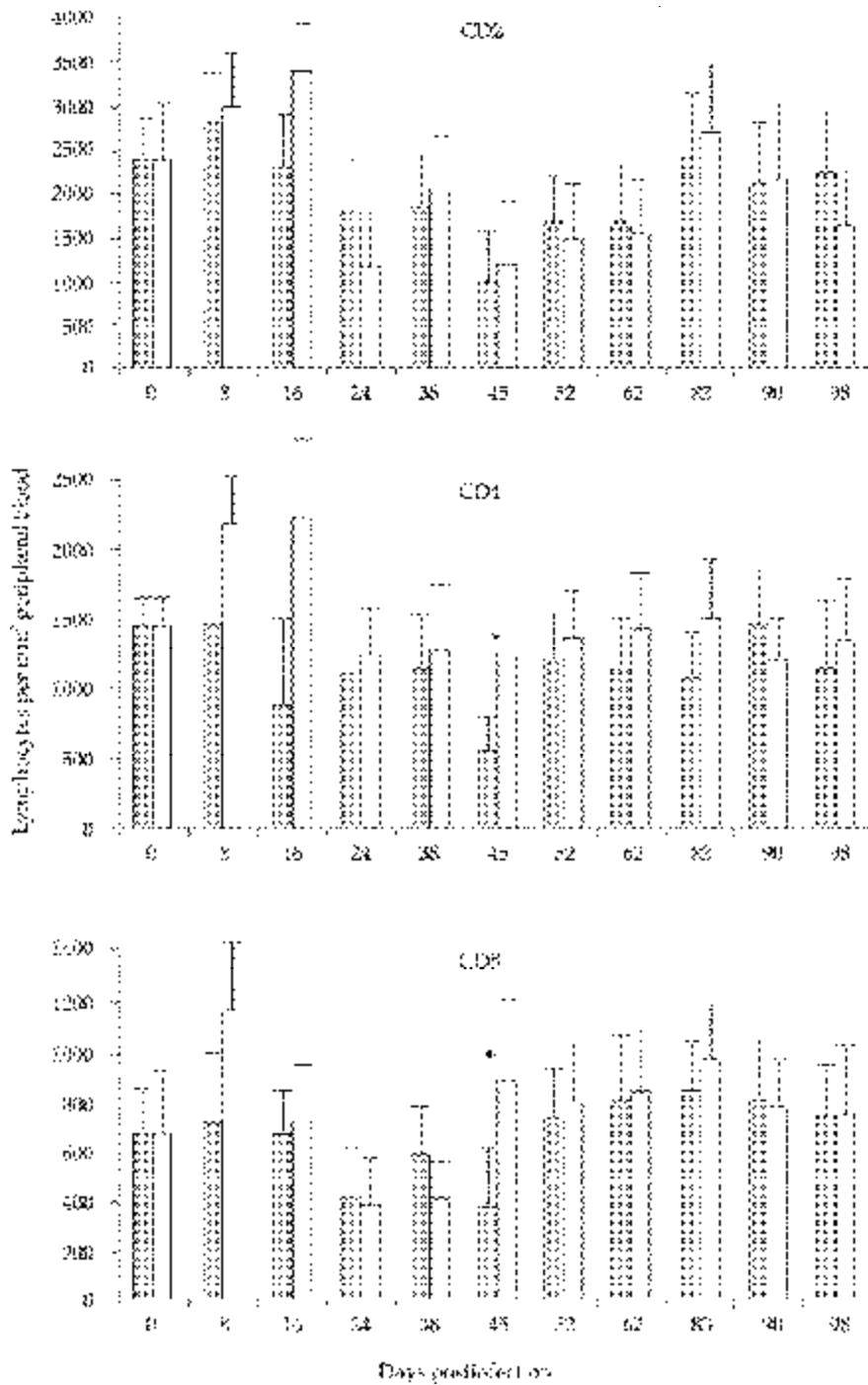


Figura 2. Linfocitos CD2, CD4 y CD8 por mm³ de sangre periférica de bovinos infectados y re infectados (n = 4 barras grises) con el aislado MEX-17-029-01 de *Anaplasma marginale* (infección día 0 con 1×10^8 eritrocitos parasitados, EP; reinfección día 60 con 2×10^8 EP) y de animales no infectados (n = 3 barras blancas). Cada punto representa el promedio \pm error estándar. *P < 0.05.

CD2, CD4 and CD8 lymphocytes per mm³ of peripheral blood from infected and reinfected cattle (n=4 gray columns) with the *Anaplasma marginale* MEX-17-029-01 isolate (infection at day 0 with 1×10^8 parasitized erythrocytes, PE; reinfection at day 60 with 2×10^8 PE) and from non-infected animals (n=3 white columns). Each point represents the mean \pm standard error. *P < 0.05.

(for example, spleen and lymph nodes) than in peripheral blood, to be stimulated by antigen presenting cells with processed rickettsial peptides on their membranes. These results concur with the decreased packed cell volume, and it is also probable that a transitory immunosuppression was induced by the infection. In this regard, it has been reported that there is a lowering of the percentage of circulating bovine CD8+ lymphocytes, between weeks five and eight, after *Mycobacteri-*

diferentes aislados geográficos de *A. marginale* frecuentemente no inducen protección cruzada.³³ En este sentido y a la luz de los estudios recientes sobre los diferentes genotipos^{34,35} y la variación antigénica de *A. marginale*³⁶ es indispensable conocer mejor los mecanismos inmunitarios del hospedero responsable de la protección en la anaplasmosis bovina, así como identificar los epitopos de la *rickettsia* involucrados tanto en la respuesta inmune humoral como en la celular³³ para dise-

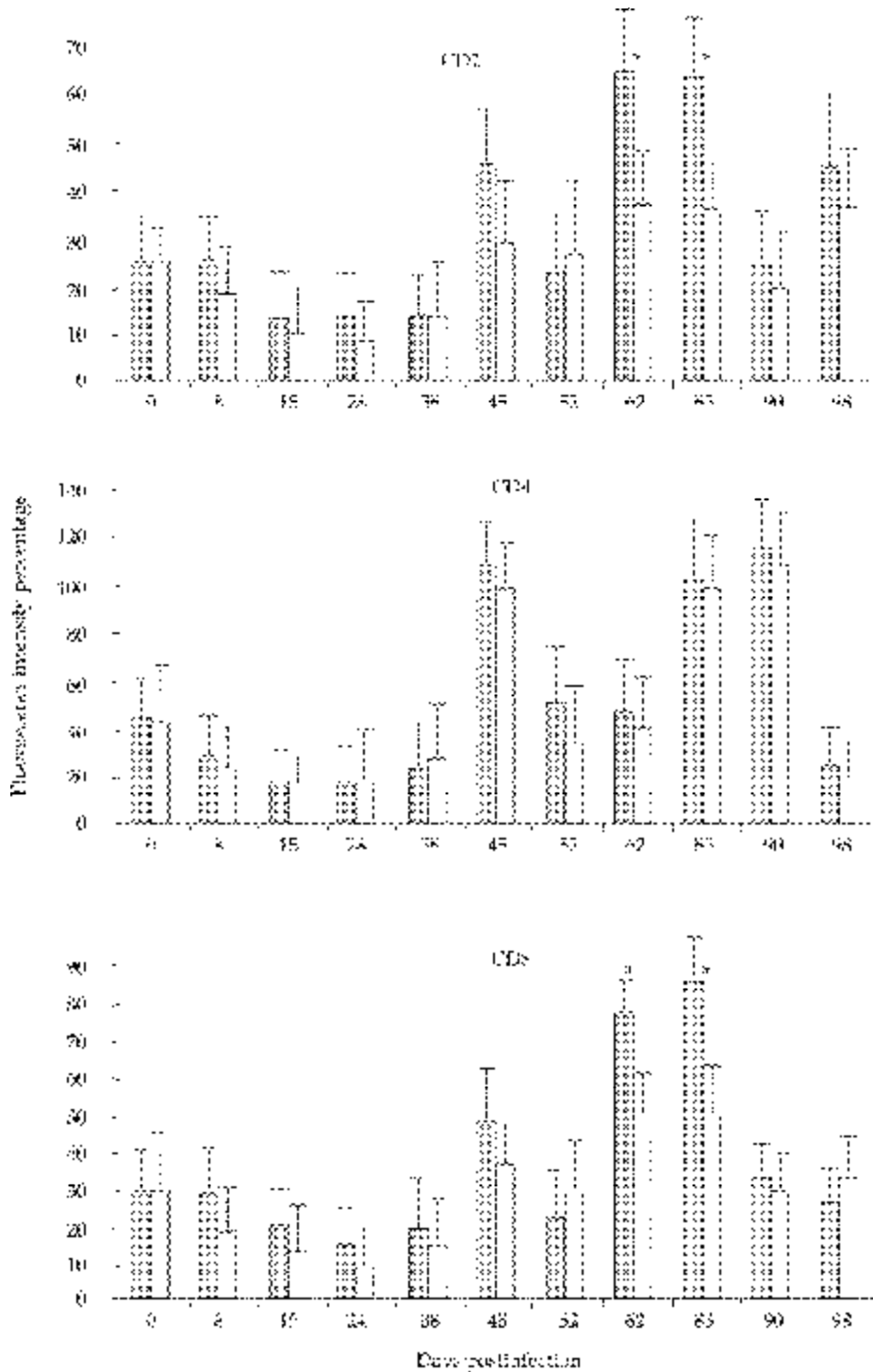


Figura 3. Porcentaje de intensidad de fluorescencia de linfocitos CD2, CD4 y CD8 de bovinos infectados y re infectados (n = 4 barras grises) con el aislado MEX-17-029-01 de *Anaplasma marginale* (infección día 0 con 1×10^8 eritrocitos parasitados, EP; reinfección día 60 con 2×10^8 EP) y de animales no infectados (n = 3 barras blancas). Cada punto representa el promedio \pm error estándar. *P < 0.05.

Percentage of fluorescence intensity in CD2, CD4 and CD8 lymphocytes from infected and reinfected cattle (n = 4 gray columns) with the *Anaplasma marginale* MEX-17-029-01 isolate (infection at day 0 with 1×10^8 parasitized erythrocytes, PE; reinfection at day 60 with 2×10^8 PE) and from non-infected animals (n = 3 white columns). Each point represents the mean + standard error. *P < 0.05.

um bovis infection;³⁷ likewise, the possibility that T cell apoptosis had occurred cannot be ignored, in a similar way to that observed in *Plasmodium falciparum*^{38,39} and *Mycobacterium tuberculosis*^{40,41} infections.

The significant increase in fluorescence intensity observed in CD2+ and CD8+ lymphocytes at days 62 and 83 might be caused by a higher metabolic activity in the CD8+ lymphocyte population that

ñar o establecer medidas inmunoproliféricas efectivas de control. En este sentido, la información generada en el presente estudio es una contribución más para el esclarecimiento de dichos mecanismos.

En cuanto a los resultados, una probable explicación del marcado descenso de los linfocitos CD4+ y CD8+ el día 45 pi observado, es que éstos se hayan localizado en mayor proporción en órganos linfoides secundarios

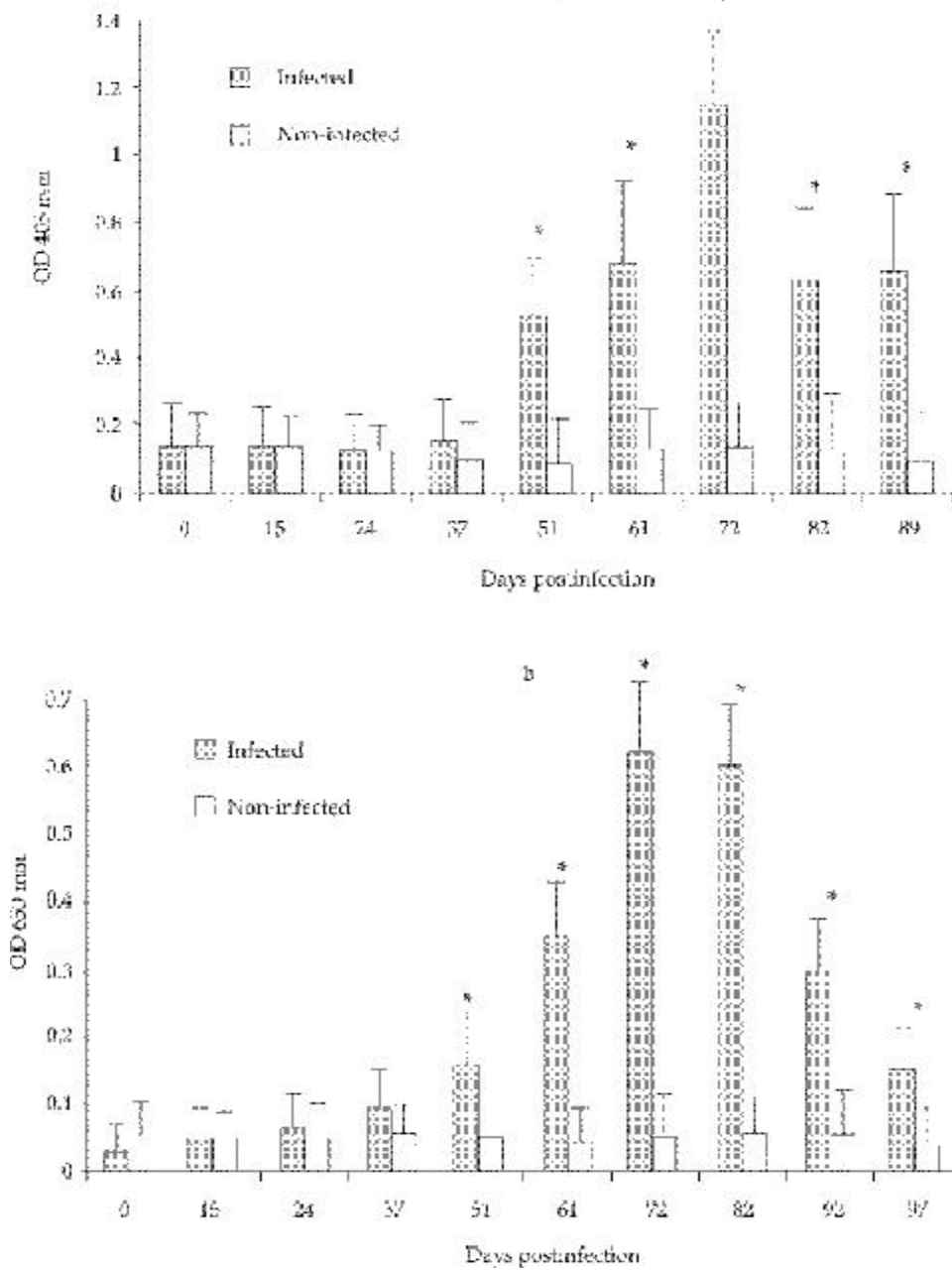


Figura 4. Niveles de anticuerpos IgG anti-*Anaplasma* a) y de interferon gamma (IFN-g) determinados por ELISA en el suero b) de bovinos infectados y reinfectados (n = 4 barras grises) con el aislado MEX-17-029-01 de *Anaplasma marginale* (infección día 0 con 1×10^8 eritrocitos parasitados, EP; reinfección día 60 con 2×10^8 EP) y de animales no infectados (n = 3 barras blancas). Cada punto representa el promedio \pm error estándar. * P < 0.05.

IgG anti-*Anaplasma* antibody levels a) and of interferon gamma (IFN-g) as determined by ELISA in the sera b) from infected and reinfect cattle (n = 4 gray columns) with the *Anaplasma marginale* MEX-17-029-01 isolate (infection at day 0 with 1×10^8 parasitized erythrocytes, PE; reinfection at day 60 with 2×10^8 PE) and from non-infected animals (n = 3 white columns). Each point represents the mean + standard error. *P < 0.05.

gave rise to an increment of CD molecules on the cell surface after reinfection and, in turn, affected the CD2+ lymphocyte population (which approximately corresponds to the addition of CD4+ and CD8+).

IgG anti-*A. marginale* antibody levels increased after infection and after reinfection in the infected group. In this regard, it has been observed that high IgG2 antibody levels in animals immunized with external membranes from *Anaplasma marginale* Florida strain, protect cattle against reinfection with the same strain.⁴²

(por ejemplo, el bazo y los ganglios linfáticos) que en la sangre periférica para ser estimulados por células presentadoras de antígeno con péptidos procesados de la *rickettsia*. Estos datos se correlacionan en la disminución del volumen celular aglomerado, también es probable que haya ocurrido una inmunosupresión transitoria inducida por la infección. Así, se ha informado que hay una disminución del porcentaje de linfocitos CD8+ de bovino circulantes, entre las semanas cinco y ocho, después de la infección con *Mycobacterium bovis*,³⁷ asimismo, no se puede descartar la posibilidad de que se haya presentado apoptosis de células T, tal

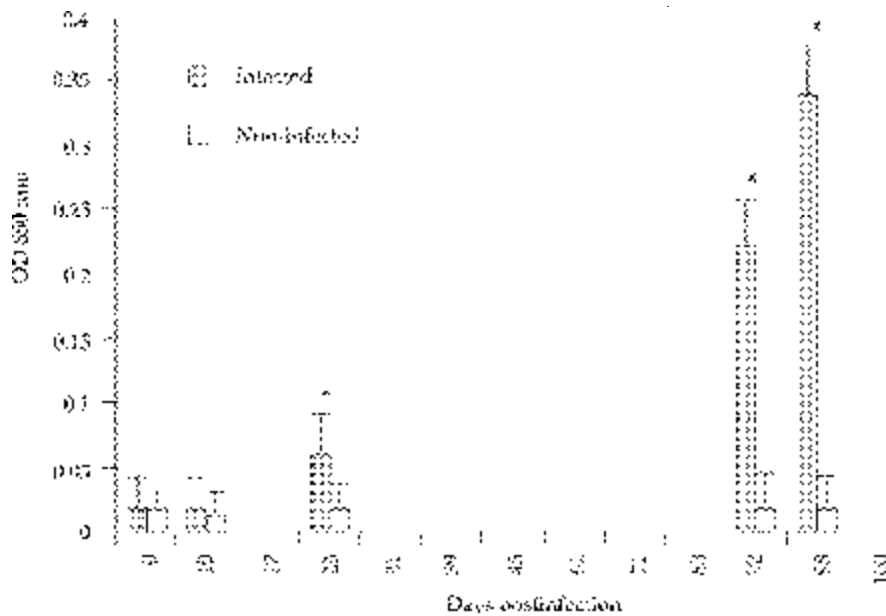


Figura 5. Niveles de interferon gamma (IFN-g) en el sobrenadante de cultivo de sangre completa en presencia de un antígeno de *A. marginale* de bovinos infectados y reinfectados (n = 4 barras grises) con el aislado MEX-17-029-01 de *Anaplasma marginale* (infección día 0 con 1×10^8 eritrocitos parasitados, EP; reinfección día 60 con 2×10^8 EP) y de animales no infectados (n = 3 barras blancas). Cada punto representa el promedio \pm error estándar. * P < 0.05.

Average interferon gamma (IFN-g) levels in complete blood culture supernatant, in the presence of an *A. marginale* antigen, from infected and reinfected cattle (n = 4 gray columns) with the *Anaplasma marginale* MEX-17-029-01 isolate (infection at day 0 with 1×10^8 parasitized erythrocytes, PE; reinfection at day 60 with 2×10^8 PE) and from non-infected animals (n = 3 white columns). Each point represents the mean \pm standard error. *P < 0.05.

On the other hand, interferon gamma (IFN- γ) levels in the sera from *A. marginale* infected animals increased steadily after the first infection and reached high levels after reinfection. However, in the supernatants from complete blood (collected after reinfection) cultures exposed to a rickettsial antigen, the levels of this cytokine increased considerably (Figure 5). This observation suggests that IFN- γ has an important role in the protective immune response against *Anaplasma marginale* infection and it is highly probable, based upon the fluorescence intensity increase after reinfection, that CD8+ lymphocytes are involved in the production of this cytokine (Figure 3). In this context, it has been demonstrated that the immunization of cattle with surface proteins from purified *A. marginale* membranes, induces solid immunity in which macrophages, IgG2 and IFN- γ produced by CD4+ T cells participate.⁴² This supports the proposal that the CD4+ lymphocyte that expresses IFN- γ amplifies IgG2 synthesis and a concomitant activation of macrophages to increase the expression of receptors in these, phagocytosis, phago-lysosomal fusion and the release of rickettsial nitric oxide.⁴³ Similarly, in experimental cattle tuberculosis, it has been demonstrated that peripheral blood T lymphocytes, both CD4+ and CD8+, but not WC1+, produce IFN- γ after stimulation with PPD, and with live or dead BCG.³⁷ In support of the protective role played by IFN- γ in hemoparasitic infections, a recent study demonstrated that this cytokine, together with CD4+ T lymphocytes, are essential in the protective immune response of mice against *Babesia microti*.⁴⁴ Likewise, it has been reported that

como se ha observado en infecciones por *Plasmodium falciparum*^{38,39} y *Mycobacterium tuberculosis*.^{40,41}

En cuanto al aumento significativo de la intensidad de fluorescencia, observada en los linfocitos CD2+ y CD8+ los días 62 y 83, es probable que se haya debido a una mayor actividad metabólica de la población de linfocitos CD8+, que dio lugar a un incremento de moléculas CD en la superficie celular después de la reinfección y que se reflejó en los linfocitos CD2+ (que corresponde aproximadamente a la suma de CD4+ más CD8+).

Los niveles de anticuerpos IgG anti-*A. marginale* aumentaron por sobre los valores basales en el día 51 posinfección en el grupo de animales infectados con la *rickettsia* y se incrementaron aún más después de la reinfección. En este sentido, se ha demostrado que los títulos altos de anticuerpos IgG2 de animales inmunizados con membranas externas de la cepa Florida de *A. marginale* protegen a los bovinos contra la reinfección con la misma cepa.⁴²

Por otro lado, los niveles de interferon gamma (IFN- γ) en el suero de los animales infectados con *A. marginale* se incrementaron paulatinamente después de la primoinfección hasta alcanzar altos niveles después de la reinfección. Sin embargo, los niveles de esta citocina aumentaron de manera considerable, después de la reinfección, en los sobrenadantes de cultivos de sangre completa expuestos a un antígeno de la *rickettsia* (Figura 5), lo que sugiere que el IFN- γ participa de manera importante en la respuesta inmune protectora contra *Anaplasma*, y que muy probablemente, con base en el aumento de la intensidad de fluorescencia después de la reinfección, los linfocitos T CD8+ están involucrados en la producción de dicha citocina (Figura 3). En este contexto, se ha demostrado que la inmunización de ganado bovino con proteínas de superficie de membranas purificadas de *A. marginale* induce una inmunidad sólida,

the inoculation of cattle with *Mycobacterium*, a potent inducer of interleukin 12 (IL-12) and CD4+ T cells expressing IFN- γ , significantly increases the immune control of acute rickettsemia produced by *Anaplasma marginale*.⁴⁵

On the basis of the obtained results it is concluded that: a) The infection and reinfection of cattle with the same *A. marginale* isolate generates high levels of IgG antibodies and of IFN- γ in serum and supernatant of complete blood culture; b) The supernatants of complete blood cultures from infected animals, in the presence of *A. marginale* antigen, showed high levels of IFN- γ particularly after reinfection, suggesting a role for this cytokine in the bovine protective immune response against *A. marginale*; c) The increase of fluorescence intensity in the CD8+ T lymphocytes after reinfection suggests an active role of these cells in the protective immune response, probably by IFN- γ production; d) there is the need to carry out more studies to clarify the roles of IgG subclass antibodies, of IFN- γ , and of CD4+ and CD8+ lymphocytes in the bovine protective response against different *A. marginale* isolates.

Aknowledgements

The present study was carried out with funds from SAGAR-Conacyt, contract number K0009-B9710. Authors thank Dr. Miguel Angel Garcia Ortiz (CENID-PAVET, INIFAP) for donating the *Anaplasma marginale* antigen.

Referencias

1. Kreier JP, Gothe R, Ihler GM, Krampitz HE, Mernaugh G, Palmer GH. In: Ballows A *et al.* editors. The Prokaryotes. New York: Springer Verlag, 1992:3994-4022.
2. Murphy FA, Osebold JW, Aalund O. Kinetics of the antibody response to *Anaplasma marginale* infection. J Infect Dis 1966;166:99-111.
3. Ristic M, Carson CA. In: Miller LH, Pino J.A, Mc Kelvey JJ Jr, editors. Immunity to blood parasites of man and animals. New York: Plenum, 1977:151-158.
4. Gale KR, Leatch G, Gartside M, Dimmonk CM. *Anaplasma marginale*: failure of sera from immune cattle to confer protection in passive-transfer experiments. Parasitol Res 1992;78:410-415.
5. Zaugg JL, Kuttler KL. Bovine anaplasmosis: *in utero* transmission and the immunologic significance of ingested colostral antibodies. Am J Vet Res 1984;45:440-443.
6. Ristic M, Nyindo MBA. Jones E editor. Proceedings of 6th National Anaplasmosis Conference. Stillwater, OK, Heritage Press, 1973:66-70.
7. Buening GM. Cell-mediated immune responses in calves with anaplasmosis. Am J Vet Res 1973;34:757-763.
8. Buening GM. Cell-mediated immune responses in anaplasmosis as measured by a micro cell-mediated assay and leukocyte migration-inhibition test. Am J Vet Res 1976;37:1215-1218.

en la que participan macrófagos, IgG2 e IFN- γ producido por linfocitos T CD4+,⁴² apoyando la propuesta de que el linfocito CD4+ que expresa IFN- γ amplifica la síntesis de IgG2 y que, concomitantemente, activa macrófagos para incrementar la expresión de receptores en éstos, la fagocitosis, la fusión fagolisosomal y la liberación de óxido nítrico *rickettsiacida*.⁴³ Similarmente, en tuberculosis bovina experimental se ha demostrado que tanto los linfocitos T CD4+ como los T CD8+, pero no los T WC1+ de sangre periférica, producen IFN- γ después de la estimulación con PPD, y BCG viva o muerta.³⁷ En apoyo al papel protector del IFN- γ en infecciones por otros hemoparásitos se ha demostrado que dicha citocina, junto con linfocitos T CD4+, son esenciales en la respuesta inmune protectora de ratones contra *Babesia microti*.⁴⁴ Asimismo, se ha informado que la inoculación con *Mycobacterium*, un potente inducer de interleucina 12 (IL-12) y células T CD4+ que expresan IFN- γ , incrementa de manera significativa el control inmunitario de la rickettsemia aguda por *A. Marginale*.⁴⁵

Con base en los resultados obtenidos se concluye que: a) La infección y reinfección con el mismo aislado de *A. marginale* genera niveles altos de anticuerpos IgG y de IFN- γ en el suero y sobrenadante de cultivo de sangre completa; b) los sobrenadantes de cultivo de sangre completa de animales infectados, en presencia de antígeno de *A. marginale*, presentaron niveles elevados de IFN- γ , particularmente después de la reinfección, sugiriendo la participación de esta citocina en la respuesta inmune protectora de los bovinos contra *A. Marginale*; c) el incremento de la intensidad de fluorescencia en los linfocitos T CD8+, después de la reinfección, sugiere un papel activo en la respuesta inmune protectora, quizá en la producción de IFN- γ d) es necesario llevar a cabo más estudios para esclarecer el papel de las subclases de IgG, del IFN- γ y de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ en la respuesta protectora de los bovinos contra diferentes aislados de *A. marginale*.

Agradecimientos

El presente estudio fue financiado con recursos del proyecto K0009-B9710 SAGAR-Conacyt. Se agradece la donación del antígeno de *Anaplasma marginale* al Dr. Miguel Ángel García Ortiz, del CENID-PAVET, INIFAP-SAGARPA.

9. Carson CA, Sells DM, Ristic M. Cell-mediated immune response to virulent and attenuated *Anaplasma marginale* administered to cattle in live and inactivated forms. Am J Vet Res 1977;38:173-179.
10. Du Plessis JL, Gray C, Van Strijp MF. Flow cytometric analysis of T cell response in mice infected with *Cowdria ruminantium*. Onderstepoort J Vet Res 1992;59:337-338.
11. Totté JP, Gee ALW, DE, Werenne J. Role of interferons in infectious diseases in the bovine species: effect on viruses and rickettsias. Rev Elev Med Vet Pays Trop 1993;46:83-86.
12. Mwangi DM, Mahan SM, Nyanjui JK, Taracha ELN, Mckeever DJ. Immunization of cattle by infection with

- Cowdria ruminantium* elicits T lymphocytes that recognize autologous, infected endothelial cells and monocytes. *Infect Immun* 1998;66:1855-1860.
13. Nacy CA, Meltzer MS. Macrophages in resistance to rickettsial infection: macrophage activation *in vitro* for killing of *Rickettsia tsutsugamushi*. *J Immunol* 1979;123:2544-2549.
 14. Nacy CA, Meltzer MS. Macrophages in resistance to rickettsial infections: protection against lethal *Rickettsia tsutsugamushi*. *J Leukoc Biol* 1984;35:385-396.
 15. Williams NM, Timoney PJ. *In vitro* killing of *Ehrlichia risticii* by activated and immune mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* 1993;61:861-867.
 16. Williams NM, Granstrom DE, Timoney PJ. Humoral antibody and lymphocyte blastogenesis responses in BALB/c, C3H/HeJ and AKR/N mice following *Ehrlichia risticii* infection. *Res Vet Sci* 1994;56:284-289.
 17. Brown WC, Sugimoto C, Conrad PA, Grab DA. Differential response of bovine T-cell lines to membrane and soluble antigens of *Theileria parva* schizont-infected cells. *Parasite Immunol* 1989;11:567-583.
 18. Taylor-Robinson AW. Regulation of immunity to Malaria: valuable lessons learned from murine models. *Parasitol Today* 1995;11:334-342.
 19. Thorne KJ, Blackwell JM. Cell-mediated killing of protozoa. *Adv Parasitol* 1983;22:43-151.
 20. Garside P, Mowat A Mcl. Polarization of Th-cell responses: a phylogenetic consequence of nonspecific immune defence? *Immunol Today*, 1995;16:220-223.
 21. Scott P, Kaufmann SHE. The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection. *Immunol Today* 1991;12:346-348.
 22. Fresno M, Kopf M, Rivas L. Cytokines and infectious diseases. *Immunol Today* 1997;18:56-58.
 23. Brown WC, Zhao S, Woods VM, Dobbelaere DAE, Rice-Fitch AC. *Babesia bovis*-specific CD4⁺T cell clones from immune cattle express either the Th0 or Th1 profile of cytokines. *Rev Elev Med Vét Pays Trop* 1993;46:65-69.
 24. Brown WC, Rice-Fitch AC. Use of helper T cells to identify potential vaccine antigens of *Babesia bovis*. *Parasitol Today* 1994; 10:145-149.
 25. Love JN. Cryogenic preservation of *Anaplasma marginale* with dimethyl sulfoxide. *Am J Vet Res* 1972;32:2557-2560.
 26. Callow LL. Animal health in Australia, Sydney, Ed. Australian Bureau of Animal Health, 1984:121.
 27. Archer RK. Technical methods In: Archer RK, Jeffcott LB editors. *Comparative Clinical Hematology*. Oxford: Oxford Blackwell Scientific Publications, 1977:537-610.
 28. Bautista Garfias CR, Angeles L, Garcia Ortiz MA, Garcia Tapia D, Soto C, Montaña Estrada LF. Variation of peripheral blood BoCD⁺, BoCD4⁺, and BoCD8⁺ lymphocytes, the BoCD4:BoCD8 index and antibodies in bovines infected and rechallenged with isolates of *Anaplasma marginale* of Mexican origin. *Rev Latinoam Microbiol* 2000;43:101-109.
 29. Palmer GH, McGuire TC. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *J Immunol* 1984;133:1010-1015.
 30. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
 31. Winkler GC, Brown GM, Lutz H. Detection of antibodies to *Anaplasma marginale* by an improved enzyme-linked immunosorbent assay with sodium dodecyl sulfate-disrupted antigen. *J Clin Microbiol* 1987;25:633-636.
 32. Olivares-Saénz E. (programa de cómputo) Paquete de diseños experimentales FAUANL, versión 2.5 Marin (NL): Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, 1994.
 33. Kocan KM, Blouin EF, Barbet A. Anaplasmosis control past, present, and future. *Ann NY Acad Sci* 2000;916:501-509.
 34. Palmer GH, Rurangirwa FR, McElwan T. Strain composition of the Ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a mammalian reservoir for tick transmission. *J Clin Microbiol* 2001;39:631-635.
 35. De la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Saliki JT, Kocan KM. Infection of tck cells and bovine erythrocytes with one genotype of the intracellular Ehrlichia *Anaplasma marginale* excludes infection with other genotypes. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:658-668.
 36. Barbet AF, Jooyoung Y, Lundgren A, McEwen BR, Blouin EF, Kocan KM. Antigenic variation of *Anaplasma marginale*: Major surface protein 2 diversity during cyclic transmission between ticks and cattle. *Infect Immun* 2001;69:3057-3066.
 37. Walravens K, Wellemans V, Weynants V, Boelaert F, de Bergeyck V, Teesson JJ *et al*. Analysis of the antigen-specific IFN-gamma producing T-cell subsets in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;84:29-41.
 38. Balde AT, Sarthou JL, Roussillon C. Acute *Plasmodium falciparum* infection is associated with increased percentages of apoptotic cells. *Immunol Lett* 1995;46:59-62.
 39. Toure-Balde A, Sarhou JL, Aribot G, Michel P, Trape JF, Rogier C *et al*. *Plasmodium falciparum* induces apoptosis in human mononuclear cells. *Infect Immun* 1996;64:744-750.
 40. Hirsch CS, Toossi Z, Vanham G, Johnson JL, Peters P, Olkwer A, *et al*. Apoptosis and T cell hyporesponsiveness in pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 1999;179:945-953.
 41. Hirsch CS, Toossi Z, Johnson JL, Luzze H, Ntambi L, Peters P *et al*. Augmentation of apoptosis and interferon- γ production at sites of active *Mycobacterium tuberculosis* infection in human tuberculosis. *J Infect Dis* 2001;183:779-788.
 42. Brown WC, Shkap V, Zhu D, McGuire TC, Tuo W, McElwan TF *et al*. 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.
 43. Palmer GH, Rurangirwa FR, Kocan KM, Brown WC. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitol Today* 1999;15:281-286.
 44. Igarashi I, Suzuki R, Waki S, Tagawa YI, Seng S, Tum Set *et al*. Roles of CD4⁺ T cells and gamma interferon in protective immunity against *Babesia microti* infection in mice. *Infect Immun* 1999;67:4143-4148.
 45. Sharma SP. Non-specific immunization against *Anaplasma* infection by using *Mycobacterium phlei*. *Indian J Vet Med* 1988;8:125-127.