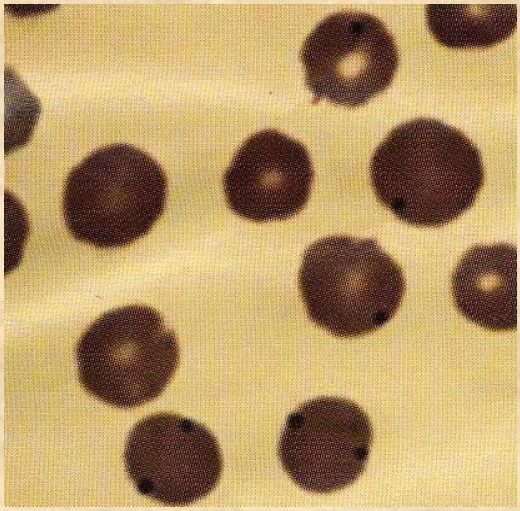
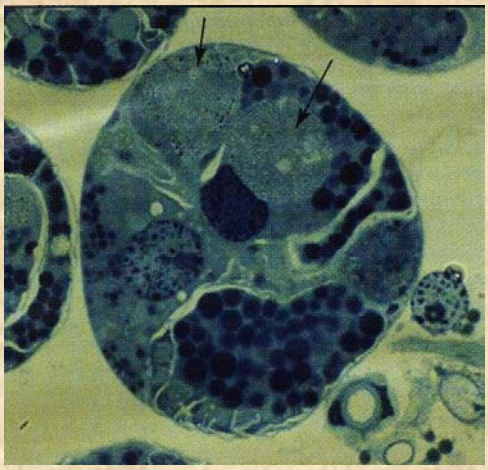
Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria



Avances en el estudio del gen msp5 de Anaplasma marginale en aislados cubanos

TESIS EN OPCIÓN DEL GRADO
DE MASTER EN MICROBIOLOGÍA VETERINARIA



Autora:
Lic. Belkis Corona González

Tutora:
Dra. Siomara Martínez Marrero,

La Habana, 2001

Págs.

RESUMEN

INTRODUCION 1

REVISION BIBLIOGRAFICA 4

1 *Anaplasma marginale* 4

1.1. Características de *A. marginale* 4

1.1.1. Clasificación taxonómica 4

1.2.2. Caracteres morfofuncionales y culturales 4

1.1.3. Biología molecular de *A. marginale* 7

1.1.4. Proteínas de los cuerpos iniciales 9

1.2. Características de la enfermedad 13

1.2.1. Transmisión 13

1.2.2. Patogenia y síntomas clínicos 15

1.3. Inmunidad y resistencia 16

1.4. Tratamiento y control 18

1.4.1. Reducción del vector de transmisión 18

1.5. Diagnóstico de la enfermedad 19

1.5.1. Identificación del agente 20

1.5.1.1. Estandar de “oro” 20

1.5.1.2. Tinción de Giemsa. 20

1.5.1.3. ELISA para detectar antígeno 21

1.5.1.4 Técnicas moleculares 21

1.5.2. Diagnóstico serológico 23

1.5.2.1 Fijación del complemento 23

1.5.2.2. Pruebas de aglutinación 24

1.5.2.3. Inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos 24

1.5.2.4. Dot-ELISA y ELISA 25

MATERIALES Y MÉTODOS 28

Experimento 1. Amplificación del gen *msp*5 de *Anaplasma marginale* en aislados de diferentes regiones geográficas de Cuba 28

Experimento 2.Clonaje, expresión y secuenciación del gen *msp*5 del aislamiento Habana de *A. marginale* 30

Experimento 3. Reconocimiento de la proteína por sueros de campo 34

Experimento 4. Estudio de la cinética de crecimiento del clon recombinante pHMSP5 y la expresión de la proteína H-MSP5 en condiciones de fermentación 35

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 37

CONCLUSIONES 53

RECOMENDACIONES 54

BIBLIOGRAFÍA 55

ANEXOS

Anaplasma marginale es una rickettsia del genogrupo II de las Ehrlichias, que infecta los eritrocitos maduros del ganado bovino provocando severas pérdidas económicas fundamentalmente en las zonas tropicales y subtropicales. La enfermedad se manifiesta con marcada anemia, disminución del peso, aborto y en ocasiones la muerte. Los animales que logran recuperarse de la fase aguda de la enfermedad permanecen persistentemente infectados con bajos niveles de parasitemia que no pueden ser detectados por los métodos tradicionales de diagnóstico. El control de la enfermedad, además de requerir de una vacuna efectiva, necesita de métodos de diagnóstico sensibles y específicos que permitan conocer la prevalencia del microorganismo en las diferentes zonas de las regiones tropicales y subtropicales, además que permitan identificar de forma segura a los animales portadores para el movimiento de ganado a zonas libres del hemoparásito.

En Cuba, en el primer semestre de 1999, las Oficinas de Medicina Veterinaria reportaron un alto porcentaje de morbiletalidad para el ganado bovino por esta enfermedad. Por ejemplo para las provincias de Matanzas y Holguín se estimó una infección del 53% y 44% respectivamente y en el sector privado de la provincia La Habana, un 100%.

En el presente trabajo de tesis nos propusimos detectar la presencia del gen *msp*5, mediante la amplificación por la PCR, en diferentes aislamientos de *A. marginale* de Cuba*;* el clonaje y secuenciación de dicho gen del aislamiento Habana, así como la expresión de la proteína H-MSP5; su reconocimiento por sueros de animales de campo y el estudio de la cinética de crecimiento del clon recombinante (pHMSP5) y expresión de la proteína H-MSP5 en condiciones de fermentación. Se demostró la presencia de dicho gen en los diferentes aislamientos estudiados, se logró el clonaje en pGEX-3X y secuenciación del gen del aislamiento Habana, así como la expresión de la proteína H-MSP5. La proteína obtenida mostró una talla de 23 kDa y un 6.5% de expresión con respecto al total de proteínas de *E. coli*. Fue reconocida por un policlonal monoespecífico, el anticuerpo monoclonal ANAF16C1 y por sueros de animales de campo. Se estudio además, la cinética de crecimiento del clon recombinante y la expresión de la proteína en condiciones de fermentación. A partir de estos resultados quedan abiertas nuevas estrategias para la utilización

de la proteína H-MSP5 recombinante, del aislamiento Habana, en un futuro juego diagnóstico para la detección de *Anaplasma marginale* en animales portadores asintomáticos de la enfermedad.

Anaplasma marginale es una rickettsia del genogrupo II de las Ehrlichias, que parasita únicamente los eritrocitos maduros del ganado bovino y causa severas pérdidas económicas fundamentalmente en las zonas tropicales y subtropicales (Palmer y col., 1999).

Este microorganismo presenta múltiple variabilidad antigénica, de morfología, virulencia, transmisibilidad por garrapatas y habilidad para inducir protección cruzada contra aislamientos heterólogos (Palmer y McElwain, 1995), existiendo polimorfismo a nivel de genoma entre los distintos aislamientos de *A. marginale* (Alleman y col., 1993).

Se han caracterizado seis proteínas de superficie de membrana de los cuerpos iniciales de este organismo, portadoras de epitopos B y T, denominadas proteínas mayoritarias de superficie (MSPs) y designadas 1a, 1b, 2, 3, 4 y 5. Estas proteínas son reconocidas por anticuerpos neutralizantes y se encuentran en una estrecha relación intermolecular en la superficie de la membrana de los cuerpos iniciales. Presentan un polimorfismo variable entre distintas cepas de *A. marginale*, desempeñando funciones importantes para el mismo. Algunas de estas proteínas inducen una protección total o parcial en animales vacunados, aunque el nivel y la uniformidad de la misma es variable (Palmer y McElwain, 1995).

Los genes que codifican para estas proteínas también se han estudiado y se ha visto que al igual que sus productos proteicos presentan un polimorfismo variable. Pueden estar representados en el genoma por una simple copia o formando parte de familias multigénicas, resultando las regiones promotoras identificadas muy parecidas a las de *E. coli* (Barbet y col., 1999).

A pesar de las cuantiosas pérdidas producidas todos los años, hasta el momento no se cuenta con un método de control eficaz contra la enfermedad, por lo que resulta de gran importancia desarrollar un inmunógeno capaz de prevenir la

infección con este patógeno. A esto se le agrega la necesidad de contar con técnicas de diagnóstico más sensibles que permitan la detección de animales portadores para ser utilizadas en el movimiento de ganado hacia zonas libres de la enfermedad, así como para conocer la prevalencia de la enfermedad en las regiones tropicales y subtropicales (Camacho y col., 2000).

Para el diagnóstico de la anaplasmosis se han utilizado innumerables técnicas dentro de las que se incluyen: microscopía óptica, esplenectomía, fijación del complemento, aglutinación en tarjeta, inmunofluorescencia indirecta, las pruebas ELISA y los métodos de diagnóstico molecular que son tomados en la actualidad como base para el movimiento internacional de ganado (World Organization for Animal Health, 1996).

El gen *msp*5 está representado en el genoma como una simple copia, altamente conservado entre todas especie de Anaplasma y todas las cepas de *A. marginale*, lo que sugiere que es esencial en el ciclo de vida del parásito. Por su parte la proteína MSP5, para la cual codifica, es de poca complejidad estructural e igualmente conservada. La proteína nativa y la recombinante muestran un epitopo conservado reconocido por el monoclonal ANAF16C1. Todo lo anterior simplifica el uso de dicho gen y de la proteína en el desarrollo de procedimientos de diagnóstico de la entidad (Visser y col., 1992).

El objetivo de nuestro trabajo de tesis fue estudiar la presencia del gen *msp*5 de *A. marginale* en aislamientos de diferentes regiones geográficas de Cuba, así como el clonaje y secuenciación del gen *msp*5 del aislamiento Habana y la expresión de la proteína recombinante H-MSP5, el reconocimiento de la misma por sueros de animales de campo y realizar los estudios de la cinética de crecimiento del clon recombinante y la expresión de la proteína en condiciones de fermentación para ser posteriormente utilizada en un ensayo de diagnóstico.

Objetivos parciales:

- Amplificación por la PCR del gen *msp*5 de *Anaplasma marginale* en aislamientos de diferentes regiones geográficas de Cuba.
- Clonaje y secuenciación de dicho gen del aislamiento Habana y expresión de la proteína H-MSP5.
- Reconocimiento de la proteína en sueros de animales de campo.
- Realizar la cinética de crecimiento del clon recombinante pHMSP5 y la expresión en condiciones de fermentación de la proteína recombinante H-MSP5.

1. *Anaplasma marginale*

1.1. Características de *Anaplasma marginale*.

1.1.1. Clasificación taxonómica.

Inicialmente *Anaplasma marginale* se consideró como un protozoo hemático. Las investigaciones ulteriores demostraron que esta entidad se clasifica dentro del orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceae, género Anaplasma. Para realizar esta clasificación se basaron en estudios de microscopia electrónica, pruebas de resistencia a algunos antibióticos (que resultaron ser negativas) y la reacción cruzada serológicamente con Eperythrozoon y Haemobartonella (Ristic y Kreier, 1984).

El análisis filogenético utilizando secuencias del rRNA 16S, ha permitido esclarecer la relación dentro de los genogrupos de las especies de Ehrlichias, situando a *Anaplasma marginale* dentro del árbol filogenético, en el genogrupo II de las Ehrlichias (Biberstein, 1999), las cuales son patógenos de animales y humanos que se transmiten por garrapatas. *A. marginale*, se encuentra estrechamente relacionada con *E. Phagocytophila*, *E. Equi*, *Ehlichia granulocítica* humana (HGE), *E. platys* y *E. bovis.* Cada uno de estos agentes persiste en sus respectivos hospederos mamíferos y se transmite dentro, y no entre las generaciones del vector biológico (Dame y col., 1992: Walker y Dumber, 1996).

Se conocen cuatro especies de Anaplasma como agentes causantes de la anaplasmosis: *A. marginale*, *A. centrale* y *A. caudatum* en ganado bovino y *A. ovis* en carnero y cabras (Ristic y Kreier, 1984), siendo *A. marginale* la única especie identificada en Cuba (Alonso y col., 1989).

1.1.2. Caracteres morfofuncionales y culturales.

Anaplasma marginale es un microorganismo sin forma definida. Se han establecido tres categorías de acuerdo a su talla: El clásico "cuerpo marginale", una forma intermedia "cuerpo inicial", y la de tamaño pequeña (Ristic y Watrach, 1963).

En los hospederos vertebrados, Anaplasma infecta a los eritrocitos maduros con la formación de una vacuola derivada de dichos eritrocitos, alrededor del organismo (Francis y col., 1979). Cada organismo tiene un diámetro de 0.55-0.85 μm y contiene los cuerpos iniciales que consisten en agregados granulares densos rodeados por una doble membrana de 40-50 μm de espesor (Kocan y col., 1978). El microorganismo se replica dentro del eritrocito por fisión binaria para formar hasta ocho organismos individuales dentro de una vacuola simple (Ristic y Watrach, 1963). Posteriormente, los organismos de *Anaplasma* salen del eritrocito, utilizando mecanismos aparentemente no líticos e infectan los eritrocitos aledaños (Erp y Fahrney, 1975).

El cuerpo inicial se encuentra dentro de los glóbulos rojos en número variable. Están formados por material fibrilar y varios gránulos electrodensos que contienen ADN, ARN y hierro orgánico, rodeados por una doble membrana. Estos cuerpos iniciales, a la vez, son limitados por una vesícula intracitoplasmática, constituida por una sola membrana, y que también posee material fibrilar, nombrada cuerpo de inclusión (Ristic y Kreier, 1984).

> Este hemoparásito se caracteriza además, por producir catalasas, no producir pigmentos, no formar esporas u otros estados de resistencia. Es sensible a la tetraciclina e insensible a las penicilinas, sulfonamidas, estreptomicina y arsenicales. Su infectividad puede ser destruida al exponerlo a 60°C, al menos por 50 minutos, a rayos X o a sonicación a 35°C por 90 minutos. (Ristic y Kreier, 1984).

Este hemoparásito desarrolla un complejo ciclo de vida en el vector. Se han encontrado organismos morfológicamente diferentes en las células epiteliales del intestino medio de *Boophilus microplus*, lo que sugiere fases secuenciales de

desarrollo de *Anaplasma marginale* en su hospedero invertebrado (Ribeiro y Passos, 1996). Se han descrito organismos con modificaciones en la talla y forma y con respecto a su infectividad para el ganado (Kocan y col., 1998; Ribeiro y Lima, 1995). La infección de múltiples tejidos en las garrapatas puede contribuir a que este parásito persista en el vector invertebrado macho infectado intraestadialmente (Ge y col., 1996).

A. marginale invade los eritrocitos maduros y se multiplica por fisión binaria, proceso durante el cual se forman los cuerpos de inclusión, donde podemos encontrar hasta 8 organismos individuales dentro de una vacuola simple (Palmer y McGuire, 1984). Esto sucede con frecuencia en las fases aguda y crónica de la infección, representando solo un período en el ciclo de desarrollo de los cuerpos iniciales (Ristic y Kreier, 1984).

Se han detectado y aislado en Brasil, cepas de *A. marginale* con un apéndice de inclusión. El mismo presenta estriaciones longitudinales electrodensas, y no se origina directamente del cuerpo de la rickettsia, sino de un complejo electrodenso localizado en la unión entre la membrana de inclusión y el apéndice. Este apéndice permanece en las células huéspedes, incluso aún después que los Anaplasmas abandonan los glóbulos rojos (Ribeiro y Passos, 1996; Stich y col., 1997).

Se han reportado varias formas de cultivo de *Anaplasma marginale*, pero por cortos períodos de tiempo. Se logró propagar el parásito en un cultivo de células de una línea celular derivada de embriones de garrapata *Dermacentor variabilis*, pero para poder mantener el crecimiento se necesitaron realizar pases continuos, pues este microorganismo requiere para su propagación de células hospederas con una alta actividad de crecimiento y multiplicación y un medio con suero fetal bovino (Hidalgo y col., 1989).

Recientemente se ha logrado propagar continuamente esta rickettsia en una línea celular derivada de *Ixodes scapuralis Say*, usando como inóculo sangre de bovino infectado. Ha sido mantenida por pases seriados durante cuatro años manteniendo su infectividad en el ganado y su estabilidad antigénica, criopreservada en nitrógeno líquido (Munderloh y col.,1996).

Un segundo aislamiento de *A. marginale* derivado de vacas naturalmente infectadas en Oklahoma, se propagó en la misma línea celular de garrapata, lo que

tiene potencialidad para ser utilizado como antígeno para el desarrollo de una vacuna mejorada contra la anaplasmosis en los Estados Unidos (Blowin y col., 1999).

1.1.3. Biología Molecular de *A. marginale*.

A. marginale presenta un ADN circular de doble cadena, cuya talla total oscila entre 1200 y 1260 pb, lo cual se determinó por análisis de restricción, realizados al genoma de la cepa Florida con las enzimas *Sfi* I y *Pac* I. El análisis de los productos de las digestiones en electroforesis de campo pulsante dio como resultado la existencia de un considerable polimorfismo entre las distintas cepas, aunque la talla total del genoma es constante, con un contenido de G+C de 56 %, lo cual fue determinado por análisis espectral (Alleman y col., 1993).

En este parásito se han descrito seis genes (*msp*1α, *msp*1β, *msp*2, *msp*3, *msp*4 y *msp*5), los cuales codifican para 6 proteínas principales de membrana de superficie de los cuerpos iniciales, muy importantes ya que son blancos de la respuesta inmune del hospedero contra el patógeno (Palmer y McGuire, 1984; Tebele y McGuire, 1991).

El gen *msp1*α codifica para la proteína de membrana MSP1a. Se encuentra representado en el genoma por una simple copia y ubicado en el mismo locus cromosomal en todos los aislamientos. Posee una gran similitud con los genes de *E. coli*, en cuanto a las secuencias consenso de la región promotora. No se ha detectado una secuencia con similitud a la de Shine-Delgarno de *E. coli*, aunque la proteína recombinante MSP1a se expresa en cantidades apreciables en *E. coli* (Palmer y McGuire, 1990). Este gen presenta un alto polimorfismo de talla entre los aislamientos de distintas regiones geográficas, debido a que posee un número de secuencias oligonucleotídicas repetidas en tandem (Oberle y col., 1988; Allred y col., 1990; Palmer y McGuire, 1990). Estas secuencias se encuentran repetidas en el gen 2, 4, 6 y 8 veces en los aislamientos Virginia, Washington, Idaho y Florida respectivamente, de ahí el alto polimorfismo de talla observado (Palmer y McGuire, 1990). El gen presenta además regiones con secuencias conocidas que muestran un grado de homología variable entre distintas cepas (Barbet y col., 1987; Oberle y col., 1988; Palmer y McGuire, 1990).

Por su parte el gen *msp*1β está formado por una familia de multigenes, compuesta al menos por cuatro copias. La secuencia de una copia de este gen expresada, mostró que este gen se expresa en *E. coli* bajo el control de los promotores de *A. marginale*, el cual presenta similitud con la secuencia consenso de *E. coli*. Este gen también presenta dominios de secuencias repetidas, al igual que *msp*1α, aunque son de menor extensión. Por ensayos de RPLP (Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción), se demostró que esta familia de genes es polimórfica entre aislados de regiones geográficamente diferentes (Barbet y Allred, 1991). En estos momentos se sabe que todas las copias del gen son capaces de expresarse y que codifican para proteínas estructuralmente únicas (Camacho y col., 2000).

El gen *msp*2 esta formado por una familia multigénica. Presenta una gran variabilidad fundamentalmente en su extremo 5' (Palmer y col., 1994). Esta familia polimórfica codifica para moléculas proteicas estructuralmente distintas, las cuales presentan epitopes B diferentes, en las regiones con alto polimorfismo de aminoácidos. Durante la fase aguda de la enfermedad hay transcripción de diferentes copias de este gen paralelamente (Eid y col., 1996).

El gen *msp*3 forma parte también de una familia multigénica, cuyas copias se encuentran ampliamente distribuidas a través del cromosoma (Alleman y col., 1997). Codifica para una proteína de 86 kDa, que es considerada un antígeno inmunodominante (McGuire y col., 1991, Palmer y col., 1986). Se ha demostrado polimorfismo y variación antigénica de MSP3 entre cepas. De manera interesante, se encontró además una homología significativa con la secuencia de aminoácidos de la proteína MSP2.

El gen *msp*4 se encuentra en una simple copia de 800 pb. Codifica para una proteína de 31 kDa (MSP4) que se encuentra conservada entre diferentes cepas (Oberle y col., 1988, Palmer y col., 1988). MSP4 expresa epitopos conservados entre diferentes cepas de *A. marginale* y también está presente en *A. centrale*. Un rasgo peculiar de este gen, es que la secuencia que codifica para la región 3' contiene repeticiones imperfectas invertidas que gustan de exhibir abundantes estructuras secundarias (Oberle y col., 1993).

El gen *msp*5 presenta una talla de 633 pb, estando representado en el genoma como una simple copia, altamente conservada entre cepas de *A. marginale* (Visser

y col., 1992). La detección de la proteína MSP5 en el ADN de todas las especies de Anaplasma, incluyendo *A. ovis* sugiere que este gen es esencial en el ciclo de vida del parásito. Se han identificado elementos de control procariontes en la secuencia de este gen, los cuales son funcionales en la bacteria *E. coli.*. Todas las características señaladas anteriormente simplifican el uso del mismo para el desarrollo de procedimientos de diagnóstico molecular (Visser y col., 1992).

1.1.4. Proteínas de los cuerpos iniciales.

Como se ha mencionado anteriormente, se han caracterizado seis proteínas principales de membrana de los cuerpos iniciales (MSPs), denominadas: MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 (Palmer y McGuire, 1984) y MSP5 (Tebele y McGuire, 1991).

En general estas proteínas presentan un polimorfismo variable entre distintos aislamientos de *A. marginale*. Se encuentran en una estrecha relación intermolecular en la superficie de membrana (Vidotto y col., 1994) y además pueden contener estructuras helicoidales con segmentos transmembrana, dominios para la constitución de complejos multiméricos y regiones que funcionan como secuencia señal (Palmer y McGuire, 1995; Barbet y Allred, 1991; Tebele y McGuire, 1991; Alleman y Barbet, 1996). La inmunización del ganado con membranas de *A. marginale* que contienen las proteínas de superficie induce inmunidad protectora contra la enfermedad clínica (Tebele y McGuire, 1991).

La proteína MSP1 fue originalmente descrita como AmF105 (Palmer y McGuire, 1984) y está compuesta por dos subunidades MSP1a (105 kDa) y MSP1b (100 kDa), unidas por enlace disulfuro. Se ha demostrado que el complejo y las dos subunidades separadas, median la adherencia a los eritrocitos bovinos (McGuire y col., 1984), esto sugiere que MSP1a y MSP1b sirven como adhesinas y se podrían requerir para la invasión de los eritrocitos, ya que anticuerpos específicos para MSP1 bloquean la unión de *A. marginale* a los eritrocitos. Además estos anticuerpos opsonizan los organismos vivos para la fagocitosis de los macrófagos (Cantor y col., 1993). Por otra parte la inmunización del ganado bovino con la proteína MSP1 nativa confiere un 100% de protección contra la rickettsemia aguda y la enfermedad (Palmer y col., 1986; Palmer y col., 1989).

MSP1a es codificada por un gen unicopia con polimorfismo de talla entre cepas (Oberle y col., 1988; Allred y col., 1990). La secuencia de aminoácidos muestra la

presencia de números variables de repetidos en tandems de 28 a 29 aminoácidos. Sin embargo, a pesar del polimorfismo se encontró un epitopo B, compuesto de seis aminoácidos contenido dentro de los repetidos de 29 mer y que está altamente conservado entre las diferentes cepas (McGuire y col., 1984; Allred y col., 1990). De manera importante este epitope se encuentra presente en los organismos en el 100% de los eritrocitos infectados (McGuire y col. , 1984). Se plantea que la respuesta contra MSP1a pudiera ser responsable de al menos una parte de la protección cruzada entre cepas (Palmer y col., 1999).

MSP1b es una proteína con un peso molecular aproximado de 100 kDa y está codificada por una familia de multigenes, compuesta por lo menos de cuatro copias (Barbet y Allred, 1991).

La inmunización del ganado bovino con la proteína MSP1 nativa purificada confiere protección contra la rickettsemia aguda y la enfermedad (Palmer y col., 1986; Palmer y col., 1989). Sin embargo a diferencia de estos resultados, cuando se utiliza la proteína nativa, la inmunización con las proteínas recombinantes MSP1a, MSP1b o la combinación de ambas, no induce protección significativa (Palmer y McElwain, 1995). La MSP1b recombinante utilizada en los ensayos fallidos de inmunización se derivó de una copia del gen, el único miembro de la familia secuenciado hasta esta fecha (Barbet y Allred, 1991). Actualmente se sabe que existe coexpresión de al menos dos copias diferentes del gen, en la fase aguda de la anaplasmosis y la expresión de proteínas MSP1b con epitopes B variables (Camacho y col., 2000).

La proteína MSP2 está presente en la membrana como un tetrámero adyacente a las proteínas MSP1, MSP3, MSP4. Sus subunidades están unidas mediante puentes disulfuro, es relativamente inmunodominante y posee un peso molecular de 36 kDa (Palmer y McElwain, 1995). Esta proteína es altamente polimórfica, con presencia de epítopes conservados (Palmer y col., 1994), aunque presenta epitopos B diferentes, en las regiones polimórficas. Se ha demostrado la expresión de diferentes variantes antigénicas de esta proteína, durante la rickettsemia aguda (Eid y col., 1996).

MSP2 es una de las proteínas de superficie que induce protección parcial en retos con cepas homólogas y heterólogas de *A. marginale.* Está presente también en *A.*

centrale, una especie menos virulenta que induce protección contra *A. marginale* (Palmer y col., 1988a; Shkap y col., 1991) y en los distintos estadios morfológicos de *A. marginale* en las garrapatas infectadas de la especie *Dermacentor andersonii* (Palmer y col., 1985). Además se ha demostrado que MSP2 puede funcionar como adhesina en la unión a eritrocitos (McGarey y Allred, 1994). Por análisis de southern–blot y electroforesis de campo pulsante, se demostró la presencia de múltiples copias del gen *msp*2, que están ampliamente distribuidas a lo largo del cromosoma de tres cepas estudiadas y constituyen al menos el 1% del genoma (Palmer y col., 1994).

La infección persistente de *A. marginale* se caracteriza por ciclos subsecuentes de rickettsemia, caracterizados cada uno por el incremento logarítmico en la parasitemia, seguido por un decremento brusco de ésta (Ericks y col., 1989, Kieser y col., 1990; French y col., 1998). Cada ciclo refleja la emergencia de la expresión de transcriptos únicos de *A. marginale*, que codifican para variantes estructurales de la proteína de superficie MSP2 (McGarey y Allred, 1994). Por lo tanto, el fenotipo estructural y antigénico de la población de *A. marginale* es diverso y continuamente cambia durante la rikettsemia persistente.

La MSP3 está codificada por una familia multicopia, es también inmunodominante durante las infecciones natural y experimental. Tiene un peso molecular de 86 kDa y se puede encontrar además en *A. centrale* y *A. ovis* (Palmer y McElwain, 1995). Es estructuralmente y antigénicamente diferente entre cepas de *A. marginale*. Presenta un polimorfismo de talla entre aislamientos geográficamente diferentes (Alleman y col., 1997).

Por análisis de southern blot del ADN genómico, se identificaron múltiples copias relacionadas del gen, distribuidas en todo el cromosoma de tres cepas diferentes de *A. marginale* (Alleman y col., 1997). El análisis de la secuencia de tres genes, reveló regiones conservadas y regiones variables dentro del marco abierto de lectura del gen. Se encontró además, una homología significativa con la secuencia de aminoácidos de la proteína MSP2.

La proteína MSP4 de 31 kDa es altamente conservada entre los distintos aislamientos de *A. centrale* y *A. marginale*. Esta proteína contiene bloques de aminoácidos relacionados con la proteína MSP2 (Alleman y col., 1997). Sus

epitopos conservados son de gran importancia tanto para el diagnóstico como para el desarrollo de una vacuna (Tebele y McGuire, 1991; Oberle y col., 1993). Se ha comprobado que funciona como adhesina al igual que la MSP2 y las subunidades del complejo MSP1 (McGarey y col., 1994) y que tanto la nativa como la recombinante protegen a animales inmunizados en retos con cepas homólogas.

Otra de las proteínas, con una talla conservada entre todos sus aislamientos y presente en todas las especies conocidas de Anaplasma es la MSP5. Tiene un peso molecular de 19 kDa, es de poca complejidad estructural y muy importante en el ciclo de vida celular, aunque se desconoce exactamente su función. Presenta epitopes altamente conservados y se encuentra formando un dímero en la membrana, cuyas subunidades se unen por puentes disulfuros. La proteína nativa y una recombinante fusionada a maltosa muestran un epitopo reconocido por el anticuerpo monoclonal AnaF16C1 (Visser y col., 1992). MSP5 se expresa en las glándulas salivales de las garrapatas infectadas (Knowles y col., 1996), pero sus funciones se desconocen.

La conservación de la talla molecular de MSP5 entre cepas, tiene un contraste marcado con el polimorfismo observado para otras MSPs de *Anaplasma marginale*, principalmente MSP1a (Allred y col., 1990) y MSP2 (Oberle y col., 1988).

1.2. Características de la enfermedad.

1.2.1. Transmisión

El estudio de la transmisión de *A. marginale* es de fundamental importancia para establecer un control efectivo de la enfermedad. Son amplias y muy variadas las formas en que puede transmitirse el parásito y dependen de la presencia de vectores (biológicos y mecánicos), la existencia de animales susceptibles y de condiciones ecológicas favorables (Palmer y McElwain, 1995).

Esta enfermedad puede ser transmitida por artrópodos hematófagos tales como algunos géneros de garrapatas (Yeruhan y Braverman, 1981), principalmente *Boophilus* sp. y *Dermacentor* sp (Potgieter y col., 1993; Zaugg y col., 1986 y Kocan y col., 1986), moscas de establo, *Stomoxys calcitrans* (Yeruham y Braverman, 1981) y mosquitos *Siphona* sp. y *Psophona* sp.; tábanos, *Tábanus* sp (Ristic, 1968) y la forma iatrogénica que también juega un papel muy importante en

la diseminación de la enfermedad a través de material quirúrgico contaminado. La propagación de la enfermedad por los insectos, es el factor más importante en áreas libres de garrapatas. Este agente etiológico infecta a los eritrocitos de los animales susceptibles, causando anemia severa y múltiples disturbios fisiológicos (Ristic, 1980).

Es necesario identificar factores que influyen en la transmisión y desarrollo de este patógeno en las garrapatas para facilitar el mejoramiento de estrategias para el control de la enfermedad (Walade y col., 1996). La transmisión se ha logrado fundamentalmente por transferencia de garrapatas infectadas y puede ocurrir de forma intraestadial y transestadial, y la macho juega un papel relevante en este proceso (Zaugg y col., 1986).

En cuanto a la existencia de animales susceptibles se han informado infecciones subclínicas en búfalos de agua, ovinos y caprinos. En bisontes se ha observado parasitemia moderada con respuesta a anticuerpos específicos, demostrándose la secuencia de infección bovino-bisonte-bovino (Cossio y col., 1997; Chitravel y col., 1998). La rickettsia se detectó en la sangre de alces (*Cervus elaphus*) infectados, pero no se notó signos clínicos de la enfermedad (Zaugg y col., 1996, García y col., 1998).

Todo el ganado es potencialmente susceptible a la infección con *Anaplasma marginale*; aunque ciertas razas desarrollan resistencia a las garrapatas, induciendo un decremento en la transmisión. Los portadores crónicos asintomáticos y otros animales resistentes son responsables también de preservar el agente etiológico en la naturaleza (Blood y col., 1983).

El riesgo de transmisión de la anaplasmosis, coincide con las estaciones del año de mayor actividad de los artrópodos (Zaugg, 1990).

Las vías más importantes de transmisión de la enfermedad son: la mecánica en la que se introducen directamente los eritrocitos infectados (ya sea por inoculación natural a través de picaduras de artrópodos hematófagos parasitados o artificialmente con objetos punzantes contaminados) (Richey, 1981) y la transmisión vertical de tipo placenta-feto, cuando la madre sufre anaplasmosis aguda (Zaugg, 1990).

En los portadores vertebrados, el Anaplasma invade los eritrocitos maduros con la formación de una vacuola, derivada de estos, alrededor de los microorganismos (Francis y col., 1979). Se multiplica y luego, nuevos organismos salen del glóbulo rojo, utilizando mecanismos hasta ahora desconocidos pero aparentemente no líticos (probablemente exocitosis) e infectan los eritrocitos aledaños. Después que el parásito entra al huésped bovino el número de células rojas infectadas se duplica entre las 24 y 48 horas siguientes. La infección puede detectarse por microscopía entre 20 y 40 días después de la transmisión, dependiendo del número de microorganismos transmitidos y de la virulencia del aislado (Richey, 1981).

1.2.2. Patogenia y síntomas clínicos.

Un animal infectado no presenta síntomas clínicos hasta que más de un 15% de los eritrocitos no hayan sido parasitados. En ese momento la parasitemia comienza a incrementarse geométricamente y posteriormente los eritrocitos infectados se eliminan del torrente circulatorio mediante fagocitosis por las células del retículo endotelial del bazo, hígado y nódulos linfáticos; induciéndose el desarrollo de una fase de inflamación aguda. La subsecuente fiebre, temperaturas de hasta 41°C, es el primer síntoma clínico de la enfermedad (Richey y Palmer, 1990). La respuesta febril es seguida de anorexia, depresión y debilidad muscular, acompañada de una acidosis severa. La destrucción continuada de eritrocitos (sin liberación de hemoglobina) trae consigo palidez mucosal, sangre acuosa y posteriormente ictericia con valores de bilirrubina total de 2.0-7.0 mg/dL, pueden aparecer anticuerpos antieritrocitarios, lo que puede exacerbar la anemia. Luego de esta fase aguda se presenta la hiperaguda, donde ocurre una pérdida dramática de peso, aborto de vacas preñadas, fallo cardiopulmonar y muerte (Alderink y Dietrich, 1981). Estas últimas consecuencias ocurren con frecuencia al cabo de las 24 a 36 horas del pico de parasitemia, donde hay infectados hasta un 90% de los eritrocitos (Richey y Palmer, 1990).

Los animales que sobreviven a esta fase disminuyen drásticamente la parasitemia y desarrollan una marcada respuesta regenerativa a la anemia. No hay evidencias de que exista una supresión al nivel de médula ósea. Los parámetros hematológicos retornan gradualmente a valores normales luego de muchas semanas (Swift y Thom, 1983).

El ganado recuperado puede permanecer infectado crónicamente con un bajo nivel de parasitemia (Swift y Thom, 1983) que fluctúan por períodos largos de tiempo (Eriks y col., 1989).

> Las huellas postmortem que deja esta enfermedad son atribuidas fundamentalmente a la anemia hemolítica severa. Todos los tejidos están pálidos y la sangre es tenue y acuosa. El bazo frecuentemente está agrandado y se torna de color rojo marrón y son comunes la hepatomegalia y un engrandecimiento de la vesícula biliar, con bilis oscura. Si el animal ha muerto en estadios tardíos de la infección aguda se puede presentar el íctero (Richey y Palmer, 1990).

1.3. Inmunidad y resistencia.

El ganado puede contraer la enfermedad a cualquier edad, sin embargo la mortalidad y severidad aumentan con la misma. Los terneros de menos de 6 meses exhiben una resistencia natural, pues aún cuando se infectan raramente exhiben los signos clínicos (Alonso y Blandino, 1988). El ganado entre 6 meses y tres años comienza a incrementar el padecimiento y ocurren más muertes con el avance de la edad (Richey y Palmer, 1990).

Los anaplasmas inducen en el organismo una respuesta humoral y una mediada por células, sin embargo los anticuerpos al parecer juegan un papel menos importante. Los animales infectados desarrollan anticuerpos, fundamentalmente del tipo IgG e IgM, contra *A. marginale* y exhiben durante las últimas etapas de la infección aguda una respuesta mediada por células, en la que aparecen los macrófagos activados segregando interferón gamma (IFN) el cual estimula fuertemente la proliferación de linfocitos de sangre periférica. (Galede y col., 1996). La respuesta celular se correlaciona parcialmente con el desarrollo de la inmunidad. En contraste, la respuesta humoral se correlaciona pobremente con el desarrollo de resistencia. Sin embargo se ha demostrado que existen antígenos claves de *A. marginale* que estimulan la producción de anticuerpos neutralizantes demostrando que la respuesta humoral juega un papel muy importante en el desarrollo de la inmunidad contra la anaplasmosis (Richey y Palmer, 1990).

El estudio de los mecanismos inmunes protectores contra *A. marginale* se han focalizado fundamentalmente en la fase aguda de la enfermedad. Palmer y col., 1999 plantearon la hipótesis de que la eliminación de *A. marginale* requiere de la

inducción de niveles altos de anticuerpos de la subclase IgG2 dirigidos contra los epitopos B de la superficie del microorganismo. Así mismo, sugirieron la activación de los macrófagos mediada por células T CD4+, que llevan a la opsonización, fagocitosis y destrucción del patógeno (Bock y col., 1997).

El ganado que se recupera de una infección aguda y que por tanto ha tenido una infección preinmunitiva por un aislamiento medianamente virulento de *A. marginale* o *A. centrale* desarrolla resistencia a una reinfección con la misma cepa. En algunos casos el ganado recuperado queda desprotegido o parcialmente protegido contra aislamientos heterólogos (Richey y Palmer, 1990).

Factores solubles de células mononucleares (linfocitos y monocitos) de la sangre de ganado infectado reducen la proporción de eritrocitos que contienen organismos viables "*in vitro*", indicando que puede ocurrir un mecanismo independiente de anticuerpos para el control de la rickettsemia durante la anaplasmosis aguda (Wyatt y col., 1996).

A pesar de que ante la invasión de este parásito median ambas respuestas, el sistema inmune del hospedero es incapaz de eliminar completamente la infección en la fase crónica de la enfermedad, esto podría deberse a la variabilidad antigénica de este microorganismo. Se ha visto que tanto en la fase aguda como en la crónica hay un comportamiento de aumento y disminución de los niveles de eritrocitos infectados, lo cual sugiere que participan los mismos mecanismos de respuesta primaria del hospedero para controlar ambos ciclos de rickettsemia (Kieser y col., 1990).

1.4. Tratamiento y control.

Hasta la fecha no se cuenta con un procedimiento efectivo para el control de la anaplasmosis en muchas áreas, a pesar del incremento de los portadores, animales susceptibles, vectores de transmisión y de las cuantiosas pérdidas económicas que provoca (Palmer y col., 1999). Dentro de las formas para combatir la enfermedad están el control del vector, la eliminación del estado de portador y la vacunación del ganado susceptible (Losos,, 1986). En nuestro país el control de la anaplasmosis se ha llevado a cabo fundamentalmente mediante tratamiento terapéutico, uso de insecticidas y acaricidas.

Gugliemone y col., 1996, reportaron la eficacia de la enrofloxacina para la prevención de la anaplasmosis clínica y sugieren que esta droga puede ser útil en las estrategias de control de la anaplasmosis.

1.4.1. Reducción del vector de transmisión.

Como hemos mencionado anteriormente entre los vectores de transmisión de la enfermedad de mayor repercusión se encuentran los artrópodos hematófagos y los instrumentos quirúrgicos contaminados (Ristic, 1980; Richey, 1981) por lo que cualquier estrategia que los reduzca, también reducirá sustancialmente el número de casos de anaplasmosis.

Entre las medidas que se han tomado con este objetivo tenemos la utilización de acaricidas e insecticidas y la esterelización de los instrumentos quirúrgicos y para descornar, usados en distintos tratamientos que se le dan a los animales. El empleo de los agentes químicos mencionados ayuda a eliminar a los vectores transmisores más importantes, pero no resulta muy ventajoso, pues requiere de premisas como evitar la existencia de ganado extraviado y de animales salvajes hospederos de las garrapatas. Además resulta poco efectivo porque los ácaros pueden desarrollar resistencia a los acaricidas (Lawrence y col., 1980). Estos agentes químicos son costosos, provocan contaminación ambiental y en los productos cárnicos y lácteos, haciéndolos también poco aceptables (Vilenberg, 1990).

Recientemente se obtuvo una vacuna recombinante contra la garrapata *Boophilus microplus*; lo que reduce la población de estos artrópodos (Rodríguez, 1996) y como consecuencia contribuye en la lucha contra esta enfermedad.

1.5. Diagnóstico de la enfermedad.

> El control de la anaplasmosis, además de requerir de una vacuna efectiva, necesita de métodos de diagnóstico que permitan conocer la prevalencia del microorganismo en las diferentes zonas de los países tropicales y subtropicales, además que permitan identificar de forma segura a los animales portadores para el movimiento de animales a zonas libres del hemoparásito (Camacho y col., 2000).

El diagnóstico diferencial de fiebre, anemia hemolítica aguda e icterus en el ganado adulto incluye babesiosis, eperytrozoonosis, theileriosis, leptospirosis, hemoglobinuria bacilar, hemoglobinuria postparto, toxicidad por plantas y antrax. La

ausencia de hemoglobinuria en caso de anemia aguda, apoyada por la identificación positiva del eritrocito parasitado, diferencia estas otras enfermedades hemolíticas de la anaplasmosis clínica (Richey y Palmer, 1990).

El diagnóstico de la anaplasmosis se ha dificultado debido fundamentalmente a lo difícil de detectar los portadores ya que no hay síntomas clínicos que lo diferencien de los bovinos no infectados y los cuerpos de inclusión dentro de los glóbulos rojos no son lo suficientemente numerosos como para ser detectados por los métodos tradicionales (Aboytes-Torres y col., 1990; Masika y col., 1997).

1.5.1. Identificación del agente

La detección del organismo o sus antígenos distingue a los animales con infección aguda, de aquellos que tengan anticuerpos provenientes de una infección anterior o de una vacunación, además de tener la ventaja de poder cuantificar la parasitemia. Entre los métodos utilizados podemos citar la subinoculación de eritrocitos infectados en animales esplenectomizados, la tinción de Giemsa a los frotis de sangre, ELISA que detecta antígeno y las técnicas moleculares como hibridación de ácidos nucleicos y la PCR.

1.5.1.1. Estandar de "oro"

Para la detección de animales infectados persistentemente el método más empleado es el estandar "de oro", que consiste en la subinoculación de eritrocitos infectados con *A. marginale*, a animales susceptibles esplenectomizados. Sin embargo, este procedimiento no es práctico en las pruebas de rutina (Luther y col., 1980) por la manipulación quirúrgica que conlleva y proporciona poca información sobre los niveles de parasitemia. (Visser y Ambrosio, 1987).

1.5.1.2. Tinción de Giemsa

Entre otras técnicas utilizadas para detectar el organismo se incluye la tinción de Giemsa a los frotis de sangre, sin embargo cuando el animal está en la fase crónica o en el estadio de portador no expresa un elevado nivel de parasitemia como para ser detectado por la tinción (Trueblood y Palmer, 1998).

La tinción con Giemsa es un método confiable, barato y capaz de detectar niveles de parasitemia de 0.1 a 0.2% (Eriks y col., 1989); aunque resulta tedioso, no apropiado para un gran número de muestras e incapaz de discernir con facilidad cuando el eritrocito ha sido invadido por *Anaplasma marginale* o por *Anaplasma centrale* (Visser y Ambrosio, 1987).

La tinción de anticuerpos puede ser utilizada como una técnica de tinción alternativa. Su mejor aplicación es para detectar Anaplasma en muestras de sangre tomadas post-mortem y ha mostrado ser más sensible que la tinción con Giemsa para este propósito (Johnston y col., 1980).

1.5.1.3. ELISA para detectar antígeno

Esta técnica se desarrolló en el Laboratorio Internacional para la Investigación de enfermedades de animales en Kenya, y en la Universidad de Washington, en los Estados Unidos, mostrando alta sensibilidad y especificidad, además de poder ser diseñada de diferentes maneras (Harlow y Lane, 1988).

Se desarrolló una prueba ELISA para detectar antígeno, utilizando anticuerpos monoclonales para epitopos conservados de la proteína de superficie MSP1, que logró discriminar entre anaplasmosis y otras enfermedades hemoparasíticas clínicamente similares, sin embargo la sensibilidad de este ensayo no fue mayor de 0.01 (1,1% de parasitemia), por lo que la prueba no resultó idónea para la detección de portadores (Trueblood y col., 1991).

1.5.1.4. Técnicas moleculares

Las sondas de ácidos nucleicos, las cuales hibridizan solamente con su secuencia complementaria, brinda una prueba sensible y específica para el diagnóstico (Engleber y col., 1984). Además la intensidad de la señal de hibridación obtenida se correlaciona con el número de parásitos, dando información del nivel de parasitemia. (Barbet y col., 1986; Wirth y col., 1986).

En el diagnóstico de *A. marginale* se han utilizado sondas de ADN genómico (Ambrosio y Potgieter, 1987) y recombinantes basadas en ADN (Visser y Ambrosio, 1987; Goff y col., 1988) o ARN (Eriks y col., 1989) pero en ocasiones la limitada sensibilidad de la sonda prohibe la detección de portadores sanos con muy bajo nivel de parasitemia (Shompole y col., 1989).

Con una sonda de ARNm derivada del gen *msp*1α se logró mejorar la sensibilidad detectándose niveles de parasitemia entre 0.0025 y 0.000025% en los portadores sanos. Esto hace que la prueba sea 4000 veces más sensible que la microscopia óptica, además de que es capaz de detectar la infección en estadios tempranos, lo que resulta de gran importancia para evitar las pérdidas que ocasiona esta enfermedad (Eriks y col. , 1989).

La sensibilidad de este ensayo resultó útil para la detección de niveles de infección en garrapatas y para la identificación de ganado persistentemente infectado, además de determinar la prevalencia e incidencia de garrapatas infectadas en áreas enzoóticas. El uso de esta sonda ayuda a las estrategias de control racional de la garrapata para ser combinado con la vacunación para reducir los daños de la enfermedad (Goff y col., 1988).

Más recientemente, Kocan y col., 1998 desarrollaron una sonda de ADN no radioactivo para detectar *A. marginale* en ganado y garrapata mostrando igual sensibilidad y especificidad que las sondas radioactivas, además de poder ser utilizada en la hibridación " *in situ* " (Ge y col., 1997).

La sensibilidad y especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) resultan de gran valor para la identificación de patógenos de vectores artrópodos. Este método ha detectado *Rickettsia Typhi* y *Borrelia burgdorferi* en artrópodos, además de ser utilizado para la identificación de garrapatas infectadas con el aislamiento Virginia de *Anaplasma marginale*, usando cebadores diseñados a partir de la secuencia nucleotídica del gen *msp*1β del aislamiento Florida. Puede ser utilizado para estudios epizootiológicos de garrapatas de campo, en la cual la infección puede ser difícil de detectar por otros métodos. (Stich y col., 1991; Stich y col., 1993).

La infección persistente de *A. marginale* en ovejas fue caracterizada por Palmer y col., 1998, utilizando la PCR (gen *msp*5), observándose un patrón de persistencia similar al del ganado bovino. Figueroa y col., 1993 desarrollaron una PCR múltiple para la detección de *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* a partir de sangre de bovino con buenos resultados.

Recientemente, Echaide y col., 1998, optimizaron una PCR doble, "nested", (nPCR) acoplado con análisis de secuencia e hibridación para identificar el gen *msp*5 de *A. marginale*, siendo capaz de detectar hasta 30 eritrocitos infectados por mL de sangre, lo cual la hace de 10-100 veces más sensible que las PCR cuantitativas previamente descritas, sondas de ARN y ensayos de hibridación Eriks y col., 1989; French y col., 1998; Gale y col., 1996; Ge y col., 1996). La nPCR unida con la hibridación resulta un método altamente sensible y específico para detectar animales infectados con *A. marginale*.

1.5.2. Diagnóstico serológico.

El diagnóstico serológico incluye pruebas como fijación del complemento, aglutinación en tubos capilares, aglutinación rápida en tarjeta, ensayos de

inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos (IFI), y las pruebas Dot-ELISA y ELISA.

1.5.2.1. Fijación del complemento

Esta prueba se realiza utilizando el proceso de fijación del complemento estandar. El antígeno consiste de cuerpos de Anaplasma que han sido separados del eritrocito por lisis (Avon, 1958), aunque se utiliza también una técnica que requiere solo pequeñas cantidades de los reactivos (Avon, 1974)

La fijación del complemento era uno de los métodos más comúnmente utilizados para detectar animales infectados con *A. marginale*, en el campo. A pesar de que esta técnica ha sido utilizada por muchos años existen evidencias de que le falta sensibilidad y tiene errores al detectar una gran proporción de animales portadores por su limitada habilidad para detectar bajos niveles de anticuerpos (González y col., 1978).

Esta técnica puede ser utilizada como una prueba de scrining pero no para los programas de erradicación, ya que muchos animales infectados pueden ser diagnosticados como negativos. Existen otras desventajas entre las que se encuentran la complejidad y laboriosidad que requieren y la baja especificidad y sensibilidad, sobre todo en países donde hay presentes enfermedades hemoprotozoarias (Palmer y col., 1986).

1.5.2.2. Pruebas de aglutinación

Se han descrito dos test de aglutinación: la aglutinación en tubos capilares y la aglutinación rápida en tarjeta (Amerault y Roby, 1968). En ambos casos el resultado es leído como positivo o negativo, pero no determina títulos de anticuerpo. Este último puede llegar a rendir un 2% de falsos positivos y 16% de falsos negativos en un estudio controlado.

Esta técnica puede ser desarrollada en el laboratorio o en el campo, pero como se dijo anteriormente, existe un gran problema con las reacciones no específicas (Amerault y col., 1972).

1.5.2.3. Inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos (IFI)

Esta prueba ha sido utilizada para el diagnóstico de anaplasmosis y frecuentemente ha sido considerada una prueba sensible, sin embargo por las características de la prueba en ocasiones se ha considerado no útil en el diagnóstico de la infección. Pueden ocurrir reacciones falso positivas, que se atribuyen al largo período de incubación de esta enfermedad (Kroon y col., 1990).

Se han reportado ensayos de inmunofluorescencia indirecta, los cuales presentan un número alto de reacciones falsos-positivos y un alto background de fluorescencia (Goff y col., 1988; Montenegro-James y col., 1985). McGuire y col., en 1984 reportaron una IFI, donde se usa como antígeno una muestra cruda de *Anaplasma marginale*, contaminado con membranas eritrocitarias. Consecuentemente dan una serie de resultados falsos-positivos y falsos-negativos en el ganado infectado agudamente y en el convaleciente; en el ganado persistentemente infectado arrojan un porciento de falsos negativos.

Así mismo la inmunofluorescencia indirecta ha sido utilizados para estudios epidemiológicos (Duzgun y col., 1988; Jonjegan y col., 1988). Todos estos ensayos para la detección de anticuerpos utilizan antígenos crudos obtenidos de *A. marginale* parcialmente purificado, lo que provoca que se pierda la sensibilidad y especificidad que se requieren para un diagnóstico eficaz (Montenegreo-James y col., 1985). Una parte de los errores que se cometen en estos ensayos, se debe a los resultados falsos positivos, causados por la contaminación con eritrocitos de los antígenos de *A. marginale* y la presencia de anticuerpos antieritrocitarios en el suero de algunos animales. La frecuencia de anticuerpos contra los eritrocitos se ve aumentada marcadamente en el suero de los animales vacunados con vacunas derivadas de sangre, tales como las que se utilizan para *Babesia* sp (Barry y col., 1986; Duzgun y col., 1988). Otra parte de los errores se debe a las reacciones falso negativas, provocadas en algunos casos por la baja sensibilidad del método o

porque algunos ensayos como el de fijación del complemento, no detectan todos los isotipos de las inmunoglobulinas (McGuire y col., 1979).

1.5.2.4. Dot- ELISA y ELISA

Se han desarrollado pruebas ELISA para identificar anticuerpos en suero bovino (Duzgum y col., 1988; Knowles y col., 1996; Ndung'u y col., 1995). El ELISA es una prueba sensible, específica, sencilla y rápida, además de brindar la posibilidad de una mejor interpretación de los resultados, comparada con las técnicas antes mencionadas (Duzgum y col., 1988). En 1986, Palmer y McGuire realizaron un ELISA utilizando la proteína MSP3, pero actualmente se ha comprobado que esta presenta epitopos comunes con *A. ovis* y no se encuentra conservada entre los diferentes aislamientos de *A. marginale* por lo que el uso, en el diagnóstico en general, de la proteína nativa o recombinante no es recomendado (Alleman y Barbet, 1996). Se ha utilizado también como antígeno la proteína MSP5, dando buenos resultados en la detección de diferentes especies. (Ndung'u y col., 1995). Se ha preparado una prueba ELISA por inhibición competitiva que es lo suficientemente sensible para detectar anticuerpos de los animales persistentemente infectados. Se utilizó el epitopo, de la MSP5, definido por el anticuerpo monoclonal (AcMc) ANAF16C1, demostrando que este es altamente específico y útil (Knowles y col., 1996).

Otros ensayos inmunoenzimáticos usan como antígeno epitopos del polipéptido MSP1 (Trueblood y col., 1991) y cuerpos iniciales de *A. marginale*, dando este último reacción cruzada con *A. centrale* (Nakamura y col., 1988). Este tipo de antígeno también se ha usado en pruebas Dot-ELISA obteniéndose buenos resultados (Montenegro-James y col., 1992).

Para mejorar los parámetros de sensibilidad y especificidad se han desarrollado técnicas de diagnóstico utilizando anticuerpos monoclonales (Trueblood y col., 1991) y antígenos recombinantes (Knowles y col., 1996; Echaide y col., 1998).

El establecimiento de un ensayo de ELISA competitivo (Echaide y col., 1998), utilizando la proteína recombinante MSP5, permitió el incremento de la sensibilidad a un 96% y la especificidad de un 95%, pudiendo detectar las infecciones persistentes del parásito, por lo que los autores sugieren esta técnica para estudios epidemiológicos, programas de erradicación y para la regulación internacional para

el movimiento del ganado. La utilización de un rMSP5 cELISA demostró que este es altamente específico para el diagnóstico serológico de anaplasmosis en ganado de Norteamérica.

Más recientemente Bowles y col., 2000, han desarrollado un kit ELISA comercial para la detección de anticuerpos contra *A. marginale* y *A. centrale* en Australia y Zimbabwe, mostrando una sensibilidad y especificidad en Australia de 100% y 83.3%, respectivamente.

También se hace necesaria la existencia de un Test diagnóstico que se pueda realizar la lado del animal, que resulte sensible y específico, para lo cual la proteína MSP5 recombinante promete ser un fuerte candidato, lo que permitirá un diagnóstico rápido y efectivo de la enfermedad en el campo.

Experimento 1: Amplificación del gen *msp*5 de *Anaplasma marginale* en aislamientos de diferentes regiones geográficas de Cuba.

Introducción.

Se ha descrito que el gen *msp*5 aparece como simple copia en el genoma de *A. marginale* y que codifica para la proteína MSP5 presente en todas las especies de Anaplasma, incluyendo *A. ovis*, y *A. centrale* y en todos los aislamientos de *A. marginale* testados. (Visser y col., 1992). Estos autores plantean que este gen es altamente conservado en todos los aislamientos de *Anaplasma marginale*.

Atendiendo a lo anterior el objetivo de este experimento fue demostrar la presencia del gen *msp*5 de *A. marginale* en aislamientos de diferentes regiones geográficas de Cuba, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Medios de cultivo y soluciones: Los medios de cultivo y las soluciones utilizadas en los experimentos se prepararon según la metodología descrita en el Anexo 1.

Cepas y purificación de ADN: La sangre de bovinos con 60% de parasitemia, infectada con los aislamientos cubanos de *A. marginale,* dos de la región occidental y dos de la región oriental (Habana, Valle del Perú, Oriente 1, Oriente 2), con *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* con 5% de parasitemia, así como la que se

utilizó como control negativo, fue cedida por el Grupo de Parasitología e Inmunología, CENSA.

El ADN de los aislamientos cubanos de *A. marginale* se purificó según la metodología descrita por Ambrosio y Potgieter, 1987. La purificación del ADN de *B. bovis* y *B. bigemina* se realizó según el protocolo descrito por Fahrimal y col., 1992.

El ADN de los aislamientos Florida y Idaho fue gentilmente cedido por el Dr. Guy H. Palmer (Departamento de Medicina Veterinaria y Parasitología, Washington State University y el ADN de *Tripanosoma* sp por la Dra. María de Lourdes Muñoz (Laboratorio de Genética, CINVESTAV, México).

Amplificación del gen *msp*5: Se diseñaron dos cebadores complementarios a la región inicial y terminal del gen que codifica para la proteína MSP5 del aislamiento Florida, a partir de la secuencia reportada en la literatura (Visser y col., 1992). La secuencia de los mismos aparece en la siguiente tabla.

Tabla 1: Secuencia nucleotídica (5'-3') de los cebadores para la amplificación del gen *msp*5.

Cebadores	*Secuencia*	*Posición*	*Talla (b)*
Sentido	GTGTTCGTTGGGGTGTGATAGATGAG	96-122	26
Antisentido	TAAGAATTAAGCATGTGACCGCTGAC	722-748	26

Se realizó la amplificación del gen de interés utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando para todos los casos 50 ng de ADN purificado. La PCR se realizó en un volumen final de 25 μL, contentivo de KCl 10 mM, Tris HCl 20 mM, pH 8.8, $MgSO_4$ 2.5 mM, Triton X-100 0.1%, 20 pmoles de los cebadores, 0.2 mM de $dNTP_s$ y 1U de Taq polimerasa (Biolabs).

El programa de amplificación utilizado se muestra en la tabla 2.

Las amplificaciones se realizaron en un Thermal Reactor Hybaid y los resultados se aplicaron en geles de agarosa al 0.8 % en TBE (0.5X), teñidos con bromuro de etidio (0.5 μg/uL) (Sambrook y col., 1989) y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta LKB, Pharmacia.

Tabla 2: Programa de la PCR utilizado para la amplificación.

Número de ciclos	***Temperatura (°C)***	***Tiempo***
1	94	1 min
5	94	1 min
	60	30 seg.
	72	1 min
25	94	1 min
	63	30 seg
	72	1 min
1	72	10 min.

Experimento 2: Clonaje, expresión y secuenciación del gen *msp*5 del aislamiento Habana de *A. marginale*.

Introducción.

Se ha demostrado que el gen *msp*5 presenta elementos promotores similares a los de *E. coli* y que las proteínas nativa y recombinante tienen tallas similares y muestran un epitopo común definido por el monoclonal ANAF16C1, que está ampliamente conservado en todos los aislamientos de *A. marginale* y en el estadio de glándula salivar (Knowles y col., 1996).

La obtención de la proteína MSP5 recombinante se hace necesario, pues la proteína nativa está poco representada en el cuerpo inicial de *A. marginale* y su purificación tendría que ser a partir de sangre de bovino infectada, que además tendría como inconveniente la contaminación con otras proteínas del estroma del eritrocito (McGuire y col., 1984).

El objetivo de nuestro experimento fue clonar, secuenciar y expresar en *E. coli* el gen *msp*5 del aislamiento Habana de *A. marginale*.

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo: La cepa de *E. coli* DH 5α se cultivó en medio líquido y sólido Luria Betani (LB), contentivo de ampicillín (100 μg/mL) (Davis y col., 1980). La temperatura de crecimiento fue de 37°C.

Purificación de los cuerpos iniciales: Los cuerpos iniciales del aislamiento Habana de *A. marginale* se purificaron según la metodología descrita por Palmer y McGuire, 1984.

Clonaje, expresión y secuenciación del gen que codifica para la proteína MSP5 del aislamiento Habana de *A. marginale:* Se utilizaron los mismos cebadores empleados en el experimento anterior, y el mismo programa de amplificación.

El vector de expresión pGEX-3X (Pharmacia)(Anexo 2), se digirió con la enzima de restricción *Sma* I (Biolabs) y se desfosforiló con fosfatasa alcalina (Biolabs) (Sambrook y col., 1989). El producto amplificado se trató con Klenow (Biolabs) y T4 PNK (Biolabs) (Sambrook y col., 1989).

Posteriormente se realizó la purificación de ambas preparaciones, utilizando para la purificación del vector un kit de aislamiento rápido de ácidos nucleicos

(NucleinClean, SIGMA) y para el producto amplificado se utilizó el Kit Wizard DNA CleanUp Resin. Ambos productos se ligaron con la enzima T4 DNA ligasa (Promega), según las indicaciones de la casa productora.

La transformación se realizó en células competentes de *E. coli* DH 5α, preparadas según protocolo descrito por Sambrook y col., 1989, con una eficiencia de transformación de 10^7 (Grupo de Biología Molecular, CENSA). Se calculó la frecuencia y eficiencia de transformación según Sambrook, y col., 1989).

Se realizó la purificación de los plásmidos posibles recombinantes, contentivos en las colonias, por el método de minialcalino (Sambrook y col., 1989). Para su análisis se utilizó la enzima *BamH* I (Biolabs) y para analizar el sentido de orientación del fragmento clonado se empleó *EcoR* I (Biolabs).

La expresión de un clon (pHMSP5) y del vector vacío (pGEX-3X) se indujo con IPTG (1mM), cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica (D.O) de 0.4, a una longitud de onda (λ) de 530 nm, leída en un espectrofotómetro (Lasso Biotech, Lasso Spec III). Los cultivos inducidos y no inducidos se mantuvieron creciendo 3 h a 37°C, con agitación. Se les determinó D.O a 530 nm y todos se ajustaron a una misma D.O para ser procesados para la electroforesis en poliacrilamida 12%-SDS según Sambrook y col., 1989.

Los resultados de la inducción se visualizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 12%-SDS (Tabla 3)(Sambrook y col., 1989). La electroforesis se realizó en minigeles (Bio-Rad Mini Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad), aplicando 15 μL de los lisados celulares y utilizando un voltaje constante de 20 voltios/cm de gel. Las proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de coomassie R250 (Sambrook y col., 1989). Se utilizó marcador de peso molecular SDS-PAGE Standars, 6.5-200 kDa (Bio-Rad).

El peso molecular de la proteína recombinante H-MSP5 se estimó utilizando la movilidad electroforética de las proteínas con respecto al patrón de peso molecular.

Después de la electroforesis, los geles se transfirieron a filtros de nitrocelulosa, mediante transferencia semiseca (Sachse y col., 1992) y se chequearon con solución Rojo Ponceau 0.2 %.

Tabla 3: Preparación de geles de poliacrilamida al 12 %-SDS.

Componentes	*Gel separador (12 %)*	*Gel concentrador (5 %)*
H_2O estéril	3.3 mL	2.7 mL
Acrilamida 30 % ***Bisacrilamida 0.8 %***	4 mL	0.67 mL
Tris 1.5 M, pH 6.8	2.5 mL	____
Tris 1 M, pH 8.8	___	0.5 mL
SDS 10 %	0.1 mL	0. 004 mL
Persulfato de amonio 10%	0.1 mL	0.01 mL
TEMED	0.005 mL	0.005 mL

La detección inmunológica se realizó mediante Western Blot siguiendo el siguiente protocolo: se efectuó el bloqueo en leche descremada al 5 % en PBS (1 g de leche en 20 mL de PBS), durante 1 h a 37 °C, con agitación. Luego se realizó la incubación con un antisuero policlonal monoespecífico contra MSP5 de *A. marginale* (X-MSP5) y el AcMc ANAF16C1, durante 3 h a temperatura de 37 °C, en agitación, utilizando una dilución de 1:100 y 1:5, respectivamente. Posteriormente se realizaron 3 lavados (con agitación) con PBS-Tween 20 (0.05%) de 3-5 minutos y uno con PBS, se adicionó el conjugado peroxidasa antibovino y antiratón (CENSA), respectivamente, y se realizaron los lavados igual a los anteriores y finalmente se añadió el sustrato diaminobencidina, peróxido de hidrógeno 0.006%, hasta que apareciera la señal. Posteriormente se secaron los filtros a temperatura ambiente y se guardaron protegidos de la luz.

Secuenciación del gen *msp*5 del aislamiento Habana de *A. marginale*: Para la secuenciación el plásmido recombinante pMSP5 se purificó según el kit Plasmid Pure[ra] MiDIPRED Kit (Sigma) para garantizar un alto grado de pureza. La reacción se realizó utilizando un secuenciador automático ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech). Se utilizaron los mismos cebadores utilizados para el clonaje. Para esto se utilizó un Kit de secuenciación Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Kit (Amersham Pharmacia Biotech).

El análisis de los resultados de la secuenciación se realizó mediante el programa PC/Gene (Francisco Sobrino, 1991).

Experimento 3: **Reconocimiento de la proteína por sueros de campo.**

Introducción.

En ocasiones se hace difícil el diagnóstico de *A. marginale* en animales portadores de la enfermedad, pues los bajos niveles de parasitemia no pueden ser detectados por las técnicas tradicionales (Trueblood y col., 1991).

Echaide y col., 1998, demostraron que MSP5 expresa epitopos de superficie invariantes reconocidos por ganado previamente inmunizado. También la presencia de anticuerpos con el epitopo definido por el anticuerpo monoclonal ANAF16C1 en todos los sueros postinfección testados indican que este epitopo es un antígeno potencial para el diagnóstico, para uso en animales persistentemente infectados (Visser y col., 1992).

El objetivo de este experimento fue evaluar el comportamiento de la proteína H-MSP5 frente a diferentes sueros de campo.

Evaluación de la proteína H-MSP5 del aislamiento Habana de *A. marginale* con diferentes sueros de campo: Se prepararon tiras de nitrocelulosa con el clon expresando la proteína H-MSP5, mediante inmunotransferencia de una electroforesis de poliacrilamida al 12 %-SDS.

La corrida electroforética, la transferencia a la membrana de nitrocelulosa, así como la detección inmunológica se realizaron según las condiciones mencionadas con anterioridad.

Para la obtención de los sueros se tomaron 10 mL de sangre de animales de campo de diferentes regiones geográficas de Cuba donde existe la enfermedad, se incubó durante 1 h a 4°C para facilitar la formación y extracción del coágulo, se centrifugó a 5000 r.p.m, durante 10 min. a temperatura ambiente y los sueros obtenidos se conservaron a -20 °C para su posterior evaluación.

Se utilizaron 2 sueros de campo negativos a *A. marginale*, 8 sueros de campo positivos, procedentes de diferentes regiones geográficas del país y un suero positivo a *B. bovis*, trabajados a una dilución 1/20 en PBS.

Utilizando la técnica de aglutinación rápida en tarjeta, se determinó cuales de estos sueros eran positivos y cuales negativos a *A. marginale,* por el Grupo de Parasitología e Inmunología, CENSA.

Experimento 4: Estudio de la cinética de crecimiento del clon pHMSP5 y la expresión de la proteína H-MSP5 en condiciones de fermentación.

Introducción.

Los avances recientes en los campos de la Ingeniería Genética y la Biotecnología han demostrado las posibilidades ilimitadas de estas tecnologías, las que permiten transferir genes de diferentes fuentes, a bacterias y levaduras, entre otros hospederos, e incrementar la eficiencia de expresión de los mismos, lo que conlleva a un aumento de la productividad de los procesos de fermentación y de purificación de las proteínas codificadas por dichos genes (Calcott y col., 1988).

El objetivo del presente experimento fue realizar el estudio de la cinética de crecimiento del clon pHMSP5 y la expresión de la proteína H-MSP5 en condiciones de fermentación.

Estudio de la cinética de crecimiento del clon pHMSP5 y la expresión de la proteína H-MSP5 en condiciones de fermentación: Para el estudio de la expresión de la proteína recombinante H-MSP5 en condiciones de fermentación se preparó un cultivo de *E. coli* contentivo del plásmido pHMSP5, en 300 mL de LB, suplementado con ampicillín y se incubó a 150 r.p.m. en zaranda a 37 °C durante

18 h. Este preinóculo se le adicionó a un fermentador (Chepman- Braun) de 7 L que contenía 5700 mL de medio LBA y se creció a 37°C $\pm$ 0.2, con una agitación de 300 r.p.m., una aireación de 1 vvm y un pH constante de 7 $\pm$ 0.2. La inducción de la expresión se realizó con 1 mM de IPTG, cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.4, medida a 530 nm.

Se realizó la cinética de crecimiento del clon recombinante, inducido y sin inducir a través de la lectura de la densidad óptica a 530 nm cada una hora y se determinó la velocidad de crecimiento (μ) en la fase de crecimiento logarítmico.

Para la determinación del porcentaje de expresión de la proteína se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 %-SDS, la imagen del gel se captó en una cámara Kodak (Kodac DC 40) y a través del programa TDI'S Lane Manager Versión 2.1ª (Vaquerino y Daposo, 1995- 1996) se analizaron los niveles de expresión en el tiempo.

Para cada una de las condiciones evaluadas, con el cultivo inducido y sin inducir, se realizaron tres réplicas y se compararon entre sí los índices de crecimiento mediante la prueba de Student.

A partir del ADN de *A. marginale* de diferentes regiones geográficas de Cuba se obtuvo la amplificación de una banda de 652 pb con los cebadores específicos para el gen que codifica para la proteína MSP5, lo que demuestra la presencia de dicho gen en los aislamientos de *A. marginale* de diferentes regiones geográficas del país (Fig. 1), coincidiendo con la talla reportada en la literatura por Visser y col., 1992, que describen el gen *msp*5 como un gen de simple copia de 633 pb.

El fragmento amplificado fue de 652 pb, lo que está dado por los cebadores utilizados para la amplificación, que abarcan desde las posición de 96 pb hasta 748 pb. Sin embargo en la figura 2 podemos observar que no hubo amplificación cuando se realizó la PCR a partir de ADN de otros hemoparásitos analizados, lo que coincide con lo planteado por estos autores, de que el gen *msp*5 es altamente específico para Anaplasma. A su vez no hubo amplificación a partir del ADN bovino, ni de muestra de un animal negativo, usados como control negativo.

Este gen codifica para la proteína MSP5, conservada en todas las especies estudiadas de Anaplasma: *A. marginale*, *A. centrale, A. ovis* y en todos los aislamientos de *A. marginale* examinados, en los estadios del eritrocito, así como en todos los estadios de *A. marginale* estudiados, incluyendo el cultivo del organismo (Barbet y col., 1999).

Similar al gen *msp*1α y *msp*4, el gen *msp*5 está presente como una simple copia (Allred y col., 1990, Oberle y col., 1993). *msp*5 expresa epitopos conservados entre cepas ampliamente divergentes (Munodzana y col., 1998) y con *A. centrale*. Este gen es también expresado en *A. ovis* y en el estadio de glándula salivar de *A. centrale* (Visser y col., 1992; Barbet y col., 1999), sin embargo, los genes *msp*1β y *msp*2 están presentes en múltiple copia en el genoma de *A. marginale* (Barbet y Allred, 1991; Palmer y col., 1994).

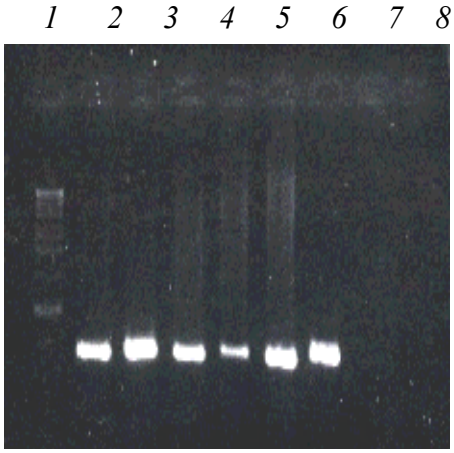


***Fig. 1**: Amplificación del gen msp5 en diferentes aislamientos de Anaplasma marginale. Línea **1**: Marcador de peso molecular 1 kb; **2**: aislamiento Habana; **3**: aislamiento Valle del Perú; **4**: aislamiento Oriente 1; **5**: aislamiento Oriente 2; **6**: aislamiento Florida**; 7**: aislamiento Idaho; **8**: control negativo; **9**: control de H_2O.*

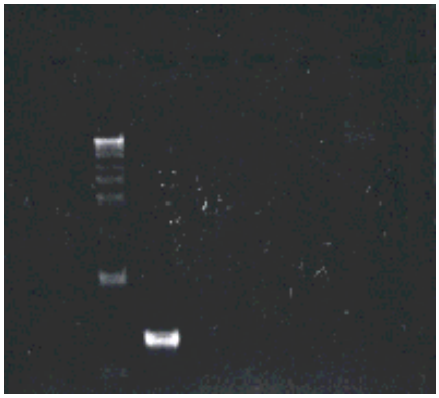


***Fig. 2:** Amplificación del gen msp5. Línea **1**: Marcador de peso molecular 1 kb; **2**: ADN de Anaplasma marginale; **3**: ADN de Babesia bovis; **4**: ADN de Babesia bigemina; **5**: ADN Tripanosoma sp; **6**: ADN bovino; **7**: Control negativo; **8**: Control de H_2O.*

De la transformación realizada se obtuvieron 186 colonias posibles recombinantes, con un fondo de vector de 7 colonias, para una frecuencia de transformación de 9.1 X 10^3, transformantes/μg de ADN plasmídico. De estas colonias se analizaron 50, de las cuales 7 resultaron ser recombinantes después de la digestión con *BamH* I para una eficiencia de transformación de 14%. Posteriormente se determinó por digestión con *EcoR* I los clones que tenían el sentido correcto de orientación, eligiendo un clon recombinante denominado pHMSP5.

En la figura 3 se puede observar la digestión del plásmido recombinante pHMSP5, con *BamH* I, en comparación con el plásmido nativo, observándose la diferencia de talla, correspondiente al fragmento clonado. En la figura 4 se observa la amplificación del gen *msp*5 en el plásmido recombinante, coincidiendo con la talla del gen amplificado en *A. marginale* (652 pb), lo que corrobora la presencia del inserto clonado dentro del plásmido.

1 2 3

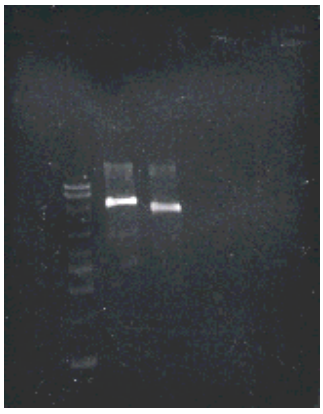


Fig. 3: *Análisis de restricción del plásmido recombinante con BamH I. Línea* ***1****: Marcador de peso molecular 1 kb;* ***2****: pHMSP5;* ***3****: pGEX-3X.*

1 2 3 4 5

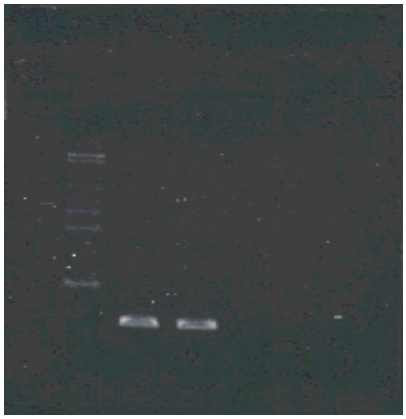


Fig. 4: *Amplificación del gen msp5 en el plásmido recombinante. Línea* ***1****: Marcador de peso molecular 1 kb;* ***2****: ADN A. marginale;* ***3****: pHMSP5;* ***4****: pGEX-3X;* ***5****: control de* H_2O.

Se estudió la expresión de la proteína H-MSP5, en *E. coli*, a partir del clon recombinante pHMSP5, (Fig. 5), apareciendo dos bandas de una talla aparente de 23 kDa y 21 kDa en el patrón de proteínas de dicho clon inducido con IPTG, y con menor intensidad en el clon sin inducir, y no aparecen en el plásmido sin inserto inducido y sin inducir. Esta banda de menor tamaño puede ser producto de la degradación proteolítica por proteasas celulares, pues se sabe que *E. coli* como cepa hospedera tiene una serie de desventajas ya que produce proteasas que pueden destruir las proteínas recombinantes obtenidas (Zabriskie y Arcuri, 1986) o puede ser por la existencia de un sitio interno de transducción de la proteína. Saito y cols., 1993, encontraron resultados similares al expresar en *E. coli* la proteína de 29 kDa de *Mycoplasma gallisepticum*, atribuyendo la presencia de dos bandas reconocidas por el antisuero, a la acción de proteasas de *E. coli.*

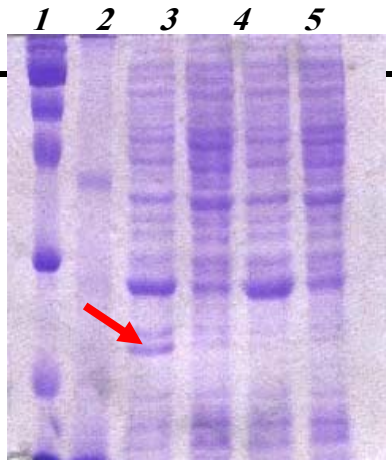


***Fig. 5**: Resultado de la expresión del clon recombinante pHMSP5 en poliacrilamida 12%-SDS. Línea **1**: Marcador de peso molecular (6.5-200kDa); **2**: cuerpos iniciales de A. marginale; **3**: pHMSP5 inducido; **4**: pHMSP5 sin inducir; **5**: pGEX-3X inducido; **6**: pGEX-3X sin inducir.*

Los resultados del Western Blot utilizando el antisuero policlonal monoespecífico X-MSP5 y el AcMc ANAF16C1 (Figs. 6 y 7) mostraron que ambos son capaces de detectar las dos bandas de proteínas, lo que indica similitud antigénica y que ambas se están traduciendo en un mismo marco de lectura, o sea una a partir del sitio de iniciación del gen y la segunda por un posible mecanismo de iniciación interna, sin descartar la posibilidad como se planteó con anterioridad, de que ocurra degradación proteolítica de la proteína (Fernández, 1998).



***Fig. 6:** Resultados del Western Blot con el antisuero policlonal monoespecífico (X-MSP5). Línea **1**: pHMSP5 inducido; **2**: PHMSP5 sin inducir; **3**: pGEX-3X inducido; **4**: pGEX-3X sin inducir.*



Fig. 7: *Resultados del Western Blot con el AcMc ANAF16C1. Línea* ***1****: pHMSP5 inducido;* ***2****: PHMSP5 sin inducir;* ***3****: pGEX-3X inducido;* ***4****: pGEX-3X sin inducir.*

En el caso del desarrollo y producción de proteínas recombinantes para uso diagnóstico resulta muy ventajoso la utilización de la tecnología de fusión de genes con el objetivo de obtener las proteínas en forma de cuerpos de inclusión insolubles, lo que facilita la purificación, pudiéndose obtener un material con más del 50% de pureza con altos rendimientos, lo que facilita el proceso final de purificación y la obtención de la proteína con más de un 90% de pureza y con la calidad necesaria para su futura utilización en sistemas de diagnóstico (Narciandi, 1999).

Sin embargo, podemos observar que la proteína H-MSP5 obtenida, no está fusionada a la Glutatión-S-Transferasa (GTS) del pGEX-·3X, como debía ocurrir, según la estrategia de clonaje utilizada, pero uno de nuestros cebadores empleado para la amplificación del gen (GTGTTCGTTGGGGTGTGATAGATGAG) tiene en su secuencia el sitio de unión al ribosoma del gen *msp*5, (Fig. 8), lo que hace que la proteína se exprese pero no fusionada a la GTS del plásmido (Shepard y col., 1982). Visser y col., 1992, encontraron que la expresión de MSP5 recombinante en *E. coli*, probablemente estaba dirigida por los elementos reguladores de *A. marginale*, pues estaba presente una secuencia (pb 107-112) similar al sitio de

unión al ribosoma *lac I* de *E. coli* y una secuencia líder de 65 pb presidiendo al codón de iniciación (pb 119) del ORF que codifica para la proteína de 201 aminoácidos, además de estar presente en la región amino terminal un peptido señal de 22 aminoácidos hidrofílicos. Al analizar nuestra secuencia del gen (Figs. 8 y 9), podemos observar que está presente como se dijo con anterioridad, el sitio de unión al ribosoma en nuestro cebador, a lo que se le puede atribuir la no unión de nuestra proteína H-MSP5 a la GTS. Además se sabe que entre los diversos factores que afectan la eficiencia de la traducción está la distancia entre la secuencia Shine Delgarno (S.D.) y del codón de iniciación ATG. El efecto entre el número de nucleótidos entre el S.D. y el ATG en la producción de cadenas polipeptídicas ha sido reportado por varios autores y se plantea que la distancia optima está alrededor de 10 nucleótidos (Shepard y col., 1982) y en nuestro caso como se puede observar en la figura 8 la distancia es de 7 nucleótidos, por lo que esto no debe ser una causa que afecte la traducción de nuestra proteína.

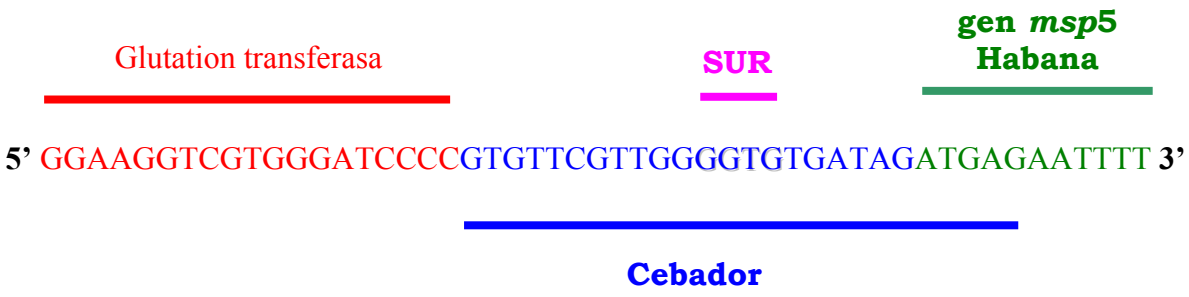


Fig. 8: Estrategia de clonaje utilizada.
SUR: Sitio de unión al ribosoma.

msp5Habana- TAGATGAGAATTTTCAAGATTGTGTCTAACCTTCTG -36
||||||||||||||||||||||||||||||||||||
msp5Florid-
TCGTTGGGGTGTGATAGATGAGAATTTTCAAGATTGTGTCTAACCTTCTG -150
msp5Habana-
CTGTTCGTTGCTGCCGTGTTCCTGGGGTACTCCTATGTGAACAAGAAAGG -86
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
msp5Florid-
CTGTTCGTTGCTGCCGTGTTCCTGGGGTACTCCTATGTGAACAAGAAAGG -200
msp5Habana-
CATTTTCAGCAAAATCGGCGAGAGGTTTACCACTTCCGAAGTTGTAAGTG -136
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
msp5Florid-
CATTTTCAGCAAAATCGGCGAGAGGTTTACCACTTCCGAAGTTGTAAGTG -250
msp5Habana-
AGGGCATAGCCTCCGCGTCTTTCAACAATTTGGTTAATCACGAGGGGGTC -186
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
msp5Florid-
AGGGCATAGCCTCCGCGTCTTTCAACAATTTGGTTAATCACGAGGGGGTC -300
msp5Habana-
ACCGTCAGTAGCGGCGATTTTGGCGGCAAGCACATGTTGGTAATATTCGG -236
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
msp5Florid-
ACCGTCAGTAGCGGCGATTTTGGCGGCAAGCACATGTTGGTAATATTCGG -350
msp5Habana-
CTTCTCAGCCTGTAAGTACACGTGCCCTACCGAGTTAGGCATGGCTTCTC -286
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
msp5Florid-
CTTCTCAGCCTGTAAGTACACGTGCCCTACCGAGTTAGGCATGGCTTCTC -400
msp5Habana-
AGCTCCTAAGTAAACTAGGCGACCATGCCGATAAGTTGCAAGTTGTGTTC -336
|||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
msp5Florid-
AGCTCCTAAGTAAACTAGGCGACCATGCCGTAAAGTTGCAAGTTGTGTTC -450
msp5Habana-
ATAACTGTTGATCCGAAAAATGACACCGTAGCCAAGCTTAAAGAGTACCA -386
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
msp5Florid-
ATAACTGTTGATCCGAAAAATGACACCGTAGCCAAGCTTAAAGAATACCA -500
msp5Habana-
CAAGTCTTTTGATGCGAGAATTCAGATGCTCACAGGCGAGGAAGCAGACA -436
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
msp5Florid-
CAAGTCTTTTGATGCGAGAATTCAGATGCTCACAGGCGAAGAAGCAGACA -550
msp5Habana-
TAAAGAGCGTGGTTGAAAACTACAAGGTGTATGTGGGCGACAAGAAGCCA -486
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

msp5Florid-
TAAAGAGCGTGGTTGAAAACTACAAGGTGTATGTGGGCGACAAGAAGCCA -600
msp5Habana-
AGTGATGGTGATATCGACCACTCGACTTTCATGTATCTCATCAATGAAAA -536
|||||||||||||||||||||| || |||||||| |||||||||| ||
msp5Florid-
AGTGATGGTGATATCGACCACTCAACGTTCATGTACCTCATCAATGGGAA -650
msp5Habana-
GGGCAGGTACGTTGGGCATTTTGCGCCAGATTTTAACGCGTCTGAGGGCC -586
||||||||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
msp5Florid-
AGGCAGGTATGTCGGGCATTTTGCGCCAGATTTTAACGCGTCTGAGGGCC -700
msp5Habana-
AAGGCGAGGAGCTGTTTAAGTTTGTCAGCGGTCACATGCTTAATTCTTAG -636
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
msp5Florid-
AAGGCGAGGAGCTGTTTAAGTTTGTCAGCGGTCACATGCTTAATTCTTAG -750

Fig. 9: Comparación de la secuencia del gen msp5 del aislamiento Habana con la secuencia del gen msp5 del aislamiento Florida.

La secuenciación del gen *msp*5 del aislamiento Habana clonado (Fig. 9) permitió conocer además, que la secuencia del inserto tiene un 98.1%de homología con la descrita para el aislamiento Florida (Visser y cols., 1992), lo que nos habla a favor del sistema de amplificación usado y corrobora la alta conservación de la secuencia de la proteína MSP5 de los distintos aislamientos de *A. marginale* (Echaide y col., 1998).

Las diferencias encontradas están dadas por cambios puntuales de bases que no provocan cambios en la secuencia de aminoácidos, pues según el programa de análisis utilizado, nuestra proteína y la del aislamiento Florida coinciden en un 99.5%, y por lo tanto no se afecta el patrón de hidrofobicidad e hidrofilicidad de la proteína recombinante con relación a la reportada en la literatura (Fig.10).

```
H-MSP5PROT-                                                          LL-
FVAAVFLGYSYVNKKGIFSKIGERFTTSEVVSEGIASASFNNLVNHE -49
         || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
MSP5FLORID-
LLLFVAAVFLGYSYVNKKGIFSKIGERFTTSEVVSEGIASASFNNLVNHE -50

H-MSP5PROT-
GVTVSSGDFGGKHMLVIFGFSACKYTCPTELGMASQLLSKLGDHADKLQV -99
         |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
MSP5FLORID-
GVTVSSGDFGGKHMLVIFGFSACKYTCPTELGMASQLLSKLGDHADKLQV -100

H-MSP5PROT-
VFITVDPKNDTVAKLKEYHKSFDARIQMLTGEEADIKSVVENYKVYVGDK -149
         |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
MSP5FLORID-
VFITVDPKNDTVAKLKEYHKSFDARIQMLTGEEADIKSVVENYKVYVGDK -150

H-MSP5PROT-
KPSDGDIDHSTFMYLINEKGRYVGHFAPDFNASEGQGEELFKFVSGHMLN -199
         |||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
MSP5FLORID-
KPSDGDIDHSTFMYLINGKGRYVGHFAPDFNASEGQGEELFKFVSGHMLN -200

H-MSP5PROT- S -200
         |
MSP5FLORID- S -201
```

Fig. 10: Comparación de la secuencia de la proteína recombinante H-MSP5 con la proteína MSP5 del aislamiento Florida.

Visser y cols., 1992, determinaron un sitio *EcoR* I en la posición 624 del gen msp5 clonado, del aislamiento Florida, y no identificaron sitios *Sal* I o *BamH* I, coincidiendo esto con el mapa de restricción obtenido para nuestro gen *msp*5 clonado, del aislamiento Habana.

Echaide y col., 1998, compararon la secuencia producto de un nPCR en 30 animales de un rebaño donde *A. marginale* era endémico y encontraron un 95% de homología con la secuencia descrita para el aislamiento Florida. Todos estos resultados confirman la importancia de la utilización de esta proteína en el desarrollo de sistemas de diagnóstico de alta sensibilidad, debido a su gran conservación entre aislamientos.

El peso molecular de la proteína H-MSP5, estimado por densitometría fue de 23 kDa, resultando superior al del aislamiento Florida (19 kDa)(Visser y cols., 1992). Esta diferencia de talla pudiera deberse a características del aislamiento en estudio, a pesar de que estos autores plantean que el gen *msp*5 se expresa como un polipéptido de aproximadamente 19 kDa en la membrana de todas las cepas de *A. marginale* examinadas (Ndung'u, y col., 1995).

Otras proteínas de *A. marginale* como MSP1 y MSP2 muestran variación en su talla; MSP1a está caracterizada por un polimorfismo de talla de hasta 50% (70-105 kDa) y más limitada la variación de talla para MSP1b de hasta 3% (97-100 kDa) y MSP2 hasta un 9% (33-36 kDa) entre cepas de *A. marginale* (Oberle y col., 1988).

La conservación de epitopos de MSP1 y MSP2 entre aislamientos de *A. marginale* de Kenia, Israel y Estados Unidos, así como *A. centrale* se ha mostrado previamente (Palmer y col., 1988). Sin embargo, Ndung'u y col., 1995 demostraron por primera vez que un epitopo común definido por el AcMc ANAF16C1, se encontró en *A. marginale* y *A. ovis*, a pesar de ser este último patógeno primario de ovejas. Los resultados obtenidos por diferentes autores muestran que MSP5 de

todas las especies reconocidas de Anaplasma poseen un epitopo común definido por el AcMc ANAF16C1.

El hecho de que el monoclonal reconozca nuestra proteína, corrobora los resultados obtenidos por Munodzana y col., 1998, que plantean que el epitopo, definido por la unión a este AcMc, además de estar conservado en *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis* induce altos títulos de anticuerpos en todas las especies infectadas que incluye ganado, ovejas y carneros. Encontraron además que en la región 5', nucleótido 390 (aa 91), así como todos los nucleótidos de la región 492-600 (aa 125-161) son requeridos para la unión del AcMc y muy importante, la presencia de las cisteínas en la región aminoterminal y la unión intermolecular de los disulfuros en la conformación de las MSPs resultan imprescindibles para la unión (Vidotto y cols., 1994).

Como se puede observar en la secuencia de nuestra proteína (Fig. 10), obtenida según el programa de análisis utilizado, todos los aminoácidos necesarios para el reconocimiento del epitopo por el AcMc están conservados en nuestro aislamiento, lo que nos indica que la misma puede ser utilizada para el diagnóstico de *A. marginale*.

En la figura 11 se observa que la proteína MSP5 fue reconocida por 8 sueros de campo, utilizados en este estudio, identificados previamente como positivos a *A. marginale* por el ensayo de Aglutinación en Tarjeta (Grupo de Parasitología e Inmunología). No se evidenció reacción con los sueros negativos, ni con el suero de un animal infectado con *B. bovis*.

Visser y col., 1992 y Echaide y col., 1998, observaron reacción con el epitopo definido por el AcMc ANAF16C1 en todos los sueros post-infección testados y en ganado previamente inmunizado, respectivamente.

El reconocimiento de esta proteína por los sueros de animales de campo resulta de gran valor para la evaluación de esta en un futuro juego diagnóstico, con vistas al diagnóstico de campo rápido y altamente sensible y específico que permita el estudio de animales portadores asintomáticos de la enfermedad y que apoye los programas de vacunación contra la misma.

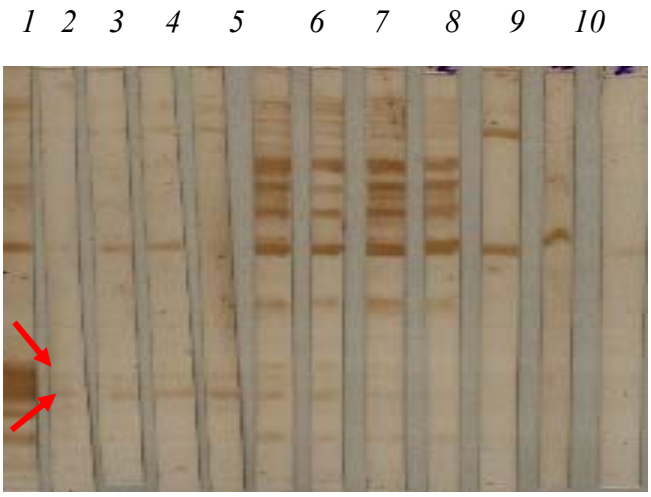


Fig. 11: Resultados de la reacción de la proteína con sueros de animales de campo. Línea ***1****: Clon recombinante frente al AcMc ANAF16C1;* ***2- 9****: clon recombinante frente a sueros de animales de campo positivos a A. marginale;* ***10-11****: clon recombinante frente a sueros de animales de campo negativos a A. marginale;* ***12****: clon recombinante frente a suero de animal positivo a Babesia bovis.*

Con el objetivo de conocer la expresión de dicha proteína recombinante en función del crecimiento del clon recombinante se determinó el porcentaje de expresión de H-MSP5 a una concentración de IPTG de 1 mM, utilizando el programa Lane Manager Report (Vaquerino y Daposo, 1995-1996), obteniéndose un 6.5% de expresión de la proteína de interés con respecto al total de proteínas de *E. Coli*, a las 4 h después de la inducción (Fig. 5), superior a el obtenido por Saito y col., 1993, con el empleo de otro sistema de expresión, que fue de un 5%. No obstante, teniendo en cuenta que nuestro objetivo es la utilización de esta proteína con fines diagnósticos, este resultado es aceptable.

En la figura 12 se muestra la cinética de crecimiento microbiano del clon recombinante en *E. coli*. La fase de latencia del microorganismo duró 1 h. A partir de este momento, el mismo comenzó a multiplicarse, dando inicio a la fase de crecimiento logarítmico que tuvo una duración de 4 h, lo que coincide con las curvas de crecimiento reportadas para *E. coli*, cepa hospedera de nuestro clon recombinante (Calcott y col., 1988). Es de esperar que en este momento los niveles

de producción de la proteína por la población microbiana sean más elevados, dado por la actividad metabólica del microorganismo donde se incluyen las proteínas recombinantes (Philippe y col., 1991).

Fig 12: Cinética de crecmiento del clon recombinante pHMSP5inducido y sin inducir.

La μ para el cultivo sin inducir fue de 0.539 h^{-1}, y para el cultivo inducido fue de 0.50 h^{-1}. Entre las dos condiciones evaluadas no hay diferencias significativas en cuanto a los índices de crecimiento evaluados, lo que demuestra que el IPTG utilizado para la inducción no provoca cambios en la fisiología del microorganismo.

En los resultados de las mediciones densitométricas tomadas 1 h después que se indujo la expresión de la proteína, se pudo observar que los niveles de expresión aumentan en el tiempo y alcanzan su máximo valor a las 6 h (Figs.13 y 14). Llama la atención el incremento del nivel de expresión de las 5 a las 6 h, ya que es a las 5 h cuando se llega al final de la fase logarítmica. al parecer la bacteria deja de crecer y continua expresando la proteína (Calcott y col., 1988).

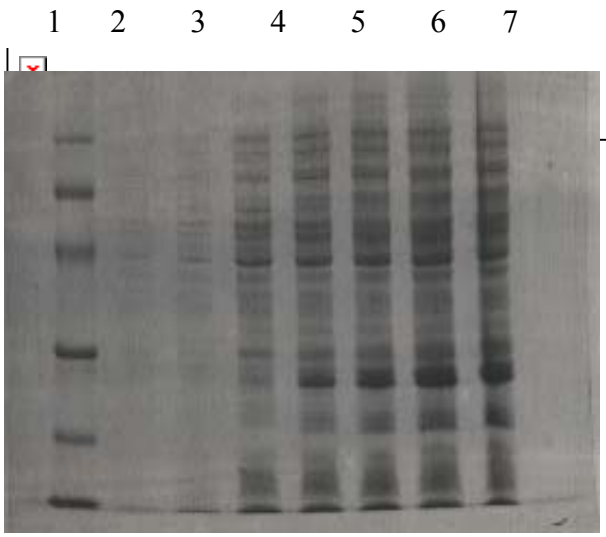


Fig. 13:Electroforesis del cultivo inducido del clon recombinante pHMSP5. Línea 1: marcador de peso molecular; 2-8: muestras tomadas de tiempo=0 a tiempo=6.

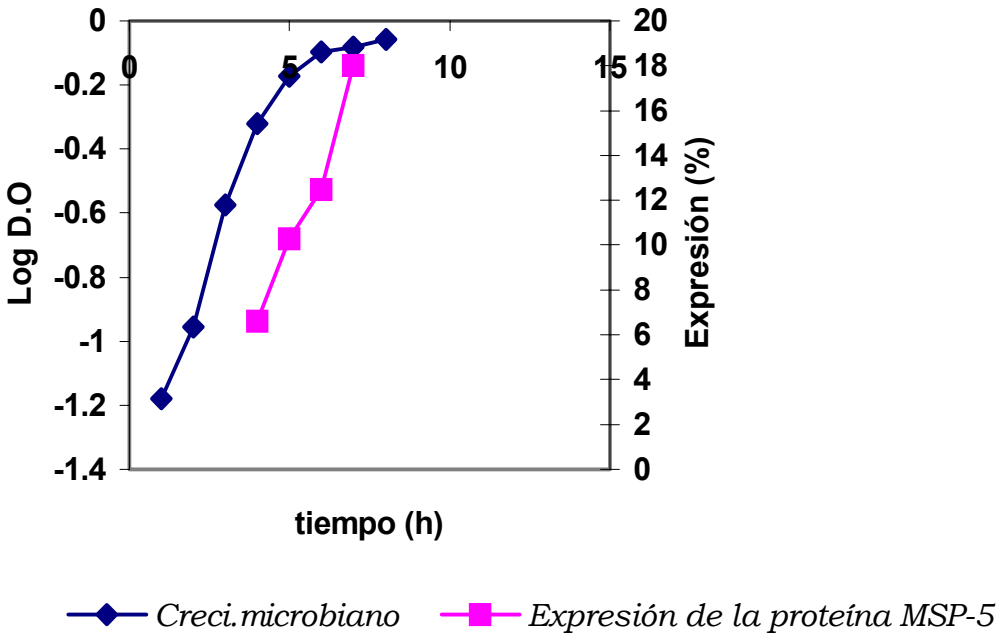


Fig. 14: Expresión de la proteína H-MSP5 en el tiempo.

A partir de las 6 h los niveles de expresión de la proteína deben decrecer debido fundamentalmente a la disminución del crecimiento del microorganismo y a la mayor liberación de proteasas y otras sustancias tóxicas como el acetato, que se excretan al medio de cultivo y pueden degradar la proteína recombinante (Zabriskie y Arcuri, 1986; Narciandi, 1999). Sin embargo, se debe continuar la cinética de expresión hasta que disminuyan los niveles de la proteína recombinante así como el estudio de otros parámetros de fermentación que podrían influir en el rendimiento de la misma.

Todos los resultados obtenidos en el presente trabajo sientan las bases de la posible obtención de un sistema de diagnóstico de alta sensibilidad y especificidad para *A. marginale*, ya que el hecho de contar con un antígeno recombinante de alta conservación y homología, así como que se reconoce por sueros de animales de campo, no solo posibilita la producción de un antígeno a un menor costo, sino que también permitirá el desarrollo de sistemas inmunoenzimáticos de formato simple de alta sensibilidad y especificidad para la detección de portadores asintomáticos de la enfermedad, lo cual está siendo utilizado con mucha fuerza en el movimiento de ganado a nivel internacional, tomando en cuenta que la anaplasmosis es una enfermedad exótica para muchos países exportadores de ganado.

A su vez en Cuba esto significa un soporte diagnóstico para este hemoparásito, que acompañe a los programas de vacunación contra la garrapata que se ejecutan a partir de la obtención de la vacuna GAVAC (Heber Biotech) contra *Broophilus microplus,* en diferentes regiones de Latinoamérica donde se comercializa la vacuna y la anaplasmosis constituye un problema de salud en el ganado bovino.

A partir de estos resultados quedan abiertos nuevos caminos para la obtención de estos sistemas en nuestro país, económicos y altamente sensibles y específicos.

CONCLUSIONES

1. Se determinó la presencia del gen *msp*5 en aislamientos de *Anaplasma marginale* de diferentes regiones geográficas de Cuba.

2. Se obtuvo el clonaje del gen *msp*5 del aislamiento Habana de *A. marginale,* cuya secuencia tiene un 98.1% de homología con respecto al aislamiento de referencia Florida.

3. El clon recombinante expresa la proteína H-MSP5, que presenta una homología de 99.5%, con relación a la secuencia de la cepa de referencia Florida, la cual es reconocida por el policlonal X-MSP5 y el AcMc ANAF16C1.

4. La proteína recombiante H-MSP5 es reconocida por sueros de animales de campo, positivos a *A. marginale*.

5. Se determinó la cinética de expresión de la proteína recombinante en función del crecimiento del microorganismo, obteniendo que el máximo porcentaje de expresión se obtuvo al final de la fase logarítmica.

BIBLIOGRAFIA

- Aboytes-Torres, R. y Buening, G. H. (1990). Development of a recombinant *Anaplasma marginale* DNA probe. *Vet. Microbiol*. 24: 391-408.
- Alderink, F. G. y Dietrich, R. (1981). Anaplasmosis in Texas: epidemiologic and economic data from a questionnaire survey. *Proc. Natl. Anaplasmosis. Conf*. 7: 27-44.
- Alonso, M. y Blandino, T. (1988). Anaplasmosis bovina. Sociedad Cubana de Parasitología. Ediciones del Consejo Científico Veterinario de Cuba: 2-19.
- Alonso, M.; Blandino, T. y Sanchez, A. (1989). Caracterización de cepas de *Anaplasma marginale. Rvta. Cub. Cienc. Vet*. 20: 71-78.
- Alleman, A. R. y Barbet, A, F. (1996). Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen. *J. Clin. Microbiol*. 34: 270-276.
- Alleman, A. R.; Kamper, S. M.; Viseshakul, N. y Barbet, A. F. (1993). Analysis of *Anaplasma marginale* genome by pulsed-field electrophoresis. *Gene Microbiology*. 139: 2439-2444.
- Alleman, A. R.; Palmer, G. H.; McGuire, T. C.; McElwain, T. F.; Perryman, L. E. y Barbet, A. F. (1997). *Anplasma marginale* major surface protein 3 is encoded by a polymorphic multigene family. *Infect. Immun.* 65: 156-163.
- Allred, D.R.; McGuire, T.C.; Palmer, G. H.; Leib, S. R.; Harkins, T. M.; McElwain, T. F. y Barbet, A. F. (1990). Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale* . *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 87: 3220-3224.
- Ambrosio, R. E. y Potgieter, F. T. (1987). The genome of Anaplasma: DNA composition and DNA/DNA hybridization. *J. Vet. Res*. 54: 53-65.
- Amerault, T. E. y Roby, T. O. (1968). A rapid card agglutination test for bovine anaplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 153: 1828-1834.
- Amerault, T. E; rose, J. E. y Roby, T. O. (1972). Modified card agglutination test for bovine anaplasmosis: evaluation with serum and plasma from experimental

and natural cases of anaplasmosis. *Proceedings of the 76th Annual Meeting of the US Animal Association*: 736-744.

- Anon. (1958). A Manual for Conducting the complement fixation test for Anaplasmosis. Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, Beltsville, MD 20705, USA.
- Anon. (1974). A microtitre technique for the complement fixation test for anaplasmosis. Veterinary Services, Animal and Plant Health Inspection Servece, US Department of Agriculture, Beltsville, MD 20705, USA.
- Barbet, A. F. y Allred, D. R. (1991). The *msp*1β multigene family of *Anaplasma marginale* nucleotide sequence analysis of an expressed copy. *Infect. Immun*. 59: 971-976.
- Barbet, A. F.; Blentliger, R.; Yi, J. L.; Blouin, A. M. y Kocan, K. M. (1999). Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grow in tick cell culture, tick salivary glands and cattle. *Infect. Immun*. 67: 102-107.
- Barbet, A. F.; Palmer, G. H.; Myler, P. J. y McGuire, T. C. (1986). Characterization of an inmunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for popypeptide Am105L. *Infect. Immun*. 55: 2428-2435.
- Barry, D. N., Parker, R. J.; DeVos, A. J.; Dunster, P. y Rodwell, B. J. (1986). A microplate enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibody to *Anaplasma marginale* in cattle serum. *J. Aust. Vet*. 63: 76-79.
- Biberstein, E. L. (1999). Anaplasmataceae. *Vet. Microbiol*., *Blackwel Science Publ*.: 304-307.
- Blood, D. C.; Radostits, D. M. y Hennderson, J. A. (1983). Veterinary Medicine, 6th ed., Bailliore-Tindall. Eastbourne, Great Britain.
- Blowin, E. F.; Saliki, J. T.; Kocan, K. M. y Rodgers, S. J. (1998). Evaluation of *Anaplasma marginale* from tick cell culture as an immunogen for cattle. *Am. N. Y. Acad. Sci*. 849: 253-258.

- Bock, R. E.; de Vos, A. J.; Kingston, T. G. y McLellan, .D. J. (1997). Effect of breed of cattle on innate resistance of infection with *Babesia bovis, B. bigmina* and *Anaplasma marginale*. *Aust. Vet. J*. 75: 337-340.
- Bowles, P. M.; Molloy, J. B.; Blight, G. W.; Singh, S. y Mabikacheche, L. G. (2000). Evaluation of a commercially available ELISA kit for detection of antibodies to *Anaplasma marginale* y *Anaplasma centrale* in cattle in Australia and Zimbabwe. Onderstepoort. *J. Vet. Res*. 67: 83-86.
- Calcott, P. H.; Kane, J. F.; Krivi, G. G. y Bogosin, G. (1988). Parameters affecting production of bovine somatropin in *E. coli* fermentations. *Develop. Ind. Microbiol*. 29: 257-266.
- Camacho, M.; Muñoz, M. L.; Suarez, C. E.; McGuire, T. C.; Bronw, W. C. y Palmer, G. H. (2000). Expression of polymorphic *msp*1β genes during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia. *Infect. Immun*. 68: 1946-1952.
- Cantor, G.H.; Pontzer, C. H. y Palmer, G.H. (1993). Opsonization of *A. marginale* mediated by bovine antibody against surface protein MSP-1. *Vet. Imunol. Immunopathol*. 37: 343- 350.
- Cossio B., R.; Rodriguez, D. S.; García O.M.; Garica T.D. y Aboytes-Torres, R. (1997). Bovine anaplasmosis prevalence in northern Veracruz state, Mexico. *Pre. Vet. Med*. 32: 165-170.
- Chitravel, V.; Lourdsamy, M.; Ravindranath, T. K.; Prabhakaran, V. y Kokilaprabhakaran, S. (1998). A report on the incidence of anaplasmosis in Jersey bulls. *Indian Vet. J.* 75: 256-257.
- Dame, J. B.; Mahan, S. M. y Yowell, C. A. (1992). Phylogenetic relationship of *Cowdria ruminatum*, agent of heartwater to *Anaplasma marginale* and other members of the order Rickettsiales determined on the basis of 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 42: 270-274.
- Davis, R. W.; Botstein, D. y Roth, J. R. (1980). Advanced bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

- Duzgun, A.; Schunter, C. A. Wright, I. G.; Leatch, G. y Waltisbuhl, D. J. (1988). A sensitive ELISA technique for the diagnosis of *Anaplasma marginale* infections. *Vet. Parasitol*. 29: 1-7.
- Echaide, S. T.; Knowles, D. P.; McGuire, T. C.; Palmer, G. H.; Suarez, C. E. y McElwain, T. F. (1998). Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in an endemic region using nested PCR and recombinant MSP5-cELISA. *Clin. Microbiol*. 36: 777-782.
- Eid, G.; French, D. M.; Lungren, A. M.; Barbet, A. F.; McElwain, T. F. y Palmer, G.H. (1996). Expression of major surface protein 2 antigenic variants during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia. *Infect. Immun.* 64: 836-841.
- Engleberg, N. C. y Eisenstein, B. I. (1984). The impact of new cloning techniques on the diagnosis and treatment of infectious diseases. *N. Engl. J. Med*. 311: 892-901.
- Eriks, I. S.; Palmer, G. H.; McGuire, T. C. y Barbet, A. F. (1989). Detection and quantification of *Anaplasma marginale* in carrier by using a nucleic acid probe. *Clin. Microbiol*. 27: 279- 284.
- Erp, E. y Fahrney, D. (1975). Exit of *Anaplasma marginale* from bovine red blood cells. *Am. J. Vet. Res*. 36: 707-709.
- Fahrimal, Y.; Goff, W. L.; Jasmer, D. P. (1992). Detection of *Babesia* bovis carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. *J. Clin. Microbiol*. 30: 1374-1379.
- Fernández, A. (1998). Caracterización de la expresión de fragmentos genómicos clonados del virus de la enfermedad de Gumboro en células de mamíferos. Tesis de Doctorado, CENSA, La Habana, Cuba.
- Figueroa, J. V.; Chieves, L. P.; Johnson, G. S. y Buening, G. M. (1993). Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet. Parasitol*. 50: 69-81.

- Francis, D.H.; Kinden, D. A. y buening, G. M. (1979). Characterization of the inclusion limiting membrane of *Anaplasma marginale* by immunoferriting labeling. *Am. J. Vet. Res*. 40: 777-782.
- French, D.M.; McElwain, T. F.; McGuire, T. C. y Palmer, G. H. (1998). Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. *Infect. Immun*. 66: 1200- 1207.
- Galade, K. R.; Gartside, M. G.; Dimmock, C. M.; Zakrzewski, H. y Leatch, G. (1996). Peripheral blood lymphocyte proliferate responses in cattle infected with or vaccinate against anaplasmosis. *Parasitol. Res*. 82: 551-562.
- Gale, R. C.; Dimmock, C. M.; Gartside, M. y Leatch, G. (1996). *Anaplasma marginale* detection of carrier cattle by PCR. *Int. J. Parasitol*. 26: 1103-1109.
- García, O. M.; Angeles, O. L.; Hernández, S. G.; García, T. D.; Aboytes-Torres, R. y Rodríguez, C. S. (1998). Caracterización de la virulencia de un aislado mexicano de *Anaplasma marginale*. *Tec. Pecu. Mex*. 36: 197-202.
- Ge, N. L.; Kocan, K. M.; Blouin, E. F. y Murphy, G. L. (1996). Developmental studies of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) infected as adults using nonradiactive in situ hybridization and microscopy. *J. Med. Entomol*., 33: 911-920.
- Ge, N. L.; Kocan, K. M.; Murphy, G. L. y Blouin, E. F. (1997). Development of a nonradioactive in situ hybridization for detection of *Anaplasma marginale* in ticks. *J. Histotechnol*. 20: 103-108.
- Goff, W.; Brbet, A. F.; Stiller, D.; Palmer, G. H.; knowles, D.; Kocan, K.; Gorham J. y McGuire, T. C. (1988). Detection of *Anaplasma marginale* infected tick vectors by using a cloned DNA probe. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 85: 919-923.
- González, . f.; Long, R. F. y Todorovic, R. A. (1978). Comparisons of the complement-fixation, indirect fluorescent antibody, and card agglutination test for the diagnosis of bovine anaplasmosis. *J. Am. Vet. Res*. 39: 1538-1541.
- Guglielmone, A. A.; Anziani, O. S.; Mangold, A. J.; Volpogni, M.N. y Vogel, A. (1996). Enrofloxacin to control *Anaplasma marginale* infections. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 791: 471-472.

- Harlow, E. y Lane, D. (1988). Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory: 559.
- Hidalgo, R. J.; Jones, W. E.; Bronw, J. E. y Ainsworth, J. A. (1989). *Anaplasma marginale* in tick cell culture. *American Journal Veterinary Research*. 50: 2028-2032.
- Johnston, L. A. Y.; Trueman, K. F.; Leatch, G.; y Wilson, A. J. (1980). A comparison of direct fluorescent antibody and Giemsa staining fr the post-mortem diagnosis of anaplasmosis. *Aust. Vet. J.* 56: 116-118.
- Jongejan, F.; Perry, B. D.; Moorhouse, P. D. S.; Musisi, F. L.; Pegram, R. G. y Snacken, M. (1988). Epidemiologic of bovine babesiosis in livestock on St Lucia, 1983. *Trop. Anim. Health Prod*. 20: 137-139.
- Kieser, S. T.; Eriks, I. S. y Palmer, G. H. (1990). Cyclic rickettsemia during persistent anaplasmosis infection in cattle. *Infect. Immun.* 58: 1117-1119.
- Knowles, D.; Torioni- De-Echaide, S.; Palmer, G. H.; McGuire, T. C.; Stiller, D. y McElwain, T. F. (1996). Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *Clin. Micribiol*. 34: 2225-2230.
- Kocan, K. M.; Ge, N. L.; Blouin, E. F. y Murphy, G. L. (1998). Development of a non-radioactive DNA probe and in situ hybridization for detection of *Anaplasma marginale* in tick and cattle. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 791: 157-165.
- Kocan, K. M.; Holbert, D.; Edwars, W.; Ewing, S. A.; Barron, S. J. y Hair, JA. (1986). Longevity of colonies of *Anaplasma marginale* in midget epithelial cells of *Dermadencentor andersoni*. *Am. J. Vet. Res.* 47: 1657-1661.
- Kocan, K. M.; Venable, J. H. y Brck, W. E. (1978). Ultrastructure of anaplasmal inclusions (Pawhuska isolate) and their appendages in intact and hemolized erytrocytesand in complemet–fixation antigen. *Am. J. Vet. Res*. 39: 1123-1130.
- Kroon, J. F.; Perié, N. M.; Franssen, F. y Uilenberg, G. (1990). The indirect fluorescent antibody test for bovine anaplasmosis. *The Veterinary Quarterly.* 12: 124-128.

- Lawrence, J. A.; Foggin, C. M. y Norval, R. A. (1980). The effects of war on the control of diseases of livestock in Rhodesia (Zimbabwe). *Am. J. Vet. Res*. 107: 82-85.
- Losos, G. J. (1986). Anaplasmosis, p. 743-795. *In:* G. J. Losos (ed.), Infectious tropical diseases of domestic animals. Longman House, Essex, U. K.
- Luther, D. G.; Cox, H. V. y Nelson, W. O. (1980). Comparison of serotests with calf inoculation for detection of carriers in anaplasmosis infected cattle. *Am. J. Vet. Res*. 41: 2085-2086.
- Masika, P. J.; Sonandi, A. y Van Averbeke, W. (1997). Perceived causes, diagnosis and treatment of babesiosis and anaplasmosis in cattle by livestock farmers in communal areas of the central Eastern Cape Province, South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc*. 68: 40-44.
- McGarey, D. J. y Allred, D. R, (1994). Characterization of hemaglutinating components of the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. *Infect. Immun*. 62: 4587-4593.
- McGarey, D. J.; Barbet, A. F.; Palmer, G. H.; McGuire, T. C. y Allred, D. R. (1994). Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polipeptides (MSP) 1a and 1b. *Infect. Immun.* 62: 4594-4601.
- McGuire, C. T.; Palmer, G. H.; Goff, W. L.; Johnson, M. I. y Davis, W.C. (1984). Common and isolate-restricted antigens of *Anaplasma marginale* detected with monoclonal antibodies. *Infec. Immun*. 43: 697-700.
- McGuire, T. C.; Davis, W. C.; Brassfield, A. L.; Mclwain, T. F. Y Palmer, G. H. (1991). Identification of *Anaplasma marginale* long-term carrier cattle by detection of serum antibody to isolated MSP3. *J. Clin. Microbiol*. 29: 788-793.
- McGuire, T. C.; Musoke, A. J. y Kurtti, T. (1979). Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement macrophages, neutrophils and skin. *Immunol*. 38: 249-256.
- Montenegro-James, S.; Guillen, A. T. y Toro, M. (1992). Dot-ELISA para el diagnóstico serológico de anaplasmosis y babesiosis bovinas. *Rvta. Cub. Cienc. Vet.* 23: 15-24.

- Montenegro-James, S.; James, M. A. y Ristic, M. (1985). Efficacy of purified *Anaplasma marginale* initial bodies as a vaccine against anaplasmosis. *Parasitol. Res*. 77: 93-101.
- Munderloh, U. G.; Blowin, E. F.; Kocan, K. M.; ge-Nie Lin, Edwars, W. L. Y Kurtti, T. J. (1996). Stablishment of the tick (Acari: Ixodidae)- borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in tick cell culture.*J. Med. Entomol*. 32: 656-664.
- Munodzana, D.; McElwain, T. F.; Knowles, D.P. y Palmer, G. H. (1998). Conformational dependence of *Anaplasma marginale* MSP5 surface exposed B cell epitopes. *Infect. Immun*. 66: 2619-2624.
- Nakamura, Y.; Shimizu, S.; Minami, T. y Ito, S. (1988). Enzime-linked immunosorbent assay using solubilised antigen for detection of antibodies to *Anaplasma marginale*. *Trop. Anim. Hlth. Prod*. 20: 259-266.
- Narciandi, R. E. (1999). Desarrollo y producción de las principals proteínas recombinantes del VIH 1 y 2. Tesis de Doctorado, CIGB, La Habana, Cuba.
- Ndung´u, L.W.; Aguirre, C.; Rurangirwa, R. R.; McElwain, T. F.; McGuire, T. C.; Knowles, D. P. y Palmer, G. H. (1995). Detection of *Anaplasma ovis* infection in goats using the MSP5 competitive inhibition Enzime-linked. *J. Clin. Microbiol*. 33: 675-679.
- Oberle , S.; Palmer, G. H.; Barbet, A. F. y McGuire, T. C. (1988). Molecular size variations in an inmunoprotective complex among isolates of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun*. 56(6): 1557-1563.
- Oberle, S. M.; Palmer, G. H. y Barbet, A. F. (1993): Expression and inmune recognition of the conserved MSP4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun*. 61(12):5245-5251.
- Palmer G. H.; Rurangirwa, F. R.; Kocan, K. M. y Brown, W.C. (1999). Molecular basis for vaccine development against ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitol. Today* . 7:281-286.
- Palmer, G. H. y McElwain, T. F. (1995). Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Vet. Parasit*. 57: 233-253.

- Palmer, G. H. y McGuire, T. C. (1984). Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *Infect*. *Immun.* 13: 1010-1015.
- Palmer, G. H. y McGuire, T. C. (1990). Rickettsial antigens for vaccination and diagnosis, Washington State University Research Fundation.
- Palmer, G. H.; Abbott, J. r.; French, D. M. y McElwain, T. F. (1998). Persistence of *Anaplasma ovis* infection and conservation of the MSP2 and MSP3 multigene families within the genus Anaplasmataceae) to calves and shep. *J. Med. Entomol*. 36: 321-324.
- Palmer, G. H.; Barbet, A. F.; Cantor, G. H. y McGuire, T. C. (1989). Immunization of cattle with the MSP1 surface protein complex induces protection against a structurally variant *Anaplasma marginale* isolate. *Infect. Immun*. 59: 3340-3342.
- Palmer, G. H.; Barbet, A. F.; Kuttler, K.L. y McGuire, T.C. (1986). Detection of *Anaplasma marginale* common surface proteins in all stages of infection. *J. Clin. Micribiol*. 23: 1078-1083.
- Palmer, G. H.; Barbet, A. F.; Musoke, A. J.; Katende, J. M.; Rurangirwa, F.; Shkap, V.; Pipano, E.; Davis, W. C.; McGuire, T. C. (1988a). Recognition of conserved surface protein epitopes on *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale* isolates from Israel, Kenia y The United States. *International Journal for Parasitology*. 18: 33-38.
- Palmer, G. H.; Eid, G.; Barbet, A. F.; McGuire, T. C. y McElwain, T. F. (1994). The immunoprotective *Anaplasma marginale* major surface protein-2 (MSP2) is encoded by a polymorphic multigene family. *Infect. Immun.* 62: 3808-3816.
- Palmer, G. H.; Kocan, K. M.; Barron, S. J.; Hair, J. A.; Barbet, A. F.; Davis, W. C. y McGuire, T. C. (1985). Presence of common antigens, including major surface protein epitopes, between the cattle (intraerythrocytic) and tick stage of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immnun.* 50: 881-886.
- Palmer, G. H.; Oberle, S. M.; Barbet, A. F.; Davis, W. C. Goff, W. L. y McGuire, T. C. (1988). Immunization with a 36 kDa surface protein induces protection

against homologous and heterologous *Anaplasma marginale* challenge. *Infect. Immun.* 56: 1526-1531.

- Philippe, P.; Kato, H.; Sumimoto, H.; Kretzschmar, M. y Roeder, R. G. (1991). A quick procedure for purification of functional recombinant proteins over-expressed in *E. coli*. *Nucleid Acids Researchs.* 19: 23.
- Potgieter, F. T.; Kocan, K.; McNew, R. W. y Ewing, S. A. (1993). Demonstration of colonies of *Anaplasma marginale* in the midget of *Riphicephalus simus*. *Am. J. Vet. Res*. 44: 2256-2261.
- Ribeiro, M. F. Y Lima, J. D. (1995). Influence and development of *Anaplasma marginale* in midget of engorged female ticks of *Boophilus microplus. Vet. Parasitol*. 61: 31-39.
- Ribeiro, M. F.; Passos, L. M. (1996). Ultrastructural alterations on *Anaplasma marginale* caused by dimethyl sulfoxide. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 48: 657-664.
- Richey, E. J. (1981). Bovine anaplasmosis, in Current Veterinary Theraphy Food Prctice, Howard, R. J., Ed., W. B. Saunders. Philadelphia, 767.
- Richey, E. J. y Palmer, G. H. (1990). Bovine Anaplasmosis. The Compendium Food Animal. 12: 1661-1669.
- Ristic, M. (1968). Anaplasmosis. p. 474-537. *In*: Blood Diseases of Man and Animals. Vol. II. Weinman, D. Ristic, M, (eds)). Academic Press, Inc., New York, NY.
- Ristic, M. (1980). Anaplasmosis.; 324-348. In: Bovine Medicine and Surgey. Ed. by H. I. Amstutz, Am. Veterinary Publications, Inc. 2nd. Ed. Vol. I. Santa Bárbara. California.
- Ristic, M. y Watrach, A. M. (1963). Anaplasmosis. VI. Studies snd hypothesis concerning the cycle of development of the causative agent. *Am. Vet. Res*. 24: 267-277.
- Ristic, M. y Kreir, J. P. (1984). Anaplasma. p. 719-722. *In*: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Kreig, N. R., Holt, J. B. (eds.) Vol. 1, Baltimore Willians and Wilkins.

- Rodríguez, M. (1996). Desarrollo de una vacuna recombinante contra la garrapata *Boophilus microplus*. Tesis de Doctorado. CIGB. La Habana, Cuba.
- Ryu, D. D. y Lee, S. B. (1987). Development and optimization of recombinant fermentation processes. *In*: Horizons of Biochemical Engineering (Ed. S. Aiba). University of Tokyo Press. 97-124.
- Sachse, K.; Grojetzki, C.; Pfutzer, H, y Hass, R. 81992). Comparison of *Mycoplasma bovis* strains based on SDS-PAGE and immunoblot patterns. *J. Vet. Med*. 39: 246-252.
- Saito, S.; Fijisawa, A.; Ohkawa, S.; Nishimura, N.; Abe, T.; Kodama, K.; Kamogawa, K.; Aoyama, S.; Iritani, Y. Y Hayashi, Y (1993). Cloning and DNA sequence of a 29 kDa polipeptide gene of *Mycoplasma gallisepticum* as a possible protective antigen. Vaccine. 11: 1061-1066.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. y maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A Laboratry Manual. Cold Spring harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory.
- Shepard, H. M.; Yelverton, E. y Goeddel, D. V. (1982). Increased synthesis in *E. coli* of fibroblast and leukocyte interferons through alterations in ribosome binding sites. *DNA*. 1: 125-131.
- Shkap, V.; Pipano, E.; McGuire, T. C. y Palmer, G. H. (1991). Identification of immunodominant polypeptides common between *Anaplasma centrale* y *Anaplasma marginale*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 29: 31-40.
- Shompole, S. P.; Waghela, S. D.; Rurangirwa, F. R. y McGuire, T. C. (1989). Cloned DNA probes identify *Anaplasma ovis* in goats and reveal a high prevalence of infection. *J. Clin. Microbiol*. 27: 2730-2735.
- Sobrin, F. (1991). PC/Gene: The nucleic acid and protein sequence analysis software system.
- Stich, R. W.; Bantle, J. A.; Kocan, K. C.; Eriks, J. S. y Palmer, G. H. (1991). Preliminary development of a Polymerase Chain Reaction assay for *Anaplasma marginale* in ticks. *Infect. Inmun*.: 269-274.

- Stich, R. W.; Kocan, K. M.; Damian, R. T., Fechheimer, M. (1997). Inclusion appendages associated with the intraerythrocytic rickettsial parasite *Anaplasma marginale* are composed of bundled actin filaments. *Protoplasma*. 199: 93-98.
- Stich, R. W.; Sauer, J. R.; Bantle, J. A. y Kocan, K. C. (1993). Detection of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in secretagogue-induced secretions of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) with the polymerase chain reaction. *Medical Entomology*. 30: 789- 794.
- Swift, B. L. y Thom, G. M. (1983). Bovine anaplasmosis elimination of the carrier state with injectable blong-acting oxytetracicline. *Am. J. Vet. Med. Assoc*. 183: 63-65.
- Tebele, N. y McGuire, T. C. (1991). Induction of protective immunity using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infect. Immun.*. 59: 3199-3204.
- Trueblood, E. S.; McGuire, T. C. y Palmer, . H. (1991). Detection of *Anaplasma marginale* rickettsemia prior to onset of clinical signs by using an antigen capture enzyme linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1542-1544.
- Trueblood, S. E. y Palmer, G. H. (1998). Anaplasmosis: A Review of Diagnostic Techniques. 8th National Veterinary hemoparasite Disease Conference.
- Vaquerino, C. y Daposo, J. (1995-1996). Programa desarrollado por el departamento I+D de tecnología para el diagnóstico e investigación. S. A. Madrid. España.
- Vidotto, M.; McGuire, T.C.; McElwain, T. F.; Palmer, G. H. y Knowles D. P. (1994). Intermolecular relationships of major surface proteins of *A. marginale*. *Infect. Immun*. 62: 2940-2946.
- Vilenberg, G. (1990). Present and future posibilities for the control of the cowdriosis and anaplasmosis. *The Veterinary Quaterly*. 12: 1-3.
- Visser, E. S.; McGuire, . C.; Palmer, G. H.; Davis, W. C.; Shkap, V.; Pipano, E. y Knowles, D. P. JR. (1992). The *Anaplasma marginale msp*5 genes encoded 19 kDa protein conserved in all recognized Anaplasma species. *Infect. Immun*. 60: 5139-5144.

- Visser, E. y Ambrosio, R. E. (1987). DNA probes for detection of *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale. Onderstepoort. J. vet. Res*. 54: 623-627.
- Walade, S. M.; Young, A. S. y Marzaria, S. P. (1996). Artificial feeding of Ixoded ticks. *Parasitol. Today*. 12: 272-278.
- Walker, D. H. y Dumber, S. D. (1996). Emergence of the ehrlichioses as human health problems. *Emerging Infect.* 2: 18-29.
- With, D. F.; ogers, W. O.; Barker, .; Dourado, Jr. H.; Suesebang, L. y Albuquerque, B. (1986). Leishmaniasis and malaria: new tools for epidemiologic analysis. *Science*. 234: 975-979.
- World Organization for Animal Health. (1996). Manual of standards for diagnostic test and vaccines: 295-300. World Organization for Animal Health, Paris, France.
- Wyatt, C. R.; Davis, W. C.; Knowles, D. P.; Goff, W. L.; Palmer, G. H. y McGuire, T. C. (1996). Effect on intraerythrocytic *Anaplasma marginale* of soluble factors from infected calf blood mononuclear cells. *Infect. Immun*. 64: 4846-4849.
- Yeruham, J. y Braverman, Y. (1981). The transmission of *Anaplasma marginale* to cattle by blood- sucking arthropods. *Refuah. Vet*. 38: 37-44.
- Zabriskie, D. W. y Arcuri, E. J. (1986). Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganism. *Enzyme Microb. Technol*. 6: 706-717.
- Zaugg, J. L. (1990). Seasonally of natural transmission of bovine anaplasmosis under desert mountain range conditions. *Jauma.* 196: 1106-1109.
- Zaugg, J. L.; Goff, W. L.; Foreyt, W. y Hunter, D. L. (1996). Susceptibility of elk (*Cervus elaphus*) to experimental infection with *Anaplasma marginale* y *Anaplasma ovis*. *J. Wildl. Dis.* 32: 62-66.
- Zaugg, J. L.; Stiller, D.; Coan, M. E. y Lincoln, S. D. (1986). Transmission of *Anaplasma marginale* (Theiler) by males of *Dermacentor andersoni* (Stiles) fed on an Idaho field infected chronic carrier cow. *Am. J. Vet. Res*. 47: 2269-2271.

1. Realizar la purificación de la proteína recombinante H-MSP5.
2. Diseñar y desarrollar un juego de diagnóstico de formato simple a partir de este antígeno recombinante obtenido.
3. Realizar la validación de este juego de diagnóstico obtenido en condiciones de campo.

ANEXO 1

MEDIOS, SOLUCIONES Y MARCADORES DE PESO MOLECULAR

MEDIOS:

LB

Triptona----------10 g

NaCl----------10 g

Extracto de levadura----------5 g

H_2O estéril----------1000 mL

pH 7.5

Los medios LBA, líquido y sólido (presenta agar bacteriológico al 1.5%), contienen ampicillina a una concentración final de 100 μg/mL.

SOLUCIONES:

Solución tampón muestra 2X

1.23 mL de Tris-HCl pH 6.8

1 mL de β- mercaptoetanol

2 mL de SDS (20%)

2 mL de glicerol

2 mg de bromofenol azul

Completar con H_2O estéril hasta 10 mL

Solución de PBS

8 g de NaCl

0.2 g de KCl

1.5 g de Na_2HPO_4

0.2 g de KH_2PO_4

1000 mL de H_2O estéril

pH 7.2-7.4

PBS-Tween 20 0.05%

50 μL de Tween 20 para 100 mL de H_2O

Solución de Coomassie

40 mL de etanol

10 mL de ácido acético

50 mL de H_2O estéril

0.1 g de colorante de Coomassie

Solución colorante Rojo Ponceau

20 mL de Rojo Ponceau S 2%

Completar a 200 mL de H_2O

Sustrato del conjugado peroxidasa

9 mg de diaminobencidina

18 mL de PBS

9 μL de H_2O_2

MARCADORES DE PESO MOLECULAR

Marcador de proteínas (Standards, broad range 6.5- 200 kDa, Bio-Rad)

200 kDa

116 kDa

97. 400 kDa

66. 200 kDa

45 kDa

31 kDa

21. 500 kDa

14. 400 kDa

6. 500 kDa

Marcador de ADN (1 kb DNA Ladder, SIGMA, 0.5-10 kb)

10.0

8.0

6.0

5.0

4.0

3.0

2.5

2.0

1.5

1.0

0.5