UNIVERSIDAD AGRARIA DE LA HABANA

FRUCTUOSO RODRÍGUEZ PÉREZ

CENTRO NACIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA

TESIS EN OPCIÓN AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

Utilización del gen msp5 y de la proteína MSP5 recombinante del aislamiento Habana de *Anaplasma marginale* en la detección de la anaplasmosis bovina subclínica

AUTOR: *Lic. Belkis Corona González, MsC*

TUTOR: *Dra. Siomara Martínez Marrero, DrC*

La Habana, 2004

A mi hijo Cristian

INDICE

	Págs.
INTRODUCION	1
CAPÍTULO 1. REVISION BIBLIOGRAFICA	4
1.1. Generalidades de *Anaplasma marginale*	4
1.1.1. Clasificación taxonómica	4
1.1.2. Caracteres morfofuncionales y culturales	5
1.1.3. Biología Molecular de *A. marginale*	7
1.1.4. Proteínas de los cuerpos iniciales	9
1.2. Características de la enfermedad	12
1.2.1. Incidencia mundial de la enfermedad	12
1.2.2. Transmisión	13
1.2.3. Patogenia y síntomas clínicos	16
1.2.4. Inmunidad y resistencia	18
1.2.5. Epidemiología y control de la anaplasmosis	20
1.2.5. 1. Tratamiento y control	20
1.3. Diagnóstico de la enfermedad	21
1.3.1. Identificación del agente	22
1.3.1.1. Estandar de oro	22
1.3.1.2. Tinción de Giemsa	22
1.3.1.3. ELISA para detectar antígeno	23
1.3.1.4 Técnicas moleculares	23

1.3.2. Diagnóstico serológico 25
1.3.2.1 Fijación del complemento 26
1.3.2.2. Pruebas de aglutinación 26
1.3.2.3. Inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos (IFI) 27
1.3.2.4. Dot-ELISA y ELISA 27
2.1. *Escherichia coli* como sistema de expresión de proteínas recombinantes 28
2.1.1. Fermentación de proteínas recombinantes expresadas en *E. coli*. 30

2.1.1.1. Purificación de proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* 30
3.1. Inmunoensayos cromatográficos 32
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES 34
2.1. Medios de cultivo y soluciones 34
2.2. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo 34
2.3. Plásmido utilizado 34
2.4. Aislamientos de *Anaplasma marginale, Babesia, bovis, Babesia bigemina* y *Tripanosoma* spp. 35
2.5. Antisueros policlonales y anticuerpos monoclonales utilizados 35
2.6. Conjugados utilizados 36
2.7. Digestiones con enzimas de restricción y tratamiento con enzimas de modificación 36
2.8. Electroforesis de ADN en geles de agarosa 36
2.9. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12% 36
2.10. Detección inmunológica 37
2.11. Determinación de la turbidometría 38
2.12. Determinación de la concentración de proteínas 38
2.13. Programas utilizados para el análisis de los resultados 38
2.14. Conservación de las cepas 38
2.15. Obtención de animales experimentalmente infectados con *A. marginale* 39
2.16. Animales negativos a *A. marginale* 39
CAPÍTULO 3. Amplificación del gen msp5 de *A. marginale* en aislamientos de diferentes regiones geográficas de Cuba. Clonaje, secuenciación y expresión del gen msp5 del aislamiento Habana 40
3.1. Introducción 40
3.2. Experimento 1: Amplificación del gen msp5 de *Anaplasma marginale* en aislamientos de diferentes regiones geográficas de Cuba 41
3.2.1. Materiales y Métodos 41
3.3. Experimento 2: Clonaje, secuenciación y expresión del gen *msp*5 del aislamiento 42

Habana de *A. marginale*.
3.3.1. Materiales y Métodos 43
3.4. Resultados y Discusión 45
3.5. Conclusiones parciales 57
CAPÍTULO 4. Cinética de crecimiento de la cepa recombinante de *Escherichia coli,* BL21DE3pLysS/pHMSP5. Expresión, solubilización y purificación de la proteína HMSP5 a escala de laboratorio 58
4.1. Introducción 58
4.2. Experimento 1: Evaluación de las condiciones óptimas para la obtención de la proteína recombinante HMSP5 en condiciones de laboratorio 59
4.2.1. Materiales y Métodos 59
4.3. Experimento 2: Estudios de las condiciones de solubilización y purificación de la proteína recombinante HMSP5, obtenida en condiciones de laboratorio 62
4.3.1. Materiales y Métodos 62
4.5. Resultados y Discusión 65
4.6. Conclusiones parciales 80
CAPÍTULO 5: Utilización del gen msp5 y de la proteína recombinante HMSP5 en la detección de *A. marginale* y anticuerpos contra este, en animales de tres unidades de la provincia La Habana 81
5.1. Introducción. 81
5.2. Experimento 1: Detección de *A. marginale* mediante la amplificación por PCR del gen msp5 en animales experimentalmente infectados y muestras de animales explotación 82
5.2.1. Materiales y Métodos 82
5.3. Experimento 2: Detección de anticuerpos contra *A. marginale* en animales en explotación, mediante un ensayo inmunocromatográfico rápido, utilizando la proteína HMSP5 86
5.3.1. Materiales y Métodos 86
5.4. Resultados y Discusión 87
5.5. Conclusiones parciales 101
CAPÍTULO 6: Discusión General 104
CONCLUSIONES FINALES 108

RECOMENDACIONES 109
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
ANEXOS

INTRODUCCIÓN

Anaplasma marginale es una rickettsia del genogrupo II de las Ehrlichias, que parasita 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).

Se han caracterizado seis proteínas de superficie de membrana de los cuerpos iniciales de este organismo, portadoras de epitopes 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. 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).

El gen msp5 está representado en el genoma como una simple copia, altamente conservado entre todas las especies de *Anaplasma* y todas las

cepas de *A. marginale* estudiadas. Por su parte, la proteína MSP5, para la cual codifica, es de poca complejidad estructural, igualmente conservada (Visser y col., 1992) e induce altos título de anticuerpos (Knowles y col., 1996), por lo que constituyen fuertes candidatos para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina.

En Cuba, durante muchos años, esta enfermedad constituyó una de las principales causas de mortalidad en el ganado bovino. Sin embargo, en los últimos años hay un cambio positivo con relación a la misma. En el 3er trimestre del año 2003, se reportó una disminución record, del número de focos, enfermos y muertos por la enfermedad, analizándose la necesidad de

fortalecer el trabajo diagnóstico de las enfermedades transmitidas por garrapatas (Informe de Balance, 3er Trimestre 2003, IMV).

A pesar de las cuantiosas pérdidas económicas producidas todos los años, a nivel mundial hasta el momento no se cuenta con un método de control eficaz contra la enfermedad, por lo que resulta de gran importancia desarrollar una vacuna capaz de prevenir la infección con este patógeno y contar con técnicas de diagnóstico más sensibles y específicas que permitan la detección de animales portadores para ser utilizadas en estudios epizootiológicos y para el control de la enfermedad (Camacho y col., 2000).

Para el diagnóstico de la anaplasmosis se utilizan diferentes técnicas, dentro de las que se incluyen, para la detección del agente, la tinción con Giemsa a los frotis sanguíneos, que se utiliza para casos clínicos de la enfermedad; la inoculación de animales esplenectomizados, que constituye el estándar de oro del diagnóstico de la enfermedad, pero que no resulta un sistema práctico para el diagnóstico de rutina (Visser y Ambrosio, 1987) y los métodos de diagnóstico molecular, los cuales se utilizan en la actualidad para el movimiento internacional de ganado, debido a su sensibilidad y especificidad (Manual de la OIE, 2004).

Para la detección de anticuerpos, la fijación del complemento fue muy utilizada hasta hace unas décadas, pero en estos momentos no se utiliza para la detección de animales asintomáticos debido a su baja sensibilidad (Manual de la OIE, 2004). En la actualidad, la aglutinación en tarjeta, la inmunofluorescencia indirecta y las pruebas ELISA son las más utilizadas para la detección de anticuerpos, pero muchas de estas técnicas utilizan antígenos crudos, contaminados con membranas del eritrocito, lo que da como resultado un número elevado de falsos negativos cuando se analizan animales persistentemente infectados (Kocan y col., 1996). Existen reportes de un ELISA desarrollado a partir de un antígeno recombinante de *A. marginale*, (Torioni y col., 1998). Esta técnica aunque posee un alta sensibilidad y especificidad tiene desventajas para su aplicación en campo, como son la utilización de equipamiento, la necesidad de controlar la eficiencia de los reactivos comerciales, además de no ser un ensayo rápido,

ni de fácil manipulación (Moros y col., 2003). Ante estos inconvenientes, los ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral, constituyen un instrumento de gran utilidad, pues permiten la obtención rápida de datos confiables sobre diversas afecciones (Pemawansa y col., 1990), además de ser ensayos muy versátiles y fáciles de realizar al lado del animal, sin necesidad de equipamiento, a lo que se debe agregar el bajo costo de los mimos.

Por todos estos antecedentes nos propusimos la siguiente hipótesis de trabajo:

HIPÓTESIS:

Un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral, con la utilización de la proteína recombinante MSP5 del aislamiento Habana de *A. marginale,* es factible de utilizarse para la detección de la anaplasmosis subclínica.

OBJETIVO GENERAL:

Utilizar el gen msp5 y la proteína recombinante MSP5 del aislamiento Habana en la detección de la anaplasmosis subclínica.

OBJETIVOS PARCIALES:

1. Obtener un clon recombinante que exprese el gen msp5 del aislamiento Habana de *Anaplasma marginale*.
2. Establecer un procedimiento para la obtención y purificación de la proteína recombinante HMSP5.
3. Desarrollar un ensayo de PCR a partir del gen msp5 y demostrar la factibilidad de uso de la proteína HMSP5 en un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral para la detección de la anaplasmosis subclínica.

CAPÍTULO 1: Revisión Bibliográfica

1.1. Generalidades de *Anaplasma marginale*

1.1.1. Clasificación taxonómica

Anaplasma marginale se consideró como un protozoo hemático durante mucho tiempo. Las investigaciones ulteriores demostraron que se clasifica dentro del orden Rickettsiales, familia *Anaplasmataceae*, género *Anaplasma* (Ristic y Kreier, 1984). El análisis filogenético, utilizando secuencias de la región 16S del ARNr, permitió esclarecer la relación dentro de los genogrupos de las especies de Ehrlichias, situando a *A. marginale* dentro del árbol filogenético, en el genogrupo II de las Ehrlichias, las cuales son patógenos de animales y humanos que se transmiten por garrapatas (Biberstein, 1999).

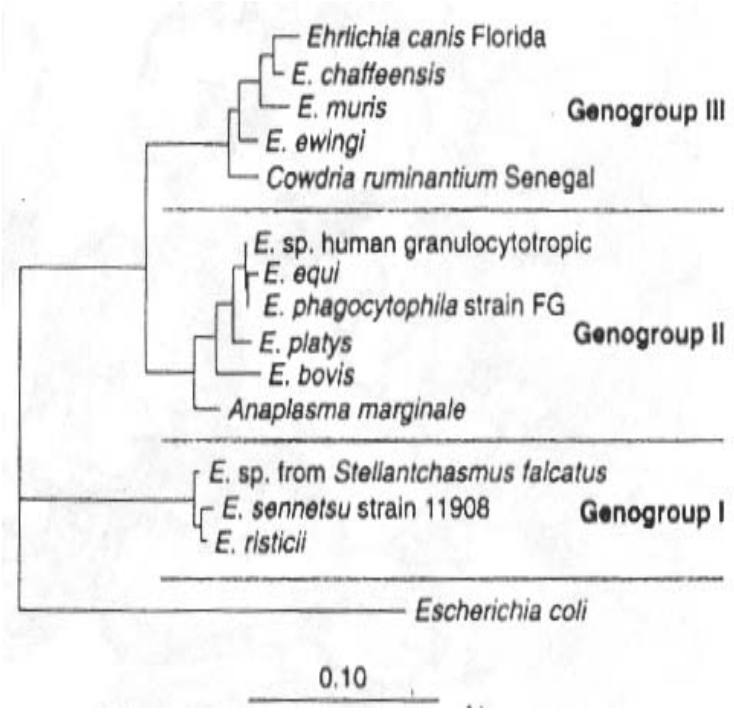


Figura 1: Árbol filogenético de algunas *Ehrlichias,* basado en las secuencias de genes de ARNr 16S. La escala de las barras representa sustituciones de 10 nucleótidos por cada 100 bases (Mahan y col., 1999).

Se conocen cuatro especies del género *Anaplasma*, como agentes causantes de la anaplasmosis: *A. marginale*, que es la más patógena para los bovinos; *A. centrale*, causante de una relativa forma benigna de anaplasmosis en bovinos; *A. caudatum* también en ganado bovino y *A. ovis*, causante de un padecimiento limitado a ovinos y caprinos (Ristic y Kreir, 1984), siendo *A. marginale* la única especie identificada en Cuba (Alonso y col., 1989). La secuencia nucleotídica de la región 16S del ARNr de *A. centrale* está estrechamente relacionada con la secuencia de *A. marginale* con un 98.08 % de identidad (Inokuma y col., 2001).

Dumler y col., (2001), propusieron que en la familia *Anaplasmataceae* se incluyeran especies del género *Wolbachia*, *Ehrlichia*, *Cowdria* y *Neorickettsia* y conservar los géneros *Anaplasma* y *Aegyptianella* dentro de la familia. Propusieron, además que miembros del grupo de *E. phagocytophila*, incluyendo *E. phagocytophila*, *E. equis*, *E. granulocítica* humana (HGE), así como *E. bovis* y *E. platys* debían ser unidos con el género *Anaplasma*. Cada uno de estos agentes persiste en sus respectivos hospederos mamíferos y se transmite dentro y no entre las generaciones del vector biológico. Por otra parte, se han encontrado genes homólogos entre los miembros de este grupo, algunos de los cuales son miembros de familias de multigenes que pueden estar arreglados en *"tandem"* o dispersos en el cromosoma (Dame y col., 1992; Walker y Dumler, 1996).

1.1.2. Caracteres morfofuncionales y culturales

A. marginale es un microorganismo sin forma definida. Se establecieron tres categorías de acuerdo a su talla: El clásico cuerpo marginale, una forma intermedia cuerpo inicial y la de tamaño pequeño conocido como cuerpo polihédrico (Ristic y Watrach, 1963; Palmer y McGuire, 1984; Ristic y Kreier, 1984).

En los hospederos vertebrados, *Anaplasma* spp. 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. 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; Palmer y McGuire, 1984; Ristic y

Kreier, 1984). Posteriormente, los organismos 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 y está formado 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).

Nakamura y col., (1989) demostraron la presencia de carbohidratos en la superficie de los cuerpos iniciales de *A. marginale*, pero al parecer éstos no son importantes en la hemaglutinación de los cuerpos iniciales, ya que cuando se trató con $NaIO_4$ o neuroaminidasa, no se encontraron diferencias con respecto al control. Esto sugiere que aparentemente los carbohidratos de superficie de los cuerpos iniciales no juegan un papel importante en la adhesión de *A. marginale.* Cuando se trataron los eritrocitos bovinos con α quimotripsina o neuroaminidasa, fue evidente la pérdida de la hemaglutinación, no así cuando se siguió el tratamiento con tripsina y varias fosfolipasas, lo que sugirió que el ligando del receptor de los eritrocitos está compuesto parcialmente por proteína y/o ácido siálico (McGarey y Allred, 1994).

Este hemoparásito se caracteriza además, por producir catalasas, no producir pigmentos y 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 y a rayos X o a sonicación a 35°C por 90 minutos. (Ristic y Kreier, 1984).

En Brasil se detectaron y aislaron 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 localizado en la unión entre la membrana de inclusión y el apéndice. Este apéndice permanece en las células huéspedes, incluso aún después que *A.*

marginale abandonan los glóbulos rojos (Ribeiro y Passos, 1996; Stich y col., 1997).

A. marginale se logró cultivar, pero por cortos períodos de tiempo, mediante la propagación del parásito en un cultivo 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). Sin embargo, Munderloh y col., (1996), lograron propagar continuamente esta rickettsia en una línea celular derivada de *Ixodes scapularis*, usando como inóculo sangre de bovino infectado. Un segundo aislamiento, 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 (Blouin y col., 1998).

1.1.3. Biología Molecular de *A. marginale*

A. marginale presenta un ADN circular de doble cadena, cuya talla total oscila entre 1 200 y 1 250 kpb, determinado por los análisis de restricción realizados al genoma de la cepa Florida, con las enzimas *Sfi* I y *Pac* I. El análisis en electroforesis de campo pulsante, de los productos de las digestiones, realizadas al genoma de diferentes cepas, dio como resultado la existencia de un considerable polimorfismo entre estas, aunque la talla total del genoma es constante, con un contenido de G + C de 56 %, lo cual se determinó por análisis espectral (Alleman y col., 1993).

En este parásito se describen seis genes (*msp*1α, *msp*1β, *msp*2, *msp*3, *msp*4 y *msp*5), que codifican para las proteínas principales de superficie de los cuerpos iniciales, que constituyen blancos de la respuesta inmune del hospedero contra el patógeno (Palmer y McGuire, 1984; Tebele y McGuire, 1991). Hasta la fecha varios de los genes que codifican para las MSPs se han clonado, secuenciado y expresado (Barbet y col., 1986; Allred y col., 1990;

Barbet y Allred, 1991; Visser y col., 1992; Oberle y col., 1993; Alleman y col., 1998). Estos trabajos han revelado que algunos de estos genes son polimórficos entre cepas y existen en familias de multigenes.

El gen msp1α codifica para la proteína de membrana MSP1a y se encuentra representado en el genoma por una simple copia. Posee una gran similitud con los genes de *E. coli*, en cuanto a las secuencias consenso de la región promotora, sin embargo, no se ha detectado una secuencia con similitud a la de Shine-Delgarno de *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 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 (Palmer y McGuire, 1990; de la Fuente y col., 2002a; de la Fuente y col., 2002b) y 5 veces en el aislamiento Habana (Corona y col., 2002), de ahí el alto polimorfismo de talla observado, por lo que se ha utilizado para la diferenciación y detección específica de aislamientos de *A. marginale* (Lew y col., 2002).

Por su parte, el gen msp1β está formado por una familia de multigenes, compuesta al menos por cuatro copias (Camacho y col., 2000). Este gen también presenta dominios de secuencias repetidas, al igual que *msp*1α, aunque son de menor extensión. Por ensayos de RFLP, 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 msp2 está formado por una familia multigénica. Presenta una gran variabilidad fundamentalmente en su extremo 5' (Palmer y col., 1994) y 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; French y col., 1998).

El gen msp3 forma parte también de una familia multigénica, cuyas copias se encuentran ampliamente distribuidas a través del cromosoma (Alleman y Barbet, 1996). El análisis de la secuencia de tres genes reveló regiones conservadas y regiones variables dentro del marco abierto de lectura de los mismos. Este gen codifica para una proteína de 86 kDa, que es considerada un antígeno inmunodominante (Palmer y col., 1986; McGuire y col., 1991).

El gen msp4 se encuentra como una simple copia en el genoma de *A. marginale* y codifica para una proteína de 31 kDa (MSP4) (Oberle y col., 1988, Palmer y col., 1988). Un rasgo peculiar de este gen, es que la secuencia de la región 3' contiene repeticiones imperfectas invertidas que exhiben abundantes estructuras secundarias (Oberle y col., 1993). de la Fuente y col., (2002a), han demostrado que este gen proporciona información filogenética sobre la evolución de los aislamientos de *A. marginale,* a diferencia del gen msp1α, que puede brindar información filogeográfica, sólo cuando se analizan un gran número de aislamientos de un área geográfica.

El gen msp5 está representado en el genoma como una simple copia, altamente conservada entre las cepas de *A. marginale* estudiadas. La presencia del gen en todas las especies de *Anaplasma*, incluyendo *A. ovis,* sugiere que este gen es esencial en el ciclo de vida del parásito, lo que avala el uso del mismo para el desarrollo de procedimientos de diagnóstico molecular. Se han identificado elementos de control procariontes en la secuencia de este gen, los cuales son funcionales en la bacteria *E. coli* (Visser y col., 1992).

1.1.4. Proteínas de los cuerpos iniciales

Como se ha mencionado anteriormente, se han caracterizado seis MSPs, denominadas: MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 (Palmer y McGuire, 1984) y MSP5 (Tebele y McGuire, 1991).

Estas proteínas presentan un polimorfismo variable entre distintos aislamientos de *A. marginale*. Se encuentran en una estrecha relación intermolecular en la superficie de membrana de los cuerpos iniciales (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 (Barbet y Allred, 1991; Tebele y McGuire, 1991; Palmer y McElwain, 1995; 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 funcionan 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 éstos. 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).

La inmunización del ganado bovino con la proteína MSP1 nativa purificada confiere protección contra la rickettsemia aguda. 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 este momento (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 y MSP4. Sus subunidades están unidas mediante puentes disulfuro, es relativamente inmunodominante y posee un peso molecular de 36 kDa (Palmer y col., 1988b; Palmer y McElwain, 1995). Esta proteína es altamente polimórfica, con presencia de epitopes conservados (Palmer y col., 1994), aunque presenta epitopes 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). La conservación de la estructura genómica para la generación de variantes de MSP2 y de epitopes $CD4^+$ en *A. marginale* y *A. centrale* indica que estas dos especies presentan un repertorio similar de epitopes MSP2 al sistema inmune y esto puede ser responsable de la eficacia de protección contra *A. marginale* cuando se prueban vacunas de *A. centrale* (Brayton y col., 2002; Shkap y col., 2002).

La MSP3 está codificada por una familia multigénica, 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 estructural y antigénicamente diferente entre cepas de *A. marginale,* presenta polimorfismo de talla entre aislamientos geográficamente diferentes (Alleman y Barbet, 1996) y es expresada por un simple *"locus"*, en el cual la variación de los genes msp3 expresados es generada por recombinación utilizando seudogenes (Meeus y col., 2003).

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 Barbet, 1996). Sus epitopes 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 y que tanto la nativa como la recombinante protegen a animales inmunizados en retos con cepas homólogas (McGarey y col., 1994).

Otra de las proteínas, con una talla conservada entre todos los aislamientos y presente en todas las especies conocidas de *Anaplasma* spp., 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. Se encuentra formando un dímero en la membrana, cuyas subunidades se unen por puentes disulfuros. La proteína nativa y la recombinante muestran un epitope reconocido por el anticuerpo monoclonal AnaF16C1 (Visser y col., 1992), presente en los estadios del parásito en la garrapata y en la forma intraeritrocítica, utilizándose en ensayos de ELISA competitivo, para la identificación de los animales infectados persistentemente (Knowles y col., 1996). Este epitope induce altos títulos de anticuerpos en todas las especies infectadas, incluyendo bovinos, chivos y carneros (Visser y col., 1992; Ndung´u y col., 1995; Knowles y col., 1996; Munodzana y col., 1998; Torioni y col., 1998).

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

Kano y col., (2002), realizaron la caracterización antigénica de aislados de *A. marginale* de diferentes regiones geográficas de Brasil y en todos los aislados estudiados estuvo presente la proteína MSP5, lo que coincidió con previos estudios realizados que demostraban la conservación de esta proteína en aislamientos de América, África e Israel (Visser y col., 1992; Knowles y col., 1996; Vidotto y col., 1998).

Oliveira y col., (2003), sugieren que esta proteína puede ser utilizada como antígeno para el diagnóstico serológico debido a la conservación de los epitopes para las células B entre diferentes aislamientos estudiados, corroborando la hipótesis de que este polipéptido tiene una función

fundamental en el ciclo biológico del hemoparásito, estando presente durante las fases aguda y crónica de la infección bovina (Knowles y col., 1996).

1.2. Características de la enfermedad

1.2.1. Incidencia mundial de la enfermedad

La anaplasmosis bovina es una enfermedad económicamente importante por los enormes gastos que ocasiona, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, incluyendo los Estados Unidos, donde se reporta una mortalidad anual entre 50 000 a 100 000 animales muertos, con un costo de hasta 300 millones de dólares (Palmer y McElwain, 1995).

Un estudio realizado en el norte de Veracruz (México), mostró que el 69 % del ganado estaba infectado (Cossio y col., 1997). Esta alta prevalencia está asociada con un significativo rango de transmisión, pues el 26 % del ganado que murió en México durante 1995, fue debido al movimiento de ganado susceptible a áreas con alta prevalencia de la enfermedad y por la subsiguiente transmisión de la misma. Tasas similares de infección, entre el 73 % y 78 % se han calculado con anterioridad para el ganado de St. Lucia (Hugh-Jones y col., 1988) y el Salvador (Payne y Scott, 1982), respectivamente.

La enfermedad se reporta en muchas áreas del mundo, existiendo datos de la presencia de anaplasmosis bovina en la India (Chitravel y col., 1998) y otras regiones de Asia y el Pacífico, donde es considerada una enfermedad endémica, causante de pérdidas considerables en el ganado importado, pues las razas de ganado responden de una manera muy diferente a una misma infección (http://www.fao.org/docrep/V8300S/v8300sOp.htm).

En Argentina, en el año 2000 se reportó la existencia de un rebaño donde el 50 % de los animales tenía anticuerpos contra *A. marginale* por la prueba de aglutinación en tarjeta y en el año 2003 se reportó una alta incidencia de la anaplasmosis, a pesar de no ser una enfermedad de declaración obligatoria (Spath, 2003). En Colombia está considerada como de una gran importancia, ya que constituye una restricción para el incremento de la productividad ganadera del país (Benavides y col., 2000; Hans, 2001).

La anaplasmosis bovina se detectó en Suiza, en una explotación ganadera en dos sitios diferentes, con un 8.2 % de muestras positivas por ELISA (Kinhm, 2002). En South África se reportó un 50-75 % de prevalencia de infección (Masika y col., 1997). En Venezuela se observó una muy alta incidencia de la enfermedad (Melendez y

Forlano, 1997) y en el estado de Paraná, en Brasil, se reportaron valores de 87.6 % de animales positivos en una región donde la anaplasmosis es endémica (Vidotto y col., 1998).

En Cuba, durante los primeros años de la década de los 90 la anaplasmosis bovina se presentaba como una de las primeras causas de mortalidad en el ganado adulto. Solamente en el año 1993 se estimó una pérdida superior a los dos millones de dólares (según datos de la Dirección de Medicina Veterinaria de Cuba).

A comienzos de la década del 2000 se observa un cambio positivo con relación a la enfermedad, reportándose en los comienzos de este año una morbiletalidad de un 10 % por la enfermedad (Informe Primer Trimestre, IMV 2000). Esta situación esta dada porque a partir del período especial, en nuestro país existió un cambio en el componente racial de la ganadería, con el predominio de animales más resistentes a las garrapatas, unido a la incorporación de nuevas tecnologías en el control de ixodidos, como la vacunación contra *Boophilus microplus* con la vacuna recombinante *Gavac*, y la combinación de ésta con baños garrapaticidas programados. Esto permitió disminuir la población del vector hasta niveles que garanticen la premunición en los animales menores de nueve meses, aspecto este que resulta importante estudiar desde el punto de vista epizootilógico, para lo cual se hace imprescindible contar con técnicas diagnósticas sensibles y específicas.

1.2.2. 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* spp. y *Dermacentor* spp. (Kocan y col., 1986; Zaugg y col., 1986; Potgieter y col., 1993), moscas de establo, *Stomoxys calcitrans* (Yeruham y Braverman, 1981) y mosquitos *Siphona* spp. y *Psophona* spp.; tábanos, *Tábanus* spp. (Ristic, 1968) y por la forma iatrogénica que también juega un papel muy importante en la diseminación de la enfermedad a través de material quirúrgico contaminado (Palmer y col.,

2000). A pesar de esto, Kessler, (2001), planteó que la capacidad de transmisión de *Anaplasma marginale* por insectos hematófagos debe ser objeto de posteriores estudios, antes de considerarlos como vectores epidemiológicamente importantes.

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 y Palmer, 1990) y la transmisión vertical de tipo placenta-feto, cuando la madre sufre anaplasmosis aguda (Zaugg, 1990). Este autor demostró que *A. marginale*, podía, en el segundo y tercer trimestre de gestación, atravesar la barrera placentaria e infectar al feto y que probablemente esto no sucedía dentro de los eritrocitos, sino que era una fase extraeritrocitaria del parásito. Según Rey y col., (2003), la vía de transmisión trasplacentaria debe ser tomada en cuenta como factor de riesgo en zonas donde la anaplasmosis es endémica.

Kessler, (2001), reportó sus consideraciones acerca de que las garrapatas del género *Boophilus* son el vector biológico principal de la transmisión de la anaplasmosis en Brasil, teniendo en cuenta que la transmisión iatrogénica (transfusiones de sangre, intervenciones clínicas a la masa bovina, y la vacunación masiva) puede ser evitadas con las medidas higiénicas. En Cuba, aunque no se han realizado estudios de la transmisión de la enfermedad, el principal vector involucrado en la transmisión parece ser garrapatas del género *Boophilus,* teniendo en cuenta que este género es el más extendido en nuestro país.

Es necesario identificar los 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 logra fundamentalmente por transferencia de garrapatas infectadas y puede ocurrir de forma intraestadial y transestadial, para lo cual el macho juega un papel relevante en este proceso (Zaugg y col., 1986).

La transmisión del microorganismo a través de las diferentes especies de garrapata puede ocurrir de forma transestadial, es decir, de larvas a ninfas y de ninfas a adultos (Kocan y col., 1981; Kocan y col., 1986). Además puede ocurrir del estado de larva a adulto sin reexposición en el estadio como ninfa y por adultos machos que se transfieren del ganado infectado a otro susceptible.

Algunas cepas de *A. marginale* infectan a las garrapatas (Idaho, Virginia, aislados de Washington); sin embargo, aparentemente otras no las infectan (Illionis, Florida) (Smith y col., 1986; Wickwire y col., 1987; Zaugg y col., 1996), por razones que no se conocen, pero que apoyan las evidencias existentes de la variación antigénica del parásito.

A diferencia de los pequeños cuerpos de inclusión que contienen de cuatro a seis rickettsias en los eritrocitos bovinos, grandes colonias que contiene muchos organismos se observan en las garrapatas infectadas naturalmente. El ciclo de desarrollo del microorganismo comienza en las células del intestino medio con la subsecuente infección de las células musculares del intestino (Kocan y col., 1996). El desarrollo final ocurre en las glándulas salivares, desde donde la rickettsia se transmite al huésped vertebrado. En cada sitio de desarrollo en la garrapata, *A. marginale* se multiplica dentro de inclusiones unidas a las membranas, llamadas colonias. Cada ciclo involucra dos estadios: una forma reticulada o vegetativa y la forma densa infectiva. La forma reticulada que se divide por fisión binaria es observada primero, dentro de las colonias, que posteriormente se condensan para dar lugar al estado electrodenso capaz de sobrevivir fuera de las células e infectar a otras (Kocan y col., 1996).

En cuanto a la existencia de animales susceptibles se describen infecciones subclínicas en búfalos de agua, ovinos y caprinos (Cossio y col., 1997). En bisontes se observó parasitemia moderada con respuesta a anticuerpos específicos, demostrándose la secuencia de infección bovino-bisonte-bovino (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). Estos resultan susceptibles a la infección con *A. marginale* y *A. ovis* y su sangre, infectada con ambos hemoparásitos es infectiva para bovinos y chivos susceptibles, por lo que lo constituyen un reservorio (Zaugg y col., 1996).

Todo el ganado es potencialmente susceptible a la infección con *Anaplasma marginale,* aunque ciertas razas desarrollan resistencia a las garrapatas, e inducen 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).

Palmer y col., (2001), reportaron la presencia de sólo un genotipo de *A. marginale* en los bovinos infectados. de la Fuente y col., (2002b), han reportado que en *A. marginale* ocurre exclusión de la infección en los eritrocitos bovinos y en las células de garrapatas, resultando en el establecimiento de sólo un genotipo, siendo el primer reporte de exclusión de la infección para *A. marginale* y especies de *Ehrlichias*. Recientemente se demostró que la exclusión de la infección con genotipos de *A. marginal*e también ocurre en garrapatas experimentalmente infectadas, así como en bovinos y en el cultivo de células de garrapatas, resultando en el establecimiento de solo un genotipo por garrapata (de la Fuente y col., 2003a).

de la Fuente y col., (2003b), demostraron que no ocurre transmisión no sistémica de *A. marginale* desde garrapatas infectadas a no infectadas, por lo tanto, esto no parece ser un medio de transmisión de *A. marginale*. La infección en las garrapatas machos no se incrementa mientras conviven con las garrapatas hembras, por lo tanto, la coalimentación de *Dermacentor* spp. adulta parece no influenciar en la dinámica de transmisión de *A. marginale*.

1.2.3. Patogenia y síntomas clínicos

A. marginale es estrictamente intracelular, un parásito obligado que infecta al eritrocito bovino y que raramente se observa fuera de las células. El organismo penetra por invaginación al eritrocito sin que ocurra destrucción

de las células, se encierra en una vacuola y se multiplica por fisión binaria en forma de cuerpo de inclusión, pudiéndo observar de dos a tres cuerpos. El período prepatente durante la incubación de la enfermedad es de dos a tres semanas y la duración depende de la cantidad de organismo infectante (Medellín, 2003).

La enfermedad se caracteriza por marcada anemia hemolítica, altos niveles de rickettsemia, disminución del peso, aborto y en muchos casos la muerte en animales de más de tres años de edad. La anemia máxima ocurre de uno a seis días después de la parasitemia y persiste por cuatro a 15 días, donde hasta el 75 % de los eritrocitos se pierden de la circulación. El período de convalescencia es de uno a dos meses, y está acompañado por incremento de la hematopoyesis y puede haber recurrencia de la parasitemia. Los parámetros hemáticos retornan a los normales, pero los organismos continúan presentes en la circulación periférica. Los animales que sobreviven a la infección aguda permanecen como portadores con continuos ciclos submicroscópicos de rickettsemia que pueden persistir durante toda la vida del animal (Viseshakul y col., 2000).

En los portadores vertebrados, *A*. *marginale* 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).

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, pudiendo 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 persistentemente con bajos niveles de parasitemia, que fluctúa por períodos largos de tiempo. A estos animales se les denomina portadores asintomáticos de la enfermedad, en los cuales la enfermedad es difícil de diagnosticar por los métodos tradicionales (Visshakul y col., 2000).

Estos animales afectados pueden desarrollar la forma crónica de la enfermedad sin manifestaciones clínicas. Esta forma además de presentarse como secuela de la convalescencia de las infecciones agudas, también puede ser el resultado de una infección inducida con cepas atenuadas (premunización) (Palmer y McGuire, 1995).

Las huellas postmortem que deja esta enfermedad son atribuidas fundamentalmente a la anemia hemolítica severa. El bazo frecuentemente está agrandado y se torna de color rojo marrón. 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).

1.2.4. 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. En general la parasitemia y la anemia son menos graves en los animales jóvenes, posiblemente debido a que la respuesta inmune celular es mayor por la competencia del timo, el sistema hematopoyético es más activo y por el papel más activo de la hemoglobina fetal (Richey y Palmer, 1990).

A. marginale induce en el organismo respuesta humoral y mediada por células, sin embargo, los anticuerpos al parecer juegan un papel menos importante (Bautista-Garfias y col., 2000). Los animales infectados desarrollan anticuerpos, fundamentalmente del tipo IgG e IgM, y exhiben durante las últimas etapas de la infección aguda una respuesta mediada por células, en la que aparecen los macrófagos activados segregando IFN-γ, que estimula fuertemente la proliferación de linfocitos de sangre periférica (Galade 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, existen antígenos claves de *A. marginale* que estimulan la producción de anticuerpos neutralizantes, por lo que la respuesta humoral juega algún papel en el desarrollo de la inmunidad contra la anaplasmosis (Richey y Palmer, 1990; de la Fuente y col., 2002a).

El estudio de los mecanismos inmunes protectores contra *A. marginale* se focaliza 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 IgG_2 dirigidos contra los epitopes 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).

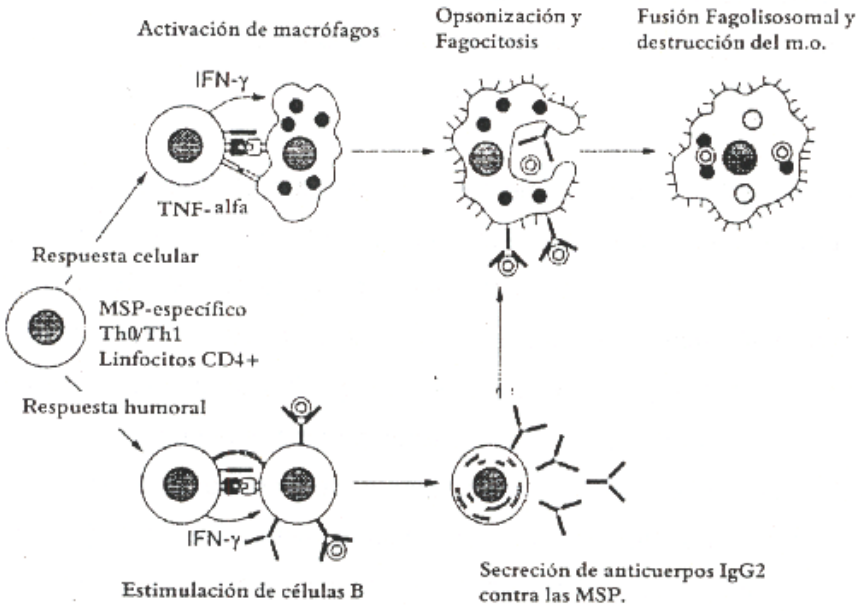


Figura 2: Mecanismos de la respuesta inmune humoral y celular contra las MSP_s de *A. marginale.*

El ganado que se recupera de una infección aguda y que por tanto ha tenido una infección preinmune 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).

1.2.5. Epidemiología y control de la anaplasmosis

La existencia de inmunidad previa**,** la velocidad de transmisión y la edad a la que ocurre el primer contacto con el parásito (primoinfección), determinan el efecto clínico que causará este contacto entre el huésped y el parásito. El cuadro clínico típico de la infección aguda por *A. marginale* ocurre únicamente en animales adultos susceptibles cuando se transportan a regiones endémicas. En los sitios donde las garrapatas son abundantes la epidemiología de esta enfermedad se caracteriza por la estabilidad enzoótica, que implica la presencia de un alto porcentaje de ganado infectado, con la rara ocurrencia de la enfermad clínica (Benavides, 1985). Esta relación se mantiene debido a dos factores: la inmunidad pasiva (anticuerpos), proveída por el calostro y la temprana infección de los terneros, los que se demostró que poseen resistencia innata hasta cerca de los nueve meses de edad. Durante esta edad los animales adquieren la infección sin presentar los signos aparentes de la enfermedad y la inmunidad resultante, una vez establecida, es mantenida en el ganado adulto mediante reinfecciones, sin síntomas clínicos (Cetrá y col., 2000).

En regiones donde la población de garrapatas se reduce artificialmente con un intenso control, se rompe el equilibrio, pues no todos los terneros se infectan antes de los nueve meses de edad, creando así un segmento de ganado susceptible, que muy posiblemente desarrollarán la enfermedad clínica aguda cuando tengan contacto con el hemoparásito tiempo después. Esta situación es conocida como inestabilidad enzoótica, en la cual la enfermedad se vuelve periódicamente aparente, coincidiendo con períodos favorables para la reproducción de las garrapatas (Benavides, 1985).

1.2.5.1. 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). Los métodos de control para la anaplasmosis no han cambiando marcadamente durante los últimos 50 años e incluyen el control de los artrópodos, la quimioprofiláxis, la vacunación, y el mantenimiento de los rebaños libres de Anaplasma (Guglielmone y col., 1996; Kocan y col., 2000).

En nuestro país el control de la anaplasmosis se ha llevado a cabo fundamentalmente mediante tratamiento terapéutico, uso de insecticidas y acaricidas y más recientemente con el uso de la vacuna recombinante contra *B. microplus* (Gavac) (2do Taller Nacional de Control de la garrapata, La Habana, Cuba, 2000).

En muchos casos la infección se controla, en parte, por la administración de bajas dosis de tetraciclina y se estudió el efecto de ésta en el cultivo de células de garrapata, quedando demostrada su utilidad para la evaluación de nuevos antibióticos en el control de la anaplasmosis (Blouin y col., 1998). En los casos clínicos severos se hace necesaria la terapia de soporte, mediante la aplicación de hidratantes, antihistamínicos y analgésicos para eliminar de manera efectiva los estados de portador (Medellín, 2003).

El ganado que se recupera de la infección aguda desarrolla inmunidad protectora, que puede inducirse con vacunas muertas (Montenegro-James, 1991). Sin embargo, la producción de vacunas a partir del microorganismo muerto o de su fraccionamiento, resultó poco conveniente e incosteable, ya que no se había logrado establecer un cultivo *"in vitro"* donde pudiera replicarse el parásito, lo que obligaba al uso de bovinos vivos. Según Blouin y col., (1998), la propagación de *A. marginale* en una línea celular derivada de *Ixodes scapularis,* con potencialidad para ser utilizada como antígeno, constituye un avance importante para el desarrollo de una vacuna mejorada contra la anaplasmosis bovina. Sin embargo, no se debe dejar de tener en

cuenta la variabilidad antigénica que se presenta en aislados de regiones geográficamente diferentes.

1.3. 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 ántrax. 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 dificulta 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 Buening, 1990; Masika y col., 1997).

1.3.1. 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 PCR (World Organization for Animal Health, 2000).

1.3.1.1. Estándar de oro

Para la detección de animales infectados persistentemente el método que se considera el estándar de oro, 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 porque proporciona poca información sobre los niveles de parasitemia (Visser y Ambrosio, 1987).

1.3.1.2. Tinción con Giemsa a los frotis de sangre

Entre otras técnicas utilizadas para detectar el organismo se incluye la tinción con Giemsa a los frotis de sangre (Gainer, 1961). 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), o sea sólo pude detectar niveles mayores a 10^6 eritrocitos infectados por mililitro de sangre (Gale y col., 1996), además, resulta tedioso, no apropiado para un gran número de muestras e incapaz de discernir con facilidad cuando el eritrocito está invadido por *A. marginale* o por *A. centrale* (Visser y Ambrosio, 1987).

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

1.3.1.3. ELISA para detectar antígeno

El ELISA para detectar antígeno 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 diseñado de diferentes maneras (Harlow y Lane, 1988).

El ensayo ELISA desarrollado para detectar antígeno, utilizando anticuerpos monoclonales para epitopes conservados de la proteína de superficie MSP1, 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).

1.3.1.4. Técnicas moleculares

Las sondas de ácidos nucleicos, las cuales hibridan solamente con su secuencia complementaria, constituyen una prueba sensible y específica para el diagnóstico (Engleberg y Eisenstein, 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 prohíbe 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, combinado con la vacunación, para reducir los daños de la enfermedad (Goff y col., 1988).

Kocan y col., (1998), desarrollaron una sonda de ADN no radioactiva 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*".

La sensibilidad y especificidad del PCR resultan de gran valor para la identificación de patógenos de vectores artrópodos. Este método ha detectado *R. typhi* y *B. burgdorferi* en artrópodos, además de ser utilizado para la identificación de garrapatas infectadas con el aislamiento Virginia de *A. marginale*, usando cebadores diseñados a partir de la secuencia nucleotídica del gen msp1β 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., 1993a).

La infección persistente de *A. marginale* en ovejas fue caracterizada por Palmer y col., (1998), utilizando el PCR (gen msp5), pudiendo observar 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.

Torioni y col., (1998), optimizaron un PCR *"nested"* acoplado con análisis de secuencia e hibridación para identificar el gen msp5 de *A. marginale*, siendo capaz de detectar hasta 30 eritrocitos infectados por mililitro de sangre, lo cual lo hace de 10-100 veces más sensible que los PCR previamente descritos, sondas de ARN y ensayos de hibridación (Eriks y col., 1989; French y col., 1998; Gale y col., 1996; Ge y col., 1996; Ge y col., 1997). El PCR *"nested"* unido con la hibridación resulta un método altamente sensible y específico para detectar animales infectados con *A. marginale*.

Georges y col., (2001) desarrollaron un método de hibridación reversa y PCR (RLB) de las regiones 16S ó 18S del ARNr para la detección de hemoparásitos en bovinos, demostrando una gran prevalencia de infecciones mezcladas, lo que indica que animales infectados con *Babesia* spp., estaban también infectados con *Theileria* spp. ó *Anaplasma* spp. Un PCR simple basado en el gen msp1α ha logrado diferenciar *A. marginale* en Norte América, pero no se ha probado con aislados de otros lugares (Palmer y col., 2001).

1.3.2. Diagnóstico serológico

Las pruebas serológicas son de gran importancia para estudios epidemiológicos con el objetivo de caracterizar áreas de estabilidad e inestabilidad enzoótica. La aplicación de estas pruebas resulta relevante en lugares donde se practique el control intensivo de garrapatas, en los centros de inseminación y transferencia de embriones, así como en los lugares donde se produzcan animales de elite o reproductores puros, relacionados también con la industria lechera (http://www.cnpgc.embrapa.br/publicacoes/naoseriadas/anaplasma/anaplasma.html).

El diagnóstico serológico incluye pruebas como fijación del complemento, aglutinación en tubos capilares, aglutinación rápida en tarjeta, ensayos de IFI, y las pruebas Dot-ELISA y ELISA. Las pruebas serológicas como fijación del complemento y aglutinación en tarjeta, son los métodos más comúnmente utilizados para detectar animales infectados con *A. marginale* en el campo y fueron métodos aceptados para el movimiento de animales a nivel internacional (Word Organization for Animal Health, 2000).

Todos estos ensayos para la detección de anticuerpos utilizan antígenos crudos obtenidos de *A. maginale* parcialmente purificado, lo que provoca que se pierda la sensibilidad y especificidad que se requiere para un diagnóstico eficaz (Montenegro-James y col., 1985, Kocan y col., 1996). Una parte de los errores que se cometen con estos ensayos, se debe a los resultados falsos positivos, causados por la contaminación con eritrocitos y la presencia de anticuerpos antieritrocitos en el suero de algunos animales. La frecuencia de anticuerpos contra los eritrocitos se ve marcadamente aumentada en el suero de los animales vacunados con vacunas derivadas de sangre, tales como las que se utilizan para *Babesia* spp. (Duzgun y col., 1988). Otra parte de los errores, se deben a las reacciones falso negativas, provocadas en algunos casos por la baja sensibilidad del método o porque algunos ensayos como el de fijación de complemento, no detectan todos los isotipos de las inmunoglobulinas (McGuire y col., 1979).

1.3.2.1. Fijación del complemento

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

La fijación del complemento ha sido uno de los métodos más utilizados para detectar animales infectados con *A. marginale*, en el campo (González y col., 1978). A pesar de que esta técnica ha sido utilizada por muchos años, existen evidencias de que le falta sensibilidad y tiene errores por su limitada habilidad para detectar bajos niveles de anticuerpos. Puede ser utilizada como una prueba de monitoreo, pero no para los programas de erradicación, ya que muchos animales infectados pueden ser diagnosticados como negativos, pues no es capaz de detectar anticuerpos contra *A. marginale* en animales portadores (McElwain, 2000). Existen otras desventajas entre las que se encuentran la complejidad y laboriosidad que requiere y la baja especificidad y sensibilidad, sobre todo en países donde hay presentes enfermedades hemoprotozoarias (Palmer y col., 1986).

1.3.2.2. Pruebas de aglutinación

Se han descrito dos pruebas de aglutinación: la aglutinación en tubos capilares y la aglutinación rápida en placa (Amerault y col., 1972). En ambos casos el resultado es leído como positivo o negativo, pero no determina título de anticuerpos. 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, dando el resultado en muy pocos minutos, pero como se dijo anteriormente, existe un gran problema con las reacciones no específicas (Teclaw y col., 1985).

1.5.2.3. Inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos (IFI)

Esta prueba ha sido utilizada para el diagnóstico de anaplasmosis y frecuentemente se ha considerado una prueba sensible, sin embargo, por sus características en ocasiones se considera no útil, pues pueden ocurrir reacciones falsas positivas, que se atribuyen al largo período de incubación de esta enfermedad (Goff y col., 1988).

Goff y col., (1988) y Montenegro-James y col., (1985) reportaron ensayos de IFI, los cuales presentan un número alto de reacciones falsas positivas y un alto fondo de fluorescencia. McGuire y col., (1984), realizaron una IFI donde utilizaron como antígeno una muestra cruda de *A. marginale*, contaminado con membranas eritrocitarias, dando una serie de resultados falsos positivos y falsos negativos en el ganado infectado agudamente y en el convaleciente; en el ganado persistentemente infectado arrojó un porciento de falsos negativos. Así mismo, la IFI ha sido utilizada para estudios epidemiológicos (Duzgun y col., 1988; Jongejan y col., 1988).

1.3.2.4. Dot- ELISA y ELISA

Se han desarrollado pruebas ELISA para identificar anticuerpos contra *A. marginale* en suero bovino (Duzgum y col., 1988; Ndung'u y col., 1995; Knowles y col., 1996). El ELISA es una prueba sensible, específica y brinda 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 ésta presenta epitopes 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). El uso de la proteína MSP5 como antígeno ha mostrado buenos resultados en la detección de diferentes especies del género *Anaplasma* (Ndung'u y col., 1995).

Otros ensayos inmunoenzimáticos usan como antígeno epitopes del polipéptido MSP1 (Trueblood y col., 1991) y cuerpos iniciales de *A. marginale*, dando este último reacción cruzada con *A. centrale* (Nakamura y col., 1989). 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;

Torioni y col., 1998). El establecimiento de un ensayo de ELISA competitivo (Torioni 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.

Reyna-Bello y col., (1998), desarrollaron un ensayo ELISA para el diagnóstico serológico de la anaplasmosis bovina con la proteína MSP5 de *A. marginale*. El ELISA desarrollado con sueros de campo de diferentes regiones geográficas de Venezuela mostró una seroprevalencia de la enfermedad de un 47 %, lo que coincidió con los resultados de los estudios epidemiológicos realizados. Estos resultados confirman la importancia de la MSP5 como un antígeno útil para el diagnóstico serológico de la anaplasmosis bovina.

Más recientemente, Bowles y col., (2000), han desarrollado un 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 y en Zimbabwe una sensibilidad de un 100 %, no siendo posible calcular la especificidad por la poca cantidad de sueros positivos con que contaban. Estos autores concluyeron que el ELISA es una alternativa útil para los estudios epidemiológicos cuando se compara con la prueba de aglutinación en tarjeta.

Braz Junior y col., (2002) desarrollaron un sistema ELISA para la detección de anticuerpos anti *A. marginale* con un 100 % de especificidad y un 94.87 % de sensibilidad. A pesar de los resultados obtenidos con los ensayos de ELISA, se hace necesaria la existencia de una prueba diagnóstica que se pueda realizar al lado del animal, que resulte sensible y específica, 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.

2.1. *Escherichia coli* como sistema de expresión de proteínas recombinantes

Dentro del amplio concepto de Biotecnología, se incluyen las tecnologías del ADN recombinante e Ingeniería Genética que consisten en pasar un gen de un microorganismo a otro. Con esta técnica se obtiene un número elevado de productos biotecnológicos comercializables, cuya tendencia debe proseguir en aumento. Con su utilización se pueden obtener cantidades de una proteína, que sería imposible o muy costoso obtenerlas de su fuente natural (Yilma, 1994).

La utilización de los diferentes sistemas biológicos con fines productivos ha encontrado en los últimos años importantes campos de aplicación, particularmente en la industria farmacéutica y en la agricultura. Por su enorme potencial, en esta última rama de la ciencia, es considerada una tecnología estratégica de los principales países desarrollados y de los que están en vías de desarrollo (Sasson, 1998). Los medios biotecnológicos modernos ofrecen muy variadas posibilidades, que han permitido alcanzar muy buenos resultados en la sanidad animal sobre todo en la prevención, el diagnóstico y el control de enfermedades, en particular aquellas transmitidas por vectores (Boué, 2002).

A pesar de que en la actualidad existen diversos organismos y sistemas para la producción de proteínas recombinantes, continúa el progreso en el uso de *E. coli*, como un organismo simple y altamente productivo. El rápido crecimiento en sustratos baratos, el rango de producción de proteínas, el conocimiento existente de la fisiología de este microorganismo y de su genética y la disponibilidad cada vez mayor de vectores de clonaje y cepas hospederas mutantes, hacen de este, uno de los sistemas de expresión más versátil (Swartz, 2001).

El desarrollo de nuevos sistemas de expresión en *E. coli* ha proveído la existencia en la actualidad de vectores como los pGEX, pQE, pRSET y otros, los cuales permiten obtener altos niveles de expresión de los genes insertados en los mismos, dando lugar a proteínas fusionadas con una cola de histidina en sus extremos amino o carboxilo terminal, que permite su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad por interacción

con quelatos metálicos. El hexapéptido de histidna que se expresa fusionado a la proteína de interés no es inmunogénico o pobremente inmunogénico, no se carga a pH fisiológico y generalmente no afecta la secreción y conformación de la proteína de interés (Pharmacia Biotech, 1999).

Aunque no existe total garantía de que el producto de un gen recombinante se pueda acumular en *E. coli* a altos niveles, en forma biológicamente activa, en la actualidad numerosas investigaciones están dirigidas a mejorar esta funcionalidad en el microorganismo (Baneyx, 1999). El hecho de que el microorganismo produzca la proteína dentro de la célula o secretada al medio, impone que existan pocas alternativas de selección cuando se trata de recuperarlas. Si el producto recombinante se expresa intracelular, las células tienen que ser rotas y necesariamente habrá que emplear un paso de separación (Boué, 2002).

2.1.1. Fermentación de proteínas recombinantes expresadas en *E. coli.*

Para obtener, a partir de la tecnología del ADN recombinante, productos químicos y proteicos relativamente baratos, se requiere desarrollar procesos de fermentación escalables que sean, a su vez, de alta eficiencia y bajo costo, según el propósito y tipo de proceso utilizado (Boué, 2002).

El método de cultivo discontinuo simple es el más recomendado para realizar estudios de cinética de crecimiento y expresión de proteínas recombinantes; además de permitir realizar la optimización del proceso y determinar la estabilidad del plásmido recombinante en la célula hospedera. Una vez establecidos todos los parámetros óptimos en este método, se deberá pasar a realizar la fermentación del microorganismo recombinante en cultivos discontinuos incrementados. Dentro de las ventajas de este tipo de cultivo se encuentran: mayor control sobre las variaciones en las concentraciones de sustrato en el tiempo por la adición incrementada al fermentador de uno o más de los nutrientes durante la corrida, y se evita la represión catabólica por numerosas sustancias, así como, el incremento de materiales tóxicos parcialmente oxidados; control de la velocidad específica de crecimiento llevándose a un valor deseado; puede ser estudiada fácilmente la

dependencia del crecimiento celular y la formación de producto en la composición del medio y, por último, mejorar el rendimiento total del producto, comparado con el cultivo discontinuo simple (Boué y col., 2002).

2.1.1.2. Purificación de proteínas recombinantes expresadas en *E. coli*

Diseñar un proceso de purificación lo más óptimo posible, es determinar las variables que más afectan en cada una de las etapas. Esto permitirá posteriormente explotar al máximo las diferencias entre las proteínas de interés y el resto de los contaminantes, con el objetivo de obtener el producto final deseado, para lo que es muy importante considerar los procesos de producción de la proteína (en *"bach"* o procesos continuos) y purificación, como un proceso único, debido a que las condiciones del primero afectan sensiblemente al segundo (Boué, 2002).

Los altos niveles de expresión de las proteínas recombinantes en *E. coli*, frecuentemente llevan a la acumulación de polipéptidos insolubles agregados, denominados cuerpos de inclusión (Fischer y col., 1992; Datar y col., 1993), sin embargo, esto tiene ciertas ventajas: los niveles de expresión generalmente son muy altos, hasta un 30 % del total de proteínas de la célula; las proteínas están protegidas de la degradación proteolítica de las enzimas de la célula hospedera; durante la ruptura y la purificación inicial, la proteína no se ve afectada por la desnaturalización, ya que las proteínas agregadas en cuerpos de inclusión no tienen actividad biológica; las proteínas en los cuerpos de inclusión se pueden separar fácilmente de las proteínas solubles de la célula hospedera por centrifugación u otros métodos, disminuyendo de esta forma el número de pasos requeridos para la separación e incrementando el rendimiento del producto purificado; si el producto recombinante es tóxico a la célula la formación de los cuerpos de inclusión puede incrementar la viabilidad de la célula y el rendimiento de la proteína de interés (Li y col., 2004).

Después que los cuerpos de inclusión se han solubilizado por altas concentraciones de agentes desnaturalizantes, es necesario el replegamiento de la proteína de interés por diferentes métodos, entre los que podemos citar:

dilusión de la proteína en solución tampón renaturalizante (Katoh y col., 2000); intercambio de solventes por diálisis, diafiltración o cromatografía de exclusión por talla (Varnerin y col., 1998; West y col., 1998) y adsorción reversible de la proteína desnaturalizada sobre un soporte sólido (Berdichersky y col., 1999).

La cromatografía de afinidad por interacción con quelatos metálicos ha encontrado una amplia aplicación en el campo de la Biología Molecular para la purificación rápida de proteínas recombinantes, con numerosas modificaciones desde su inicio hasta la actualidad (Zachariou, 2004), utilizándose cuando se necesita una purificación rápida y con una pureza sustancial del producto deseado (Gaberc-Porekar y Menart, 2001).

Este sistema permite de manera eficiente y de forma simultánea la purificación y el replegamiento de las proteínas expresadas con cola de polihistidina. La cola de polihistidina forma un complejo de alta afinidad con iones metálicos divalentes inmovilizados, aún en presencia de agentes caotrópicos, permitiendo el aislamiento y el replegamiento de la proteína recombinante de interés, por lo que en un solo paso en una columna de afinidad se puede lograr la purificación y el replegamiento de la proteína (Glynou y col., 2003; Lemercier y col., 2003).

Esta técnica tiene numerosas ventajas sobre otras técnicas cromatográficas de purificación por afinidad, entre las que podemos citar: estabilidad del ligando; alta carga en las proteínas; condiciones de elusión que no afectan la proteína de interés; simple regeneración de la columna y bajo costo del sistema (Arnold, 1991), además de poder ser aplicada bajo condiciones desnaturalizantes, aspecto frecuentemente necesario cuando las proteínas recombinantes son altamente expresadas en *E. coli* en forma de cuerpos de inclusión (Gaberc-Porekar y Menart, 2001), lo que la convierten en la técnica de elección cuando se utilizan sistemas de clonaje que permiten la fusión de la proteína de interés con colas de polihistidina, desarrollándose procesos de purificación a gran escala para diversas aplicaciones.

3.1. Inmunoensayos cromatográficos

Los inmunoensayos enzimáticos se han desarrollado en una gran diversidad de formatos, los cuales se describen ampliamente en la literatura, existiendo similitudes básicas en todos ellos, debido a que los mismos requieren de: una proteína de captura unida al soporte sólido; un

paso de incubación con el ligando contenido en la muestra y un medio de detección del inmunocomplejo (Gosling, 1990).

El primero de estos, se realizó en tubos de ensayo, a diferencia de los actuales, donde generalmente se efectúan en placas de poliestireno o polivinilo. Sin embargo, las placas plásticas tienen limitaciones para su uso, cuando se utilizan en inmunodiagnósticos rápidos (menos de 10 minutos), de ahí que hayan surgido las membranas de nitrocelulosa, las cuales proveen un mecanismo más conveniente para la separación de los inmunoreactantes y ofrecen mayores capacidades de unión (Gosling, 1990).

Las tiras reactivas como medio de diagnóstico constituyen un instrumento de gran utilidad, pues permiten la obtención rápida de datos confiables sobre diversas afecciones, pudiéndo aprovechar la propiedad de filtración de las membranas llamadas de flujo horizontal, utilizando la membrana como un medio de colección de la muestra y como la superficie donde la reacción inmunológica se llevará a cabo, teniendo además como ventaja el no requerir de ningún equipamiento para el desempeño del mismo (Pemawansa y col., 1990).

El uso del oro conjugado en los inmunoensayos rápidos, proporciona un método extremadamente sensible para la detección de muy pequeñas cantidades de proteínas en solución. La conjugación de la proteína seleccionada, a la partícula de oro, depende al menos de tres fenómenos físicos: (1) de la atracción por carga de la partícula de oro negativa por la proteína positivamente cargada; (2) de la absorción hidrofóbica de la proteína a la superficie de la partícula de oro; (3) de la unión del oro mientras este pueda existir dentro de la estructura de la macromelécula. El oro se puede conjugar a una gran variedad de macromoléculas incluyendo proteínas, polipéptidos, carbohidratos, dímeros, polisacáridos, enzimas y ácidos nucleicos (Hainfeld y Furuya, 1992).

Mientras que con los marcajes florescentes y los resultados basados en reacciones enzimáticas pueden desaparecer las señales con la exposición a la luz, las reacciones con oro no desaparecen y dan un marcaje permanente con una gran sensibilidad y resolución (Hainfeld y Furuya, 1992). El marcaje con oro coloidal, unido con las ventajas que ofrecen el uso de las tiras reactivas ha hecho que los métodos de diagnóstico rápido encuentren un

amplio uso, entre los que podemos citar: pruebas domésticas realizadas en un solo paso; ensayos competitivos y detección de anticuerpos en suero.

Se deben tener muy en cuenta las potencialidades que muestran el gen msp5 y la proteína MSP5 de *Anaplasma marginale* para la determinación del agente y de anticuerpos contra éste, las ventajas que ofrecen los sistemas de expresión y purificación de proteínas recombinantes en *E. coli*, así como las potencialidades de los ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral como ensayos que se pueden realizar al lado del animal.

CAPÍTULO 2: Materiales y Métodos Generales

2.1. Medios de cultivo y soluciones

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

2.2. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

- **Cepa de *E. coli* TOP 10F´:** Cepa de recombinación negativa diseñada para la replicación estable de plásmidos de alto número de copias (Invitrogen).

Genotipo: F´(*lac*I^q, Tn*10*(Tet^R)), *mcr*A, Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC), ϕ80, *lac*ZΔM15, Δ*lac*X74, *deo*R *rec*A1, *ara*D139 Δ(*ara-leu*)769, *gal*U, *gal*K, *rps*L(Str^R), *end*A1, *nup*G

Se cultivó en medio líquido y sólido Luria Bertani (LB) (Davis y col., 1980). La temperatura de crecimiento fue de 37°C y en el medio de cultivo líquido se mantuvo con agitación a 120 rpm en zaranda orbital termostatada (BIOZARD-2013).

- **Cepa de *E. coli* BL21DE3pLysS:** Cepa diseñada para la expresión de proteínas recombinantes, lisógena del fago λ(DE3), que incorpora el gen de la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor *lacUV5* (Stratagene).

Genotipo: F´ *amp*T, *hs*dS$_B$(r$_{-8}$,M$_{-8}$), *dcm*, *gal*, (DE3), plysS, Cm^R

Se cultivó en medio líquido SOB (cloranfenicol 35 μg/mL). La temperatura de crecimiento fue de 37°C con agitación a 120 rpm en zaranda orbital termostatada.

Se cultivó en medio sólido LB (cloranfenicol 35 μg/mL), con temperatura de crecimiento de 37°C.

2.3. Plásmido utilizado

El clonaje se realizó en el vector de expresión en *Escherichia coli*, pRSET B (Invitrogen) (Anexo 2).

Este plásmido es un derivado del pUC, diseñado para la expresión de altos niveles de proteína, debido a la presencia del promotor fuerte del fago T7. El ADN hexógeno insertado

en este plásmido queda fusionado a una secuencia que codifica para un péptido de fusión en la región amino-terminal. Esta secuencia incluye un codón de iniciación de la transducción (ATG), una cola de polyhistidina, una secuencia estabilizadora de la transcripción del gen 10 del fago T7, el epitope Xpress y un sitio de reconocimiento de corte para la enteroquinasa.

2.4. Aislamientos de *Anaplasma marginale, Babesia, bovis, Babesia bigemina* y *Tripanosoma* spp.

- **Aislamientos de *Anaplasma marginale*:** La sangre de bovinos con 60 % de parasitemia, experimentalmente infectados con cuatro aislamientos cubanos (dos de la región occidental: Habana, Valle del Perú y dos de la región oriental: Oriente 1, Oriente 2), lavada con PBS y conservada en 30 % de glicerol (Alonso y col., 1988) se suministró por el Grupo de Parasitología e Inmunología del CENSA.

El ADN de los aislamientos Florida e Idaho fue gentilmente cedido por el Dr. Guy H. Palmer (Departamento de Medicina Veterinaria y Parasitología, Washington State University.

- **Cepas de *B. bovis* y *B. bigemina*:** La sangre de bovinos con 5 % de parasitemia, experimentalmente infectados con *B. bovis* y *B. bigemina,* lavada con PBS y conservada en 30 % de glicerol, fue cedida por el Grupo de Parasitología e Inmunología del CENSA.

- ***Tripanosoma* spp.:** El ADN de ***Tripanosoma* spp.** fue cedido por la Dra. María de Lourdes Muñoz (Laboratorio de Genética, CINVESTAV, México).

2.5. Antisueros policlonales y anticuerpos monoclonales utilizados

- Antisuero policlonal monoespecífico X-MSP5 (1/100): Obtenido en bovino, gentilmente cedido por el Dr. Anthony Barbet, Florida State University.

- Anticuerpo monoclonal ANAF16C1, es una inmunoglobulina G1 (IgG_1), específico contra un epitope de la proteína MSP5 del aislamiento Florida de *A. marginale* (270 μg/mL) (1/200) y se une a la MSP5 en todas las cepas

testadas de *A. marginale*, *A. ovis* y *A. centrale*, cedidos por el Dr. Anthony Barbet, Florida State University.

- Anticuerpo monoclonal Tryp1E1, específico contra *Trypanosoma* spp. (80 μg/mL) (1/80), cedido por el Dr. Anthony Barbet, Florida State University.

- Antisuero policlonal monoespecífico antiMSP5, obtenido en conejos F1, contra la proteína MSP5 del aislamiento Habana de *Anaplasma marginale* (1/100) (Lago y col., 1998).

- Sueros positivos a *B. bovis* y *B. bigemina:* Fueron cedidos por la División de Biotecnología Animal, CIGB.

2.6. Conjugados utilizados

- Conjugado anti IgG bovino-peroxidasa (Sigma), dilución 1/500

- Conjugado anti IgG ratón-peroxidasa (Sigma), dilución 1/500

- Conjugado anti IgG conejo-peroxidasa (Sigma), dilución 1/500

- Conjugado anti IgG bovino-peroxidasa (ICN/CAPPEL), dilución 1/5 000

2.7. Digestiones con enzimas de restricción y tratamiento con enzimas de modificación

Todos se realizaron según las indicaciones de las casas productoras.

2.8. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los ADN se aplicaron con tampón de carga para ADN (1X), en geles de agarosa (Sigma) al 0.8 %, en tampón TBE 0.5X y TAE 0.5X, según correspondía y se corrieron a 100 V y 50 mA en TAE 0.5X ó TBE 0,5X, en cámara de electroforesis Apparatus GNA-100 (Pharmacia) y fuente Shandom Southern (V500/150), durante una hora. Para la visualización del ADN los geles se tiñeron con bromuro de etidio 0,5 μg/mL, en tampón de corrida durante 30 minutos, se observaron en un transiluminador de luz

ultravioleta MacroVue (Pharmacia) y se fotografiaron con cámara digital EPSON 3.3 Mega, PIXELS.

2.9. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12 %

Los geles para la visualización de las proteínas se prepararon según la metodología descrita por Sambrook y col., (1992) en cámara de electroforesis Mini-Protean (Bio-Rad). Las electroforesis preparativas se realizaron de igual manera. Las muestras se prepararon en tampón de carga de proteínas 2X, según Sambrook y col., (1992), (Tabla 1).

Tabla 1: Preparación de geles de poliacrilamida-SDS al 12 %.

	PREPARACIÓN DE LOS GELES	
Componentes	Gel separador (12 %)	Gel concentrador (5 %)
H_2O estéril	3.3 mL	2.7 mL
Acrilamida30 %/ 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	0.04 mL
Persulfato de amonio al 10 %	0.1 mL	0.01 mL
TEMED	0.005 mL	0.005 mL

La corrida de las proteínas se efectuó a 50 mA en fuente de electroforesis (LKB) hasta que el colorante alcanzó el final del gel. El gel se tiñó con agitación en solución de Coomassie Brillant Blue R-250 (Sigma), al 1 %, durante 15 a 30 minutos y se destiñó por hervidura con agua destilada, dos veces, durante cinco minutos. En todos los geles se utilizó marcador de peso molecular de amplio rango (Wide Molecular Weight Range, Sigma). Los geles se fotografiaron con cámara digital EPSON 3.3 Mega, PIXELS.

2.10. Detección inmunológica

Las detecciones inmunológicas se realizaron mediante inmunoblot (Sambrook y col., 1992) a partir de la transferencia semiseca de las proteínas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad), según la metodología descrita por Sachse y col., (1992). La transferencia correcta de las proteínas se visualizó por tinción del filtro de nitrocelulosa con Rojo Ponceau 0.2 %, según Sambrook y col., (1992). En todos los casos la membrana de nitrocelulosa con las proteínas se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS, durante una hora en agitación a 37°C. Posteriormente se realizó la incubación con el antisuero específico, según correspondía, (Acápite 2.5), durante tres horas en agitación a 37°C, diluido en leche descremada al 5 % en PBS. A continuación se realizaron tres lavados durante cinco minutos, con agitación, con PBS-Tween 20 (0.05 %) y uno con PBS. Posteriormente se adicionó el conjugado, según correspondía (Acápite 2.6), se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante una hora y se realizaron los lavados en condiciones similares a las anteriores. Finalmente se añadió la solución de sustrato y la reacción colorimétrica se detuvo lavando la membrana con agua destilada. Las membranas se secaron al aire y se conservaron entre dos papeles de filtro.

2.11. Determinación de la turbidometría

En todos los casos se determinaron los valores de D.O. en el espectrofotómetro Lasso Biotech LTDA Lasso SpecIII.

2.12. Determinación de la concentración de proteínas

En todos los casos se realizó mediante el método de Bradford, (1976). Se confeccionó una curva de concentraciones estándar de proteínas con concentraciones conocidas de BSA, que se utilizó para calcular la concentración de proteína en las muestras de interés.

2.13. Programas utilizados para el análisis de los resultados

- Los geles de poliacrilamida-SDS se escanearon en un equipo Hewlett Packard ScanJet 4200C y se analizaron mediante el programa Molecular Analyst Software (Bio-Rad Laboratories, Versión 1.4.1, 1992-1996 y el software ID Manager, 2004) para los estudios densitométricos. Los resultados se procesaron mediante el programa Microsoft Excel 2002 (10.2614.2625).

- El análisis y alineamiento de la secuencia de ADN y proteína se realizó en una computadora Pentium 4, utilizando los programas Fasta 3, Versión 3.4t21 (Pearson y Lipman, 1988) y Vector NTI Suite 7. La secuencia se depositó en el GenBank con número de acceso AY527217.

2.14. Conservación de las cepas

- **En placa de Petri:** la placa se conserva a 4°C, en posición invertida y sellada con *"Parafilm".* Las colonias se mantienen viables en un plazo no superior a dos meses.

- **En glicerol:** para su preparación se mezcla una alícuota de un cultivo saturado, con glicerol estéril a una concentración final de 15 % y se conserva a -80°C. En principio estos cultivos son viables y estables indefinidamente.

2.15. Obtención de animales experimentalmente infectados con *A. marginale*

Se trabajó con el aislamiento Habana de *A. marginale*, crioconservado en nitrógeno líquido (Alonso y col., 1989). Se seleccionaron cinco bovinos de la raza Siboney, de seis a siete meses de edad (195, 163, 266, 252, 807), seronegativos a *Babesia* spp. por inmunofluorescencia indirecta (Rodríguez y col., 1987) y a *A. marginale* por aglutinación en placa (Teclaw y col., 1985). Estos animales fueron ubicados en condiciones de estabulación desde el primer día de nacidos para evitar la transmisión de hemoparásitos. Se esplenectomizaron y se mantuvieron en estabulación con pienso y forraje verde y durante 25 días se les realizó chequeo de hemoparásitos por frotis sanguíneo (Gainer, 1961). Se les inoculó 20 mL de un estabilizado de la cepa, por vía intravenosa, preparado según Dalgliesh, (1979) y se mantuvieron inoculados hasta que alcanzaron un 50% de parasitemia, siguiendo el curso de la infección por tinción de los frotis sanguíneos con colorante de Giemsa (Gainer, 1961). Cuando alcanzaron esta parasitemia, se les extrajo sangre con 10 mg de EDTA como anticoagulante y se sometieron a tratamiento. A los 15 días siguientes se les extrajo sangre nuevamente sin anticoagulante para colectar el suero.

2.16. Animales negativos a *A. marginale*

Se trabajo con dos bovinos de la raza Siboney de seis a siete meses de edad, seronegativos a *Babesia* spp. por inmunofluorescencia indirecta (Rodríguez y col., 1987) y a *Anaplasma marginale* por aglutinación en placa (Teclaw y col., 1985), se esplenectomizaron y se mantuvieron en estabulación con pienso y forraje verde durante 25 días. Se les realizó chequeo de hemoparásitos y posteriormente se les extrajo sangre con EDTA como anticoagulante y sin éste.

CAPÍTULO 3. Amplificación del gen msp5 de *Anaplasma marginale* en aislamientos de diferentes regiones geográficas

de Cuba. Clonaje, secuenciación y expresión del gen msp5 del aislamiento Habana

3.1. Introducción

El gen ms*p*5 aparece en el genoma como un gen de simple copia. El mismo codifica para la proteína MSP5 presente en *A. ovis* y *A. centrale* y en todos los aislamientos de *A. marginale* testados (Visser y col., 1992) y presenta elementos promotores similares a los de *E. coli*. La proteína nativa y la 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 en la garrapata (Knowles y col., 1996).

La proteína MSP5 recombinante y el gen msp5, se utilizaron por Torioni y col., (1998), para el diagnóstico de *A. marginale* por ELISA y PCR, respectivamente, con alta sensibilidad y especificidad. La obtención de la proteína MSP5 de forma recombinante se hace necesario, pues la proteína nativa está poco representada en el cuerpo inicial de *A. marginale* y su purificación se realiza a partir de sangre de bovino infectada, que además tiene como inconveniente la contaminación con proteínas del estroma del eritrocito y con proteínas de otros patógenos que pudieran estar presentes en la sangre (McGuire y col., 1984).

Teniendo en cuenta las posibilidades de uso que tiene el gen msp5 y la proteína MSP5 para el diagnóstico de *A. marginale*, los objetivos de este capítulo fueron los siguientes:

Objetivos Específicos:

1. Corroborar, mediante PCR, la presencia del gen msp5 de *A. marginale* en aislamientos de diferentes regiones geográficas de Cuba.

2. Obtener un clon recombinante que exprese en *E. coli* el gen msp5 del aislamiento Habana de *A. marginale*.

3.2. Experimento 1: Amplificación por PCR del gen msp5 de *A. marginale* en aislamientos de diferentes regiones geográficas de Cuba

3.2.1. Materiales y Métodos

3.2.1.1. Medios de cultivo y soluciones

Las soluciones utilizadas se prepararon según la metodología descrita en el Anexo 1.

3.2.1.2. Purificación del ADN

La sangre parasitada con los aislamientos cubanos de *Anaplasma marginale* y con las cepas de *B. bovis* y *B. bigemina* se obtuvo según lo descrito en el acápite 2.4, Capítulo 2.

El ADN de los aislamientos cubanos de *A. marginale* se purificó según la metodología descrita por Ambrosio y Potgieter, (1987). El ADN de los aislamientos Florida e Idaho y de *Tripanosoma* spp., se obtuvo como se describe en el acápite 2.4., Capítulo 2. La purificación del ADN de *B. bovis* y *B. bigemina* se realizó según el protocolo descrito por Fahrimal y col., (1992). El ADN bovino se purificó según la metodología descrita por Osta y col., (1994).

Se utilizó como molde para la amplificación, ADN de los asilamientos cubanos Habana, Valle del Perú, Oriente 1, Oriente 2, ADN de *B. bovis* y *B. bigemina*, y *Tripanosoma* spp.

3.2.1.3. Diseño de los cebadores para la amplificación del gen msp5

Se diseñaron dos cebadores (Tabla 2), complementarios a la región inicial y terminal del gen que codifica para la proteína MSP5, a partir de la secuencia reportada en la literatura para el aislamiento Florida con número de acceso M93392 (Visser y col., 1992). Los mismos fueron sintetizados por la casa comercializadora Heber Biotech, Habana, Cuba.

Tabla 2: Secuencia nucleotídica de los cebadores utilizados para la amplificación del gen msp5.

Cebadores	Secuencia	Posición	Talla (b)
Sentido	*5´CGGGATCCGATGAGAATTTTCAAG3´*	117-132	24
Antisentido	*5´CGGGATCCCTAAGAATTAAGCATG3´*	735-750	24

3.2.1.4. AMPLIFICACIÓN DEL GEN MSP5 DE *A. MARGINALE*

LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN SE REALIZÓ MEDIANTE PCR, A PARTIR DE 50 NG DE LOS ADN PURIFICADOS, SEGÚN LA METODOLOGÍA DESCRITA EN EL ACÁPITE 3.2.1.2. DE ESTE CAPÍTULO. EL PCR SE REALIZÓ EN UNA MEZCLA DE REACCIÓN DE 25 μL, CONTENTIVA DE 2.5 μL DE SOLUCIÓN TAMPÓN 1X (KCL 10 MM, TRIS HCL 200 MM, PH 8.8, $MGCL_2$ 2.5 MM, TRITON X-100 0.1 %, PROMEGA), 20 PMOLES DE LOS CEBADORES, 0.2 MM DE LOS $DNTP_S$ (PROMEGA) Y 1U DE *TAQ* POLIMERASA 5 U/μL (PROMEGA).

3.2.1.5. Programa de amplificación utilizado

El programa de amplificación se diseñó teniendo en cuenta la temperatura de unión de los cebadores, calculada según la fórmula descrita por Sambrook y col., (1989).

$$\mathbf{Tm = 69.3 + 0.41\ (\%C+G) - 650/L}$$

Donde: L= Número de bases del cebador.
Tm= Temperatura de unión de los cebadores.

El programa de amplificación utilizado se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3: Programa de amplificación utilizado para la PCR.

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
1	94	1
30	94	1
	53	1
	72	1
1	72	10

Todos los reactivos se manipularon en flujo laminar (BHA 72), utilizando puntas con filtros (Eppendorf) resistentes a los aerosoles.

Las amplificaciones se realizaron en un equipo Mastercycler personal (Eppendorf) y los resultados se visualizaron utilizando la metodología descrita en el acápite 2.8., Capítulo 2.

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

3.3.1. Materiales y Métodos

3.3.1.1. Medios de cultivo y soluciones

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

3.3.1.2. Amplificación del gen msp5

Para la amplificación se utilizaron los mismos cebadores, así como las mismas condiciones de amplificación descritas en los acápites 3.2.1.4. y 3.2.1.5., de este capítulo, pero utilizando como molde, ADN del aislamiento Habana de *A. marginale*. El producto amplificado en cinco tubos de reacción se chequeó por electroforesis de ADN, según la metodología descrita en el acápite 2.8., Capítulo 2, se procesó según la metodología descrita por Sambrook y col., (1989), se digirió con la enzima de restricción *Bam*H I (Promega) y se purificó utilizando el juego de reactivos Wizard DNA CleanUp Resin (Promega).

3.3.1.3. Preparación del plásmido

El vector de expresión en *E. coli,* pRSET B (Invitrogen) (Anexo 2), se digirió con la enzima de restricción *Bam*H I (Promega), se chequeó por electroforesis de ADN, según la metodología descrita en el acápite 2.8., Capítulo 2, se desfosforiló con fosfatasa alcalina (CIAP, Biolabs) y se purificó utilizando el juego de reactivos de aislamiento rápido de ácidos nucleicos NucleinClean (Sigma).

3.3.1.4. Ligación y transformación

A los productos obtenidos en los acápites 3.3.1.2. y 3.3.1.3., se les determinó la concentración realizando diluciones y visualizando las mismas por electroforesis de ADN, utilizando un plásmido control de concentración conocida. Ambos productos se ligaron con la enzima T4 DNA ligasa (Promega), manteniendo una relación inserto vector de 3:1, según lo descrito por Sambrook y col., (1989).

La transformación se realizó en células competentes de *E. coli* TOP 10F´, preparadas según protocolo descrito por Sambrook y col., (1989), con una eficiencia de transformación de 10^8 UFC/ug de ADN plasmídico. La frecuencia y eficiencia de la transformación se calcularon según Sambrook, y col., (1989).

3.3.1.5. Selección de los plásmidos recombinantes

Se sembraron las colonias en 3 mL de medio LBA, a 37°C, durante 14 horas en rotador de tubos (RT-01, Retomed) y se realizó la purificación de los plásmidos posibles recombinantes, por el método de minialcalino (Sambrook y col., 1989) y se seleccionaron por talla los posibles recombinantes. Para su posterior análisis se utilizó la enzima B*am*H I (Promega) y se les realizó el PCR, según las condiciones descritas en los acápites 3.2.1.4. y 3.2.1.5. de este capítulo. Para analizar el sentido de orientación del fragmento clonado se realizó análisis de restricción con la enzima *Eco*R I (Promega).

3.3.1.6. Secuenciación del gen msp5 del aislamiento Habana de *A. Marginale*

Para la secuenciación se seleccionó un plásmido recombinante, denominado pHMSP5 (pRSET B con el gen msp5 del aislamiento Habana clonado), se purificó según el juego de reactivos Plasmid Pure^{ra} MIDIPRED Kit (Sigma) para garantizar un alto grado de pureza. La reacción se realizó en un secuenciador automático ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech), con los mismos cebadores utilizados para el clonaje, utilizando el juego de reactivos de secuenciación Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Kit (Amersham Pharmacia Biotech).

El análisis de los resultados de la secuenciación se realizó mediante los programas Fasta 3, versión 3.4t21 (Pearson y Lipman, 1988) y Vector NTI Suite 7. La secuencia se depositó en el GenBank con número de acceso AY527217.

3.3.1.7. Expresión del gen msp5 clonado en el plásmido pRSET B

Para la expresión del gen msp5, el plásmido recombinante pHMSP5, se transformó en las células BL21DE3pLysS, preparadas como células competentes, según el protocolo descrito por Sambrook y col., (1989). Se sembró un preinóculo de 5 mL de medio SOBAC, y se mantuvo en agitación, a 37°C en rotador de tubos (RT-01, Retomed), durante 14 horas. A partir de este preinóculo se sembró un cultivo en 25 mL de medio SOBAC a 0.1 unidades de D.O., medida a una λ de 600 nm y se mantuvo creciendo en agitación a 37°C en zaranda (BIOZAR-2013). Cuando el cultivo alcanzó un valor 0.5 unidades de D.O., se realizó la inducción con IPTG 1 mM. En paralelo se realizó la inducción de las células BL21DE3pLysS, utilizadas como control, y se mantuvo un control de célula vacía y célula con plásmido recombinante, sin inducción. Los cultivos inducidos y no inducidos se mantuvieron creciendo seis horas a 37°C, se les determinó D.O., leída a una λ de 600 nm y todos se ajustaron a una misma D.O.

Las muestras con la D.O. ajustada se completaron a un 1 mL con medio SOB y se centrifugaron a 5 000 rpm, durante 10 minutos en centrífuga de mesa (Eppendorf 5415E). Los sobrenadantes se desecharon y los sedimentos se resuspendieron en 100 μL de PBS, se congelaron en nitrógeno líquido y se descongelaron en baño de agua a 37°C, tres veces.

Los resultados de la expresión de la proteína MSP5 recombinante, denominada HMSP5, se corroboraron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12 %, aplicando 10 μL de los lisados celulares preparados en tampón de carga de proteínas 2X, y las proteínas se visualizaron según la metodología descrita en el acápite 2.9, Capítulo 2. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y la detección inmunológica se realizó mediante inmunoblot, según la metodología descrita en el acápite 2.10., Capítulo 2. Para la detección inmunológica se utilizó el antisuero policlonal monoespecífico X-MSP5, los anticuerpos monoclonales ANAF16C1 y Tryp1E1 y el antisuero policlonal monoespecífico, anti MSP5 (Acápite 2.5., Capítulo 2).

El peso molecular de la proteína HMSP5 se estimó utilizando la movilidad electroforética de las proteínas con respecto al marcador de peso molecular de amplio rango (Wide Molecular Weight Range, Sigma) y por densitometría utilizando el programa Molecular Analyst Software (Bio-Rad Laboratories, Versión 1.4.1, 1992-1996).

3.4. Resultados y Discusión

A partir del ADN de *A. marginale* de diferentes regiones geográficas de Cuba se obtuvo la amplificación por PCR de una banda de 633 pb, con los cebadores específicos para el gen que codifica para la proteína MSP5, lo que demuestra la presencia de dicho gen en cuatro aislamientos de *A. marginale* de diferentes regiones geográficas de nuestro país y en los aislados Florida e Idaho, utilizados como controles (Fig. 3), coincidiendo con lo reportado por Visser y col., (1992), que describen el gen msp5, como un gen de simple copia altamente conservado. Para el aislamiento Florida, se observa una ligera disminución en la talla de la banda amplificada, lo que puede deberse a un efecto de la corrida electroforética, al ser ésta, la banda de mayor concentración.

Similar a los genes msp1α y msp4, el gen msp5 está presente en el genoma como una simple copia (Allred y col., 1990; Oberle y col., 1993), lo que facilita el uso de este gen en el diagnóstico de la anaplasmosis bovina por la técnica de PCR (Torioni y col., 1998), a diferencia de los genes msp1β, msp2 y msp3 que están presentes en múltiple copia en el genoma de *A. marginale* (Palmer y col., 1994).

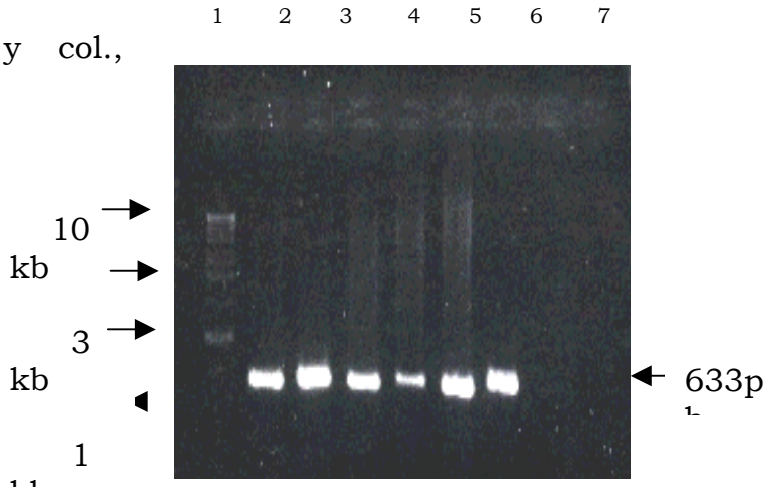


Figura 3. Amplificación del gen msp5 en diferentes aislamientos de *Anaplasma marginale*. Línea 1: Marcador de peso molecular 1 kb (Promega); 2: ADN del aislamiento Habana; 3: ADN del aislamiento Valle del Perú; 4: ADN del aislamiento Oriente 1; 5: ADN del aislamiento Oriente 2; 6: ADN del aislamiento Florida; 7: ADN del aislamiento Idaho; 8: ADN bovino; 9: control de agua.

Se puede observar en la Figura 4, que no hubo amplificación a partir del ADN de otros hemoparásitos, lo que coincide con lo planteado por Visser y col., (1992), de que el gen msp5 es altamente específico para el género *Anaplasma.* A su vez, no hubo amplificación a partir del ADN bovino, lo que demuestra que los cebadores utilizados son altamente específicos para *A. marginale.*

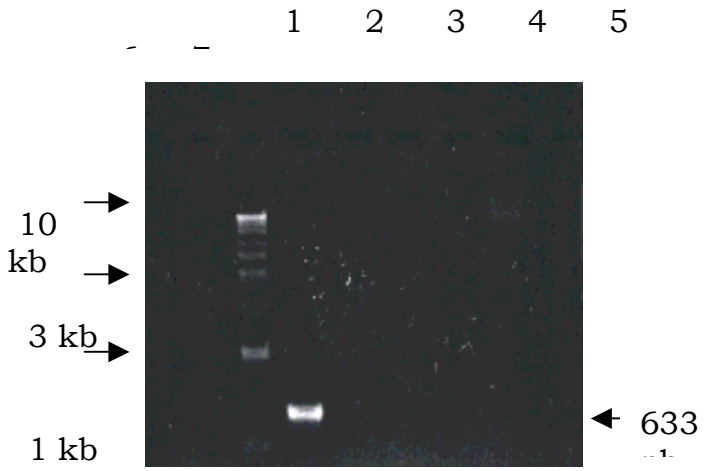


Figura 4: Amplificación del gen msp5. Línea 1: Marcador de peso molecular 1 kb (Promega); 2: ADN del aislamiento Habana de *Anaplasma marginale*; 3: ADN de *Babesia bovis*; 4: ADN de *Babesia bigemina*; 5: ADN de *Tripanosoma* spp; 6: ADN bovino; 7: control de agua.

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* analizados, y está presente en los estadios del eritrocito, así como en todos los estadios de *A. marginale*, incluyendo el cultivo del organismo *"in vitro"* (Barbet y col., 1999). La proteína expresada presenta un epitope, reconocido por el anticuerpo monoclonal ANAF16C1, conservado entre cepas ampliamente divergentes (Munodzana y col., 1998), en *A. ovis* y en el estadio de la glándula salivar de *A. centrale*. (Visser y col., 1992; Barbet y col., 1999), por lo que ambos constituyan candidatos importante para el diagnóstico de *A. marginale*.

Teniendo en cuenta lo planteado por Visser y col., (1992); Torioni y col., (1998) y Barbet y col., (1999), de que el gen msp5 está presente en todos los aislamientos de *A. marginale* estudiados y los resultados obtenidos en cuanto a la presencia del mismo en los aislamientos cubanos estudiados,

seleccionamos el ADN del aislamiento cubano Habana, como molde para la amplificación, clonaje, secuenciación y expresión de este gen. Se tuvo en cuenta además, la conservación de la secuencia de otros genes estudiados de este aislado (Camacho y col., 2000; Corona y col., 2002), cuando se compararon con el aislamiento de referencia Florida.

De la transformación realizada se obtuvieron 186 colonias posibles recombinantes, con un fondo de vector de 7 colonias, para una frecuencia de transformación de $9.1X10^3$ transformantes por μg de ADN plasmídico. De estas colonias se seleccionaron 50 por aumento de talla, de las cuales 15 resultaron ser recombinantes después de la digestión con *BamH* I, para una eficiencia de transformación de 30%.

Después de la digestión de los posibles plásmidos recombinantes con *Bam*H I, (Fig. 5), aparece en los plásmidos analizados la banda de 2.9 kb correspondiente al vector y la banda de 633 pb, correspondiente al gen msp5 clonado, a diferencia de la línea 7 donde se aplicó el plásmido nativo digerido y solo se observa la banda correspondiente al mismo.

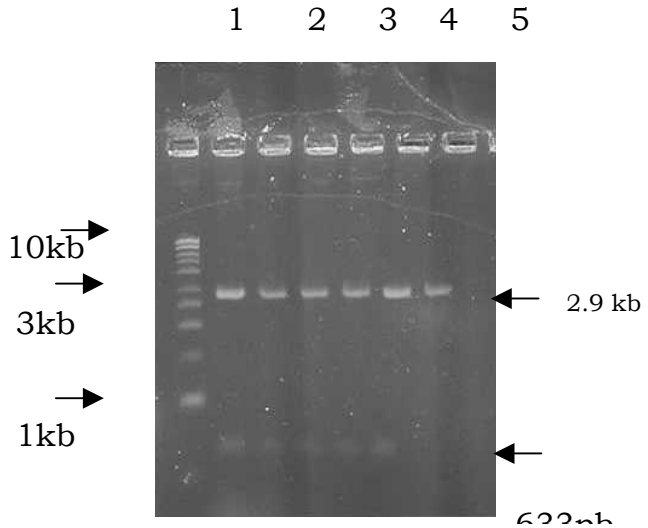


Figura 5: Análisis de restricción con *Bam*H I de los plásmidos posibles recombinantes. Línea 1: Marcador de peso molecular de 1 kb (Promega); 2-6: posibles plásmidos recombinantes; 7: plásmido nativo pRSET B.

Se observa en la Figura 6 la amplificación por PCR del gen msp5 en los plásmidos recombinantes, coincidiendo con la talla del gen amplificado en el

aislamiento Habana de *A. marginale*, lo que corrobora la presencia del inserto clonado dentro del plásmido.

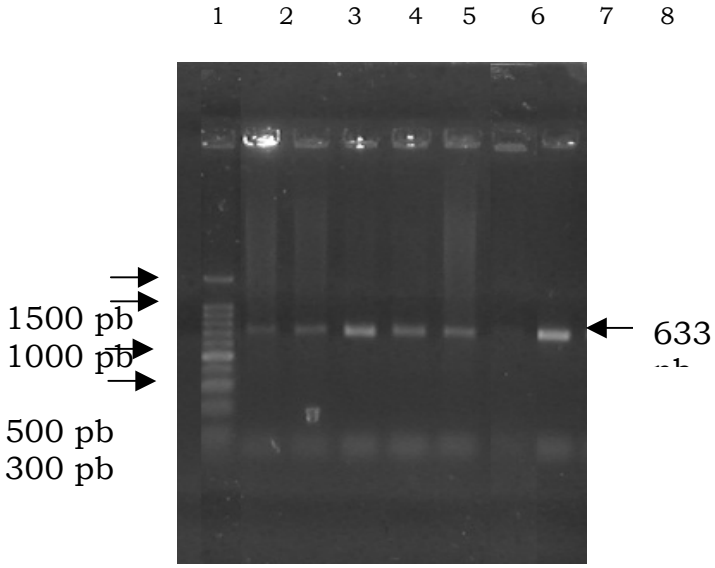


Figura 6: Amplificación por PCR del gen msp5 en los plásmidos posibles recombinantes. Línea 1: Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega); 2-6: ADN de los plásmidos posibles recombinantes; 7: pRSET B; 8: ADN del aislamiento Habana de *A. marginale.*

Del análisis de restricción con la enzima *Eco*R I (Fig. 7), se pudo determinar los plásmidos que contienen el gen clonado en el sentido correcto, por la presencia de dos bandas de 3.3 kb y 233 pb.

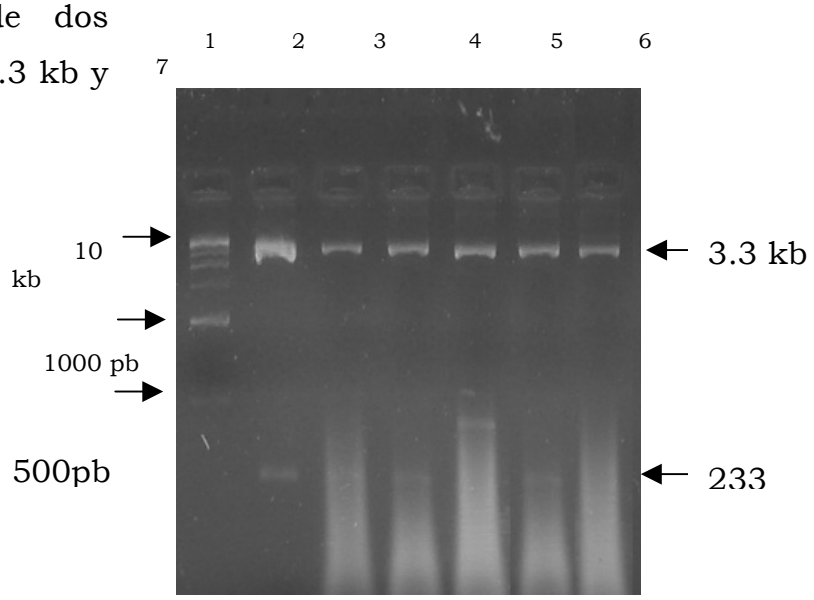


Figura 7: Análisis de restricción con la enzima *Eco*R I a los plásmidos recombinates. Línea 1: Marcador de peso molecular de 1 kb (Promega); 2, 3, 4, 6: plásmidos con el gen msp5 clonado en el sentido correcto; 5: plásmido con el gen msp5 clonado en el sentido incorrecto; 7: pRSET B.

A partir de estos resultados se seleccionó un plásmido recombinante denominado pHMSP5 y se realizó la secuenciación del gen clonado. La misma se depositó en la base de datos del GenBank con número de acceso AY527217.

En la Figura 8 se puede observar el análisis de restricción realizado a la secuencia nucleotídica del gen msp5 del aislamiento Habana. El análisis y comparación de la secuencia del gen, permitió conocer que tiene un 98.42 % de homología con la secuencia descrita para el aislamiento Florida (Número de acceso M93392) (Fig. 9). Esta diferencia está dada por cambios puntuales de bases que no provocan cambios en la secuencia deducida de aminoácidos, con la que muestra un 99.04 % de homología (Fig. 10). De igual manera, se comparó con la secuencia de este gen descrita para un aislamiento de Brasil (Número de acceso AY245428) y de una cepa de

Anaplasma centrale (Número de acceso AY054384), con las que mostró un 96.68 % y 87.46 %, de similitud en la secuencia nucleotídica y un 97.14 % y 92.85 %, con respecto a la secuencia de proteínas, lo que habla a favor de la conservación de la secuencia del gen y de la proteína.

Torioni y col., (1998), analizaron la secuencia de 30 productos de un PCR "*nester*" con el que se amplificó un segmento de 345 pb del gen msp5 de animales de un rebaño en estudio y encontraron un 95 % de identidad en las secuencias analizadas, comparado con la secuencia descrita para el aislamiento Florida. Dos de éstas fueron idénticas a la secuencia de Florida y las 28 restantes solo mostraron cambios puntuales de bases, lo que habla a favor de nuestros resultados en cuanto a la conservación de la secuencia de este gen en los aislamientos de *A. marginale* estudiados.

Un nivel semejante de conservación de la secuencia del gen msp5 se demostró en un animal, en dos picos separados del ciclo de rickettsemia (French y col., 1998). De igual manera, Kano y col., (2002) demostraron la presencia de este gen y de la proteína para la cual codifica en todos los aislamientos de Brasil estudiados, lo que coincide con resultados previos que indican la conservación de esta proteína en aislamientos de América, África e Israel (Palmer y col., 1988a; Visser y col., 1992; Knowles y col., 1996; Vidotto y col., 1998).

Figura 8: Análisis de restricción realizado al gen msp5 del aislamiento Habana clonado en pRSET B.

Habana
ATGAGAATTTTCAAGATTGTGTCTAACCTT
Florida
CATTTTTGAGTGTTCGTTGGGGTGTGATAGATGAGAATTTTCAAGATTGTGTCTAACCTT
90 100 110 120 130
140
40 50 60 70 80
90
Habana
CTGCTGTTCGTTGCTGCCGTGTTCCTGGGGTACTCCTATGTGAACAAGAAAGGCATTTTC
Florida
CTGCTGTTCGTTGCTGCCGTGTTCCTGGGGTACTCCTATGTGAACAAGAAAGGCATTTTC
150 160 170 180 190
200
100 110 120 130 140
150
Habana
AGCAAAATCGGCGAGAGGTTTACCACTTCCGAAGTTGTAAGTGAGGGCATAGCCTCCGCG
Florida
AGCAAAATCGGCGAGAGGTTTACCACTTCCGAAGTTGTAAGTGAGGGCATAGCCTCCGCG
210 220 230 240 250
260
160 170 180 190 200
210
Habana
TCTTTCAACAATTTGGTTAATCACGAGGGGGTCACCGTCAGTAGCGGCGATTTTGGCGGC
Florida
TCTTTCAACAATTTGGTTAATCACGAGGGGGTCACCGTCAGTAGCGGCGATTTTGGCGGC
270 280 290 300 310
320
220 230 240 250 260
270
Habana
AAGCACATGTTGGTAATATTCGGCTTCTCAGCCTGTAAGTACACGTGCCCTACCGAGTTA
Florida
AAGCACATGTTGGTAATATTCGGCTTCTCAGCCTGTAAGTACACGTGCCCTACCGAGTTA
330 340 350 360 370
380
280 290 300 310 320
330
Habana
GGCATGGCTTCTCAGCTCCTAAGTAAACTAGGCGACCATGCCGATAAGTTGCAAGTTGTG
Florida
GGCATGGCTTCTCAGCTCCTAAGTAAACTAGGCGACCATGCCGATAAGTTGCAAGTTGTG
390 400 410 420 430
440
340 350 360 370 380
390
Habana
TTCATAACTGTTGATCCGAAAAATGACACCGTAGCCAAGCTTAAAGAGTACCACAAGTCT
Florida
TTCATAACTGTTGATCCGAAAAATGACACCGTAGCCAAGCTTAAAGAGTACCACAAGTCT
450 460 470 480 490

```
500
                  400       410       420       430       440
450
     Habana
TTTGATGCGAGAATTCAGATGCTCACAGGCGAGGAAGCAGACATAAAGAGCGTGGTTGAA
     Florida
TTTGATGCGAGAATTCAGATGCTCACAGGCGAAGAAGCAGACATAAAGAGCGTGGTTGAA
            510       520       530       540       550
560
                  460       470       480       490       500
510
     Habana
AACTACAAGGTGTATGTGGGCGACAAGAAGCCAAGTGATGGTGATATCGACCACTCGACT
     Florida
AACTACAAGGTGTATGTGGGCGACAAGAAGCCAAGTGATGGTGATATCGACCACTCAACG
            570       580       590       600       610
620
                  520       530       540       550       560
570
     Habana
TTCATGTATCTCATCCATGAAAAGGGCAGGTACGTTGGGCATTTTGCGCCAGATTTTAAC
     Florida
TTCATGTACCTCATCAATGGGAAAGGCAGGTATGTCGGGCATTTTGCGCCAGATTTTAAC
            630       640       650       660       670
680
                  580       590       600       610       620
630
     Habana
GCGTCTGAGGGCCAAGGCGAGGAGCTGTTTAAGTTTGTCAGCGGTCACATGCTTAATTCT
     Florida
GCGTCTGAGGGCCAAGGCGAGGAGCTGTTTAAGTTTGTCAGCGGTCACATGCTTAATTCT
            690       700       710       720       730
740
     Habana TAG
     Florida TAG
            750
```

Figura 9: Comparación de la secuencia nucleotídica del gen msp5 de los aislamientos Habana y Florida de *Anaplasma marginale*.

```
     Habana
MRIFKIVSNLLLFVAAVFLGYSYVNKKGIFSKIGERFTTSEVVSEGIASASFNNLVNHEG
     Florida
MRIFKIVSNLLLFVAAVFLGYSYVNKKGIFSKIGERFTTSEVVSEGIASASFNNLVNHEG
                    10        20        30        40        50
60
                    70        80        90       100       110
120
     Habana
VTVSSGDFGGKHMLVIFGFSACKYTCPTELGMASQLLSKLGDHADKLQVVFITVDPKNDT
     Florida
VTVSSGDFGGKHMLVIFGFSACKYTCPTELGMASQLLSKLGDHADKLQVVFITVDPKNDT
                    70        80        90       100       110
120
                   130       140       150       160       170
180
     Habana
VAKLKEYHKSFDARIQMLTGEEADIKSVVENYKVYVGDKKPSDGDIDHSTFMYLIHEKGR
     Florida
VAKLKEYHKSFDARIQMLTGEEADIKSVVENYKVYVGDKKPSDGDIDHSTFMYLINGKGR
                   130       140       150       160       170
180
                   190       200       210
     Habana YVGHFAPDFNASEGQGEELFKFVSGHMLNS
     Florida YVGHFAPDFNASEGQGEELFKFVSGHMLNS
                   190       200       210
```

Figura 10: Comparación de las secuencia deducida de aminoácidos de la proteína recombinante HMSP5 del aislamiento Habana con la secuencia del aislamiento Florida de *Anaplasma marginale.*

A partir de la secuencia deducida de aminoácidos, se determinaron diferentes propiedades de la proteína HMSP5 (Tabla 4), utilizando el programa Vector NTI Suite 7.

Tabla 4: Propiedades de la proteína HMSP5.

Propiedades	**Proteína HMSP5**
Longitud	210 aa
1 μg	43.056 pMoles
Coeficiente de extinción molar	10480
Punto isoeléctrico	6.25

Para el estudio de la expresión de la proteína HMSP5, se transformaron células BL21DE3pLysS con el plásmido recombinante pHMSP5. Estas

células están diseñadas para la expresión de proteínas, pero presentan dos problemas significativos que limitan su uso como hospederas primarias para la transformación: (1) son derivadas de la línea de células de *E. coli* B, por lo que su eficiencia de transformación es relativamente baja ($1X10^6$ UFC por μg de ADN de pUC), (2) contienen el gen *EndA*, el cual codifica una endonucleasa que rápidamente degrada las preparaciones plasmídicas. Esta degradación afecta el mapeo por restricción de los plásmidos y la secuenciación del ADN, procesos que usualmente se llevan a cabo para confirmar que el clonaje ha sido correcto (Jerpseth y col., 2004), por lo que para verificar el clonaje del gen msp5 en el plásmido pRSET B, antes de desarrollar los estudios de expresión, en nuestros experimentos la mezcla de ligación se transformó en una línea de células de *E. coli EndA*-, en este caso TOP 10F' y la segunda transformación se desarrolló en las células BL21DE3pLysS, para la expresión de la proteína recombinante HMSP5.

En la Figura 11, podemos observar una banda de una talla aparente de 22 kDa en el patrón de proteínas de dicho clon inducido con IPTG, no observándose ésta en el plásmido recombinante sin inducir, ni en los controles de célula inducida y sin inducir.

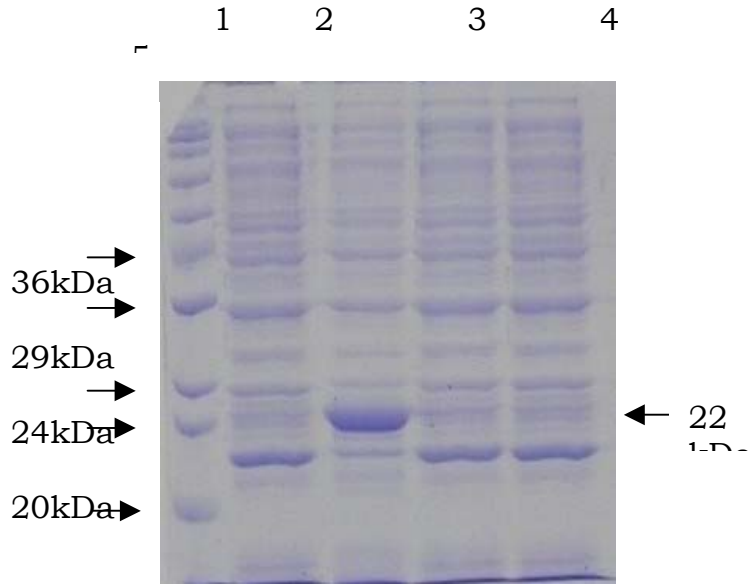


Figura 11: Expresión del gen msp5 del aislamiento Habana de *A. marginale.* Línea 1: Marcador de peso molecular de amplio rango (Sigma), 2: Cepa

recombinante BL21DE3pLysS/pHMSP5 no inducida, 3: Cepa recombinante BL21DE3pLysS/pHMSP5 inducida, 4: Cepa BL21DE3pLysS no inducida, 5: Cepa BL21DE3pLysS inducida.

La expresión del gen msp5, clonado en pRSET B, está controlada por el promotor fuerte del fago T7, presente en le plásmido. Este promotor es reconocido específicamente por la T7 RNA polimerasa, por lo que para la expresión del gen, es necesaria la presencia de esta enzima en la célula BL21DE3pLysS de *E. coli*, lo que se puede lograr con la presencia del inductor IPTG. Una vez que la T7 RNA polimerasa producida sea suficiente, esta se une al promotor T7 y transcribe el gen de interés (Studier, 1991; Baneyx, 1999).

A pesar de lo antes explicado, existen niveles de expresión basal de la T7 RNA polimerasa, que provocan la expresión del gen clonado en ausencia del inductor, lo que puede llevar a reducir el crecimiento de la célula, e incluso puede provocar la muerte celular, o inestabilidad en el plásmido. La T7 lisozima producida por el plásmido pLysS presente en las células BL21DE3pLysS, se une a la T7 RNA polimerasa e inhibe la transcripción, lo que reduce la expresión de la proteína de interés antes de adicionar el IPTG (Boomirshine y col., 2003). Lo antes expuesto explica el porque en ausencia de IPTG (Fig. 11) se reduce al máximo la expresión de la proteína HMSP5 y con la adición de este, se bloquea la función del represor *lacUV5* y se logran altos niveles de expresión.

El peso molecular de la proteína HMSP5, con respecto al patrón de peso utilizado y estimado por densitometría fue de 22 kDa (Fig. 9), resultando superior al descrito para esta proteína en el aislamiento Florida (19 kDa) (Visser y col., 1992) y otros aislamientos estudiados, donde este gen se expresa como un polipéptido de 19 kDa en la membrana de superficie de los cuerpos iniciales (Ndung'u, y col., 1995). Esta diferencia de talla de 3 kDa se debe al sistema de expresión utilizado, donde la proteína se expresa fusionada a un hexapéptido de histidina en la región N-terminal (http//www.Invitrogen.com).

Se conoce que los residuos de histidina fusionados a las proteínas en las regiones N-terminal y C-terminal permiten que las proteínas pequeñas aumenten su talla, por ser sintetizadas fusionadas a dichos residuos, volviéndose más estables y permitiendo que sean fácilmente purificadas por IMAC. Estos residuos son pobremente inmunogénicos pero mejoran la antigenicidad de las proteínas de interés, ya que le permiten a las mismas su plegamiento y a su vez, las protegen del ataque proteolítico después de la inmunización (The QIA Expressionist, 1997).

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)(Palmer y col., 2001) y más limitada la variación de talla para MSP1b de hasta 3 % (97-100 kDa) (Camacho y col., 2000) y MSP2 hasta un 9 % (33-36 kDa) entre cepas de *A. marginale* (Barbet y col., 2001; Lohr y col., 2002). Sin embargo, la proteína MSP5 mantiene la talla conservada en todos los aislamientos de *A. marginale* estudiados (Ndung´u, y col. 1995).

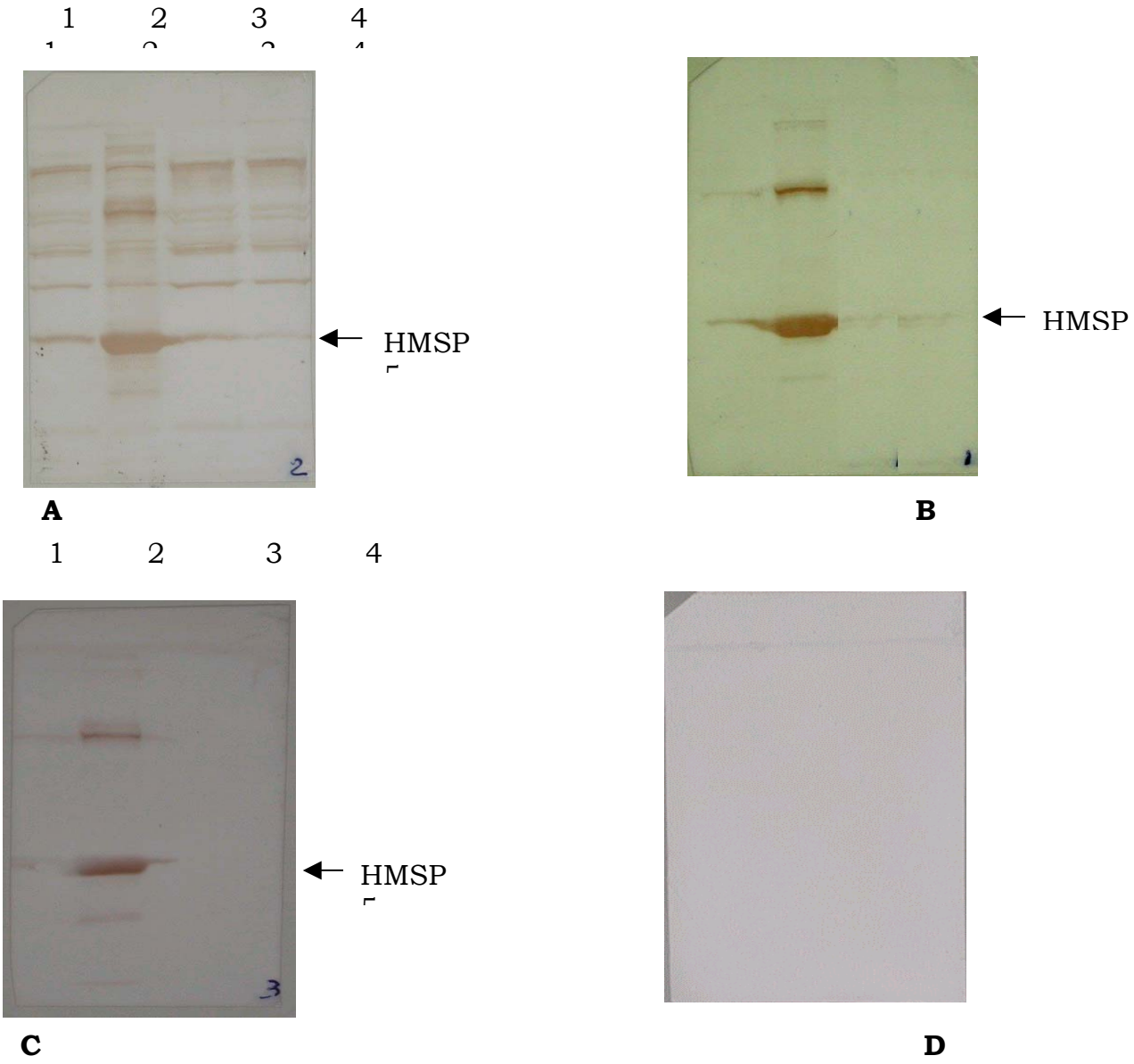


Figura 12: Inmunoblot del reconocimiento de la proteína HMSP5 por diferentes antisueros. **A**: Antisuero policlonal monoespecífico X-MSP5, **B**: Anticuerpo monoclonal ANAF16C1, **C**: Antisuero policlonal monoespecífico antiMSP5, **D**: Anticuerpo monoclonal Tryp1E1. Línea 1: Cepa recombinante BL21DE3pLysS/pHMSP5 no inducida, 2: Cepa recombinante BL21DE3pLysS/pHMSP5 inducida, 3: Cepa BL21DE3pLysS no inducida, 4: Cepa BL21DE3pLysS inducida.

La proteína HMSP5 expresada se reconoció por un antisuero policlonal monoespecífico X-MSP5, obtenido en bovinos, por el anticuerpo monoclonal ANAF16C1 y por un antisuero policlonal monoespecífico anti MSP5 obtenido en conejos y no fue reconocida por el anticuerpo monoclonal Tryp1E1, utilizado como control negativo (Fig. 12). En la Figura 12A, se observan bandas inespecíficas debido a que el antisuero utilizado no fue previamente

absorbido contra *E. coli*, y esta bacteria forma parte de la flora normal del tracto digestivo en bovinos, por lo que en el suero están presentes anticuerpos contra las proteínas de *E. coli.*

La conservación de epitopes de MSP1 y MSP2 entre aislamientos de *A. marginale* de Kenia, Israel y Estados Unidos, así como *A. centrale* se demostró previamente (Palmer y col., 1988). Sin embargo, Ndung'u y col., (1995) demostraron por primera vez que un epitope común definido por el anticuerpo monoclonal ANAF16C1, se encontraba en *A. marginale* y *A. ovis*, a pesar de ser este último patógeno primario de ovejas. Los resultados obtenidos por diferentes autores muestran que la proteína MSP5 de todas las especies reconocidas de *Anaplasma* posee un epitope común definido por este anticuerpo monoclonal.

Munodzana y col., (1998), reportaron, 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 anticuerpo monoclonal ANAF16C1 y que la presencia de las cisteínas en la región N-terminal y la unión intermolecular de los disulfuros en la conformación de las MSPs resultan imprescindibles para la unión (Vidotto y col., 1994). El hecho de que el anticuerpo monoclonal reconozca la proteína recombinante HMSP5, indica que la presencia del hexapétido de histidina no altera el reconocimiento del epitope por el anticuerpo monoclonal y corrobora los resultados obtenidos por Munodzana y col., (1998), que plantean que el epitopo, definido por la unión a este anticuerpo monoclonal, está conservado en todos los aislamientos estudiados de *A. marginale*

A partir de estos resultados se cuenta con un clon recombinante que expresa la proteína HMSP5 de 19 kDa, fusionada al hexapéptido de histidina, por lo que resulta necesario estudiar los parámetros de crecimiento y expresión de la cepa recombinante BL21DE3pLysS/pHMSP5, así como las condiciones de purificación de la proteína.

3.5. Conclusiones parciales.

1. En aislamientos cubanos de diferentes regiones geográficas de Cuba se corroboró la presencia del gen msp5 de *Anaplasma marginale*.

2. Se obtuvo un clon recombinante que expresa en *Escherichia coli* la proteína MSP5 de *Anaplasma marginale*, con un peso molecular aparente de 22 kDa, la cual es reconocida por los antisueros específicos.

3. La secuencia nucleotídica del fragmento amplificado mostró un 98.42 % de homología y la secuencia deducida de aminoácidos un 99.04 %, con respecto a la secuencia descrita para el aislamiento de referencia Florida.

CAPÍTULO 4: Cinética de crecimiento de la cepa recombinante de *Escherichia coli* BL21DE3pLysS/pHMSP5. Expresión, solubilización y purificación de la proteína HMSP5 a escala de laboratorio

4.1. Introducción

Los avances recientes en el campo de la Ingeniería Genética y la Biotecnología han demostrado las posibilidades ilimitadas de estas tecnologías, 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).

Las células de mamíferos, insectos y levaduras se han usado ampliamente como hospederas. A pesar de esto, cuando se necesitan factores como la productividad, el costo, y otros, la bacteria *E. coli* continúa siendo el hospedero más comúnmente usado para proteínas que no requieren glicosilación (Narciandi y col., 1996). Esto se debe a que es la bacteria mejor conocida, con una gran parte de sus genes identificados y con una velocidad de crecimiento específico superior al resto de los hospederos, logrando altos niveles de expresión de las proteínas heterólogas (Baneyx, 1999).

Como resultado del capítulo 3, se obtuvo el clón recombinante pHMSP5, que expresa la proteína HMSP5 fusionada a un hexapéptido de histidina en la

región N-terminal, lo que facilita la purificación de la misma por IMAC. Este sistema de purificación se basa en la interacción entre metales de transición electropositivos y los residuos de histidina (Gaberc-Porekar y Menart, 2001) y tienen como ventajas que se realiza en un solo paso de purificación, ya sea en condiciones nativas o desnaturalizantes y las resinas empleadas son de gran durabilidad, reusables y compatibles con sales, detergentes y alcoholes (Boué, 2002).

Como pasos fundamentales para el proceso de obtención de la proteína recombinante purificada, resulta imprescindible conocer la cinética de expresión de la misma en función del crecimiento del clon recombinante, así como, establecer los parámetros de solubilización y purificación. De ahí que los objetivos del presente capítulo fueron los siguientes:

Objetivos Específicos:

1. Seleccionar la concentración óptima de IPTG para la expresión de la proteína recombinante.
2. Determinar la cinética de crecimiento de la cepa de *E. coli* BL21DE3pLysS/pHMSP5 y de expresión de la proteína HMSP5 en condiciones de laboratorio.
3. Determinar las condiciones de solubilización de la proteína recombinante HMSP5.
4. Establecer las condiciones de purificación de la proteína recombinante HMSP5, mediante IMAC.

4.2. Experimento 1: Evaluación de las condiciones óptimas para la obtención de la proteína recombinante HMSP5 en condiciones de laboratorio

4.2.1. Materiales y Métodos

4.2.1.1. Medios de cultivo y soluciones

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

4.2.1.2. Cepa

Se utilizó la cepa recombinante de *E. coli* BL21DE3pLysS/pHMSP5, obtenida en el Capítulo 3, conservada en glicerol, según lo descrito en el acápite 2.14., Capítulo 2.

4.2.2. Análisis de la expresión de la proteína recombinante HMSP5 con diferentes concentraciones de IPTG

Se partió de una siembra fresca en placa LBAC, con colonias aisladas de la cepa recombinante en estudio, obtenida a partir de un vial conservado en glicerol a -80°C.

Para determinar la concentración óptima de IPTG para la inducción de la cepa transformada con el plásmido recombinante, pHMSP5, se sembró una colonia en 20 mL de medio SOBAC y se mantuvo creciendo a 37°C, en agitación a 120 rpm en zaranda orbital termostatada (BIOZAR-2013) durante

14 horas. Se le determinó D.O. a una λ de 600 nm y a partir de este cultivo se inocularon frascos agitados con 25 mL de medio SOBAC con 0.1 unidades de D.O. y se crecieron en agitación en zaranda a 120 rpm y 37°C. Cuando alcanzaron 0.5 unidades de D.O a una λ de 600 nm, se les adicionó diferentes concentraciones de IPTG (Sigma), a partir de una solución preparada a 100 mM: 1 mM, 0.5 mM, 0.25 mM, 0.125 mM, 0.062 mM, 0.031 mM, 0.015 mM, 0.0075 mM, 0.0037 mM, 0.0018 mM, 0.0009 mM, 0.00045 mM, 0.00022 mM, 0.00011 mM. Los cultivos se mantuvieron creciendo después de la inducción durante 6 horas y en iguales condiciones se mantuvo un cultivo sin inducir. Al final del crecimiento se les determinó la D.O., medida a 600 nm y la misma se ajustó tomando como referencia la menor D.O. leída. Las muestras se procesaron como se describe en el acápite 3.3.1.7, Capítulo 3. El análisis de los resultados se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12 %, según el acápite 2.9, Capítulo 2.

4.2.3. Estudio de la cinética de crecimiento en condiciones de laboratorio

Se sembraron 100 mL de medio líquido SOBAC, con una colonia aislada, con las mismas condiciones descritas en el acápite 4.2.2. de este capítulo, y se mantuvo a 37°C, durante 14 horas en agitación a 120 rpm en zaranda. Se le determinó D.O. a una λ de 600 nm y se utilizó para inocular un cultivo de 1 L de medio SOBAC con 0.1 unidades de D.O. y se mantuvo en agitación hasta que alcanzó 0.5 unidades de D.O., a una λ de 600 nm. Con este valor se realizó la inducción de la expresión con 15 μM de IPTG (Sigma) y se mantuvo creciendo durante seis horas después. Se realizaron tres réplicas de este cultivo, con las mismas condiciones antes descritas y en paralelo se realizó en todos los casos un cultivo sin inducción de la expresión. En todos los cultivos se realizaron lecturas de D.O. a una λ de 600 nm, cada una hora antes y después de la inducción y se tomaron muestras que se procesaron para la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12 %, según la

metodología descrita en el acápite 3.3.1.7, Capítulo 3, pero sin ajustar la D.O.

Los cultivos inducidos provenientes de las tres réplicas, se centrifugaron a 4 000 rpm, durante 10 minutos (Jouan MR412), se desecharon los sobrenadantes y los sedimentos se conservaron a -80°C para su utilización en experimentos posteriores.

Partiendo de los valores de densidad óptica de las muestras tomadas antes y después de la inducción, se determinó la velocidad de crecimiento del cultivo (μ) y el tiempo requerido para duplicar la concentración celular (td), utilizando las siguientes fórmulas, según lo descrito por Jerpseth y col., (2004):

$$\mu = \frac{\log X - \log X_o}{t_x - t_o} 2.03 \quad (\text{horas}^{-1})$$

$$td = \frac{0.693}{\mu_{\max}} \quad (\text{horas ó minutos})$$

4.2.4. Determinación del porciento de expresión de la proteína HMSP5

A partir de las electroforesis de poliacrilamida-SDS realizadas a las muestras en el acápite 4.2.3. de este capítulo, se determinó el porciento de expresión de la proteína en el tiempo, con respecto a las proteínas totales de *E. coli,* utilizando el software ID Manager, 2004.

4.2.5. Determinación del peso seco

Se cosecharon 3 cultivos de 1 L, según las condiciones descritas en el acápite 4.2.3. de este capítulo y durante el crecimiento se tomaron muestras de 10 mL, cada una hora, antes y después de la inducción, se centrifugaron a 10 000 rpm, durante cinco minutos (Jouan MR412), se desecharon los sobrenadantes, los sedimentos se resuspendieron en 1 mL de agua destilada estéril y se les determinó el peso seco de la muestra en una balanza infrarrojo (Sartorius MA40).

4.2.6. Determinación de la estabilidad del plásmido recombinante pHMSP5, contentivo en las células BL21DE3pLysS

Este procedimiento se realizó según el PPO4.09.014.93. Se trabajó con las diluciones 10^{-5}, 10^{-6} , 10^{-7}, 10^{-8}, sembradas en placas de LB y LBA, y se seleccionó la dilución en la que en la placa hubiera de 30 a 300 UFC/mL de cultivo. La estabilidad del plásmido se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{\% de colonias que conservan el plásmido} = \frac{\text{\# de colonias en medio selectivo}}{\text{\# de colonias en medio rico}}$$

4.2.7. Análisis estadístico de los resultados

Para cada uno de los índices de crecimiento evaluados en los cultivos inducidos y no inducidos se determinó la media entre los mismos y sus desviaciones estándares. El promedio de las D.O. de las réplicas de los cultivos inducidos y sin inducir, así como, las desviaciones estándares para cada tiempo analizado se muestran en la Tabla 5 (Anexo 3); el promedio del porciento de expresión en el tiempo y las desviaciones estándar aparecen en la Tabla 6 (Anexo 3); el promedio de los valores de peso seco y las desviaciones estándar, en la Tabla 7 (Anexo 3) y el promedio del número de colonias en LB y LBA y las desviaciones estándar se muestran en la Tabla 8 (Anexo 3). Los valores de μ y td obtenidos para los cultivos inducidos y no inducidos, así como los resultados del conteo de colonias en el tiempo en los medios con antibiótico y sin éste, se compararon mediante la prueba de Kruskall-Wallis (Rius y col., 1999).

4.3. Experimento 2: Estudios de las condiciones de solubilización y purificación de la proteína recombinante HMSP5, obtenida en condiciones de laboratorio

4.3.1. Materiales y Métodos.

4.3.1.1. Soluciones

Las soluciones utilizadas se prepararon según la metodología descrita en el Anexo 1.

4.3.1.2. Materia prima

Se utilizaron los sedimentos obtenidos en el acápite 4.2.3. de este capítulo.

4.3.2. Estudio de las condiciones de solubilización de la proteína recombinante HMSP5

4.3.2.1. Determinación de la concentración de urea

La solubilización de la proteína HMSP5 se realizó en condiciones desnaturalizantes, partiendo del sedimento de un cultivo de 1 L obtenido según las condiciones descritas en el acápite 4.2.3. de este capítulo. En este caso, el cultivo se centrifugó en dos fracciones (I y II) de 500 mL cada una, a 5 000 rpm, durante 10 minutos (Jouan MR 412).

La fracción I se resuspendió en 25 mL de tampón A (Anexo 1) y la fracción II en 25 mL de tampón A conteniendo lisozima (0.75 mg/mL). Ambas fracciones se sonicaron en hielo, por 10 ciclos de 30 segundos cada uno, a 20 amplitudes (Bioblock Scientific), con intervalos de 10 segundos de reposo entre cada ciclo. Se separaron en alícuotas de 2 mL y estas se centrifugaron a 5 000 rpm durante 10 minutos (Eppendrf 5415C) y se tomaron muestras en ambos casos, tanto del sedimento como del sobrenadantre. El resto de los sedimentos se resuspendieron en 2 mL de tampón A y tampón A conteniendo lisozima, según correspondía, con diferentes concentraciones de urea (4 M, 6 M, 8 M). Las muestras se agitaron durante una hora a temperatura ambiente en rotador de tubos (RT-01, Retomed) y luego se centrifugaron a 5 000 rpm durante 10 minutos (Eppendorf 5415C), los sedimentos se resuspendieron en 200 μL de PBS y se analizaron con los sobrenadantes y las muestras colectadas en el paso anterior, en gel de poliacrilamida-SDS al 12 %, según lo descrito en el acápite 2.9, Capítulo 2.

4.3.2.2. Determinación de los ciclos de sonicación y el tiempo de solubilización adecuados

Se partió del sedimimento de un cultivo de 1 L, cosechado según las condiciones descritas en el acápite 4.2.3 de este capítulo. El sedimento se resuspendió en 50 mL del tampón B, (50 mL de tampón frío por L de cultivo), que contenía la concentración óptima de urea, determinada según las condiciones descritas en el acápite 4.3.2.1., y se realizaron 10 ciclos de sonicación de 30 segundos a 20 amplitudes (Bioblock Scientific) en hielo, con intervalos de 10 segundos de reposo entre cada ciclo y dos sonicaciones de cinco ciclos más cada una, en las mismas condiciones descritas en este acápite, conservando en cada caso 20 mL de muestra no sometida al siguiente tratamiento. Las muestras colectadas se dejaron solubilizando durante una hora en hielo, con agitación (Rotor RT-01, Retomed), tomándose 1 mL de cada una al culminar dicho tiempo y se continuó el proceso de solubilización hasta dos horas. Las muestras seleccionadas durante el proceso, se centrifugaron a 5 000 rpm durante 10 minutos (Eppendorf 5415C) y se tomaron alícuotas tanto del sedimento resuspendido en 100 μL de PBS, como del sobrenadante, para el análisis de los resultados por electroforesis de poliacrilamida-SDS al 12 %, según la metodología descrita en el acápite 2.9, Capítulo 2.

4.3.3. Determinación de la concentración de imidazol para la purificación de la proteína HMSP5

Para la purificación mediante IMAC, se determinó la concentración óptima de imidazol, realizando un gradiente de concentración del reactivo, a partir de una solución 2 M. Para esto se partió del sedimento de un cultivo de 1 L, resuspendido en 50 mL de solución tampón C, el cual se sonicó y solubilizó según las condiciones óptimas seleccionadas en los experimentos realizados en los acápites 4.3.2.1. y 4.3.2.2. de este capítulo.

El sobrenadante se prefiltró en filtros millipore de 0.45 μm (Sartorius) y se filtró en filtros de 0.2 μm (NALGENE™, Merck). A partir de este filtrado se procedió a la purificación de la proteína recombinante con gradiente de

imidazol (Sigma) en solución tampón D, pH 8: 10 mM, 20 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 100 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 500 mM. Para la purificación se utilizó una columna de Sepharose con Ni^{2+} acoplado (ProBond™, Invitrogen), siguiendo la metodología descrita por la casa productora. La columna se equilibró con tampón D con 10 mM de imidazol, se aplicaron 5 volúmenes de muestra solubilizada (10 mL) y la purificación se realizó con un flujo de 1-4 mL/minuto, colectando la muestra al salir de la columna. A continuación se lavó con el tampón anteriormente usado y se colectaron fracciones de 1 mL del lavado. La elusión se realizó con tampón D con 20 mM de imidazol, colectando igualmente fracciones de 1 mL. Seguidamente se realizó el mismo procedimiento con el tampón D con el resto de las concentraciones del gradiente de imidazol. Se determinó D.O. a 280 nm y se analizaron mediante electroforesis de poliacrilamida-SDS al 12 %, según la metodología descrita en el acápite 2.9, Capítulo 2, las muestras que las lecturas dieron valores.

4.3.4. Purificación y determinación de la concentración de la proteína recombinante HMSP5

Una vez establecidos los parámetros de solubilización y purificación, obtenidos de los experimentos realizados en los acápites 4.3.2.1., 4.3.2.2. y 4.3.3. de este capítulo se pasó a la purificación de la proteína recombinante HMSP5 a partir de un cultivo de 1 L, obtenido según las condiciones descritas en el acápite 4.2.3. de este capítulo. Se calculó el rendimiento obtenido en el proceso, así como el recobrado del proceso de purificación, según lo descrito por Platis y Foster, (2003), teniendo en cuenta la cantidad de proteína presente en la muestra aplicada a la columna y la pureza de la proteína. Los resultados se visualizaron en gel de poliacrilamida-SDS al 12 %, según la metodología descrita en el acápite 2.9, Capítulo 2 y se procesaron utilizando el Software ID Manager, 2004. En todos los casos a las muestras se les determinó la concentración de proteína por el método descrito por Bradford, (1976).

Las fracciones en las que estaba presente la proteína se unieron y se dializaron contra cinco volúmenes de PBS, con tres cambios cada cuatro horas, utilizando membranas de diálisis con un poro de exclusión de 10 000 kDa (Sigma). Al finalizar la diálisis, la muestra resultante se concentró por ultrafiltración con tubos de Amicon de 15 mL con un punto de exclusión de 10 000 kDa (Polylabo), mediante centrifugaciones a 1 500 rpm durante 15 minutos (Jouan CR 412).

4.3.5. Detección inmunológica de la proteína HMSP5 purificada

La detección inmunológica de la proteína se realizó según la metodología descrita en el acápite 2.10, Capítulo 2, utilizando el antisuero policlonal monoespecífico anti MSP5 (Lago y col., 1998).

4.3.6. Prueba de concepto con la proteína HMSP5 purificada

Se realizó un ensayo tipo ECL para determinar si la proteína era reconocida por el suero de un animal positivo a *A. marginale*. Se analizaron diferentes concentraciones de proteína, 1000 ng, 500 ng, 250 ng, 125 ng, 62.5 ng y 31,5 ng, aplicando en una membrana Hybond (Amersham) 100 uL de cada dilución, por duplicado. Una membrana se puso a reaccionar con un suero negativo a *Anaplasma marginale* y la otra con un suero positivo, (Acápites 2.15 y 2.16, Capítulo 2), diluidos 1/50. Las membranas se colocaron en leche descremada al 5% durante 30 minutos a 37°C, posteriormente se les adicionó en cada caso el suero correspondiente, y se mantuvieron en agitación en balancín (Griffin and George LTD), durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se le adicionó el conjugado antibovino peroxidasa 1/5 000 (ICN/CAPPEL) y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Se lavó tres veces con PBS/Tween 20, tres veces con PBS y posteriormente se fijó en una película de autoradiografía (Kodak), durante 30 segundos y se reveló con solución fijadora y solución de lavado (Kodak).

4.5. Resultados y Discusión

En la evaluación de las condiciones óptimas de inducción de la expresión, utilizando diferentes concentraciones de IPTG (Fig. 13) se puede apreciar que a concentraciones entre 1 mM y 15μM se obtienen altos niveles de expresión

de la proteína recombinante HMSP5. Sin embargo, con concentraciones inferiores a 15 μM, no se logra expresar la proteína. Estos resultados son de gran importancia porque permiten abaratar el proceso de obtención de la proteína, ya que el IPTG constituye el principal gasto de dicho proceso, sin embargo esto raramente constituye un problema, si el producto a obtener tiene un alto valor añadido. Por otra parte, Glascock y Weickert, (1998); Baneyx, (1999), demostraron que en muchos casos, 50-100 μM del inductor son usualmente suficientes para lograr una inducción completa y que para plásmidos con alto número de copias (ejemplo: plásmidos derivados del pUC), se puede lograr la expresión con niveles tan bajos de IPTG como 10 μM, lo que justifica que con sólo 15 μM del inductor aún se obtienen elevados niveles de expresión de la proteína.

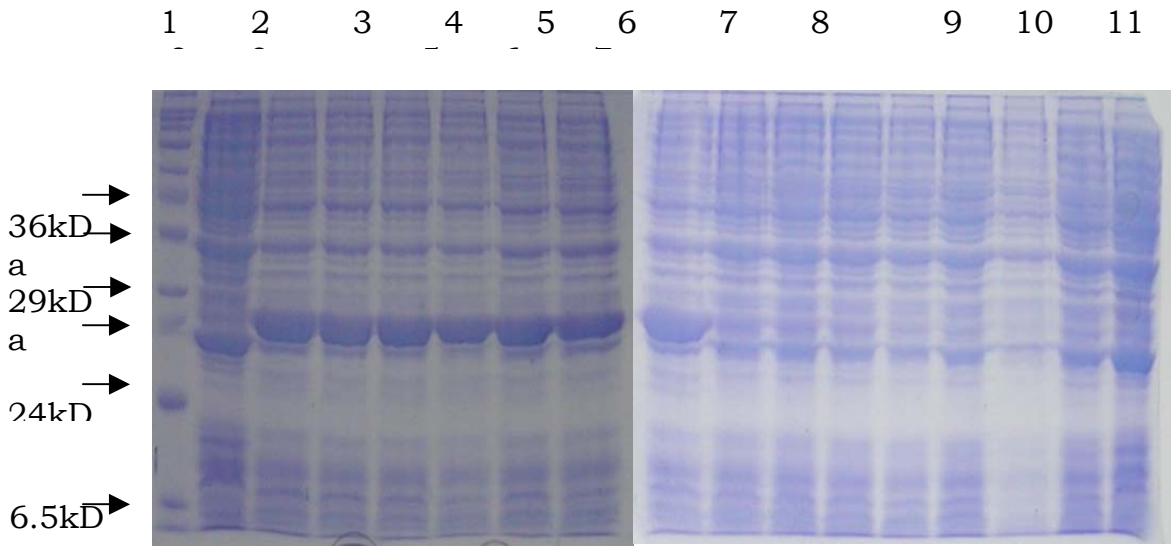


Figura 13: Inducción de la expresión de la proteína HMSP5 con diferentes concentraciones de IPTG. Línea 1: Marcador de peso molecular de amplio rango (Sigma); 2: Cultivo no inducido; 3: IPTG 1 mM; 4: IPTG 0.5 mM; 5: IPTG 0.25 mM, 6: IPTG 0.125 mM; 7: IPTG 0.062 mM; 8: IPTG 0.031 mM; 9: IPTG 0.015 mM; 10: IPTG 0.0075 mM; 11: IPTG 0.0037 mM; 12: IPTG 0.0018 mM; 13: IPTG 0.0009 mM; 14: IPTG 0.00045 mM; 15: IPTG 0.00022 mM; 16: IPTG 0.00011 mM, 17: Cultivo no inducido.

A partir de la concentración óptima de IPTG seleccionada (15 μM), se estudió la cinética de crecimiento de la cepa de *E. coli* BL21DE3pLysS/pHMSP5, en condiciones de laboratorio, pues se recomienda que deben estar establecidas las condiciones de crecimiento y expresión óptimas para la proteína de

interés en cultivos a pequeña escala, antes de experimentar la obtención de la misma a escala del fermentador (Koltermann y col., 1997).

En la Figura 14 se observa que no hubo fase de latencia en el crecimiento del microorganismo, lo que no coincide con lo reportado por Calcott y col., (1988), para las curvas de crecimiento de *E. coli.* Sin embargo, esto se justifica dado que el inóculo utilizado se encontraba en fase exponencial y se añadió al mismo medio de cultivo fresco, por lo que la cepa no necesitó tiempo para adaptarse y continuó multiplicándose y creciendo exponencialmente durante seis horas, a partir de las cuales se comienza a observar la meseta de crecimiento estacionario. Estos resultados coinciden con las características de la curva de crecimiento de *E. coli* para las fases logarítmica y estacionaria, discutidas por Martinko, (1999), que plantea que la fase de crecimiento exponencial se caracteriza por un incremento de la población, en el que el número de células se duplica cada cierto período de tiempo y la fase estacionaria está caracterizada por no haber un incremento alto o decremento del número de células. En esta fase no tiene lugar crecimiento, pero pueden tener lugar muchas funciones celulares que incluyen el metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos.

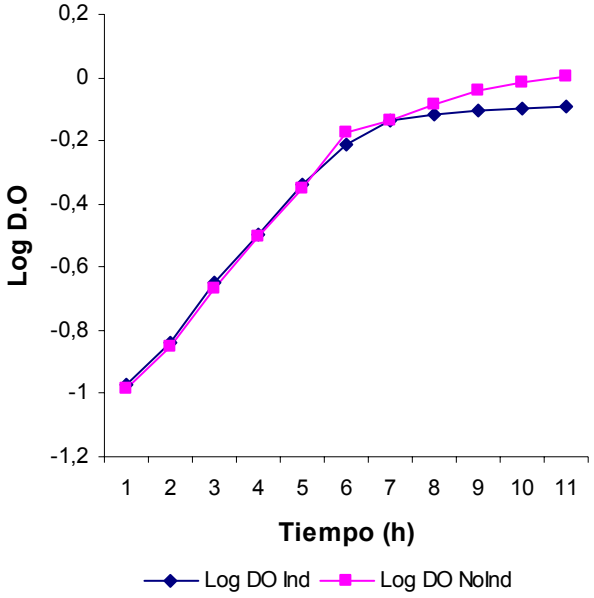


Figura 14: Cinética de crecimiento de la cepa recombinante de *Escherichia coli* BL21DEpLysS/pHMSP5, en el cultivo inducido y no inducido.

En las mejores condiciones nutricionales la bacteria *E. coli* puede completar su ciclo de crecimiento en unos 15 a 20 minutos, pero la velocidad de crecimiento exponencial puede variar, ya que está influenciada por las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio de cultivo y otros), así como por las características genéticas del microorganismo en cuestión (Martinko, 1999). La μ del cultivo sin inducir de la cepa recombinante BL21DE3LysS/pHMSP5 fue de 0.402 h^{-1} y para el inducido fue de 0.360 h^{-1}, así como los td fueron de 1.725 horas y 1.927 horas, respectivamente, existiendo**,** entre las dos condiciones evaluadas diferencias significativas en cuanto a los índices de crecimiento analizado ($p \leq 0.05$), lo cual demuestra que con la adición de IPTG al medio se provocan cambios en la fisiología del microorganismo, debido a que se induce la expresión de la proteína HMSP5, que al parecer alcanza una concentración inhibitoria del crecimiento por ser tóxica para el mismo, o tiene algún otro efecto adverso para la célula hospedera. Un resultado similar fue obtenido por Cinquin y col., (2001), al expresar una proteína de *Plasmodium falciporum* en las células BL21DE3, observando que las células tenían un td de aproximadamente 40 minutos (0.66 horas) y que el crecimiento celular se inhibió con la adición de IPTG, confirmando que la proteína era tóxica para la célula.

Los niveles de expresión de la proteína recombinante, en función del crecimiento de la cepa recombinante en el cultivo inducido, aumentan en el tiempo, alcanzando su valor máximo a las cinco horas después de la inducción, siendo este de un 22 %, como promedio entre las réplicas, con respecto a las proteínas totales de *E. coli* (Fig. 15). Estos resultados se corresponden con la fase estacionaria del crecimiento del microorganismo (Figs. 15 y 16) y permiten determinar en que momento se debe detener el proceso de crecimiento y de esta forma obtener la materia prima necesaria para la posterior purificación de la proteína HMSP5.

Grossman y col., (1998); Baneyx, (1999) plantearon que la producción de proteínas heterólogas en cepas de *E. coli* que contengan el profago λDE3 codificando la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor *lacUV5*, inducible con IPTG, sintetizan gran cantidad de ARNm, y la proteína de interés se acumula a altas concentraciones, con respecto a las proteínas de la cepa hospedera. Sin embargo, en ocasiones esto tiene, entre otras limitantes, que la proteína de interés se segrega total o parcialmente dentro de cuerpos de inclusión, aspecto que se debe tener muy en cuenta, en el proceso de purificación, pues la proteína HMSP5, se expresa a altos niveles con respecto al resto de las proteínas de *E. coli*.

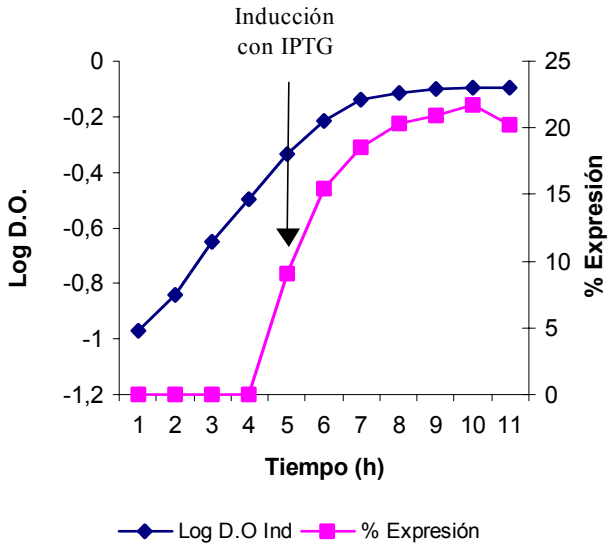


Figura. 15: Cinética de expresión de la proteína recombinante HMSP5 en cultivos de la cepa recombinante en el tiempo.

A partir de las cinco horas, después de la inducción con IPTG, los niveles de expresión de la proteína comienzan a decrecer, debido fundamentalmente, a la disminución del crecimiento del microorganismo como consecuencia de la ausencia de nutrientes y 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, coincidiendo con la fase de desaceleración del crecimiento (Narciandi, 1999; Ramchuran, y col., 2002).

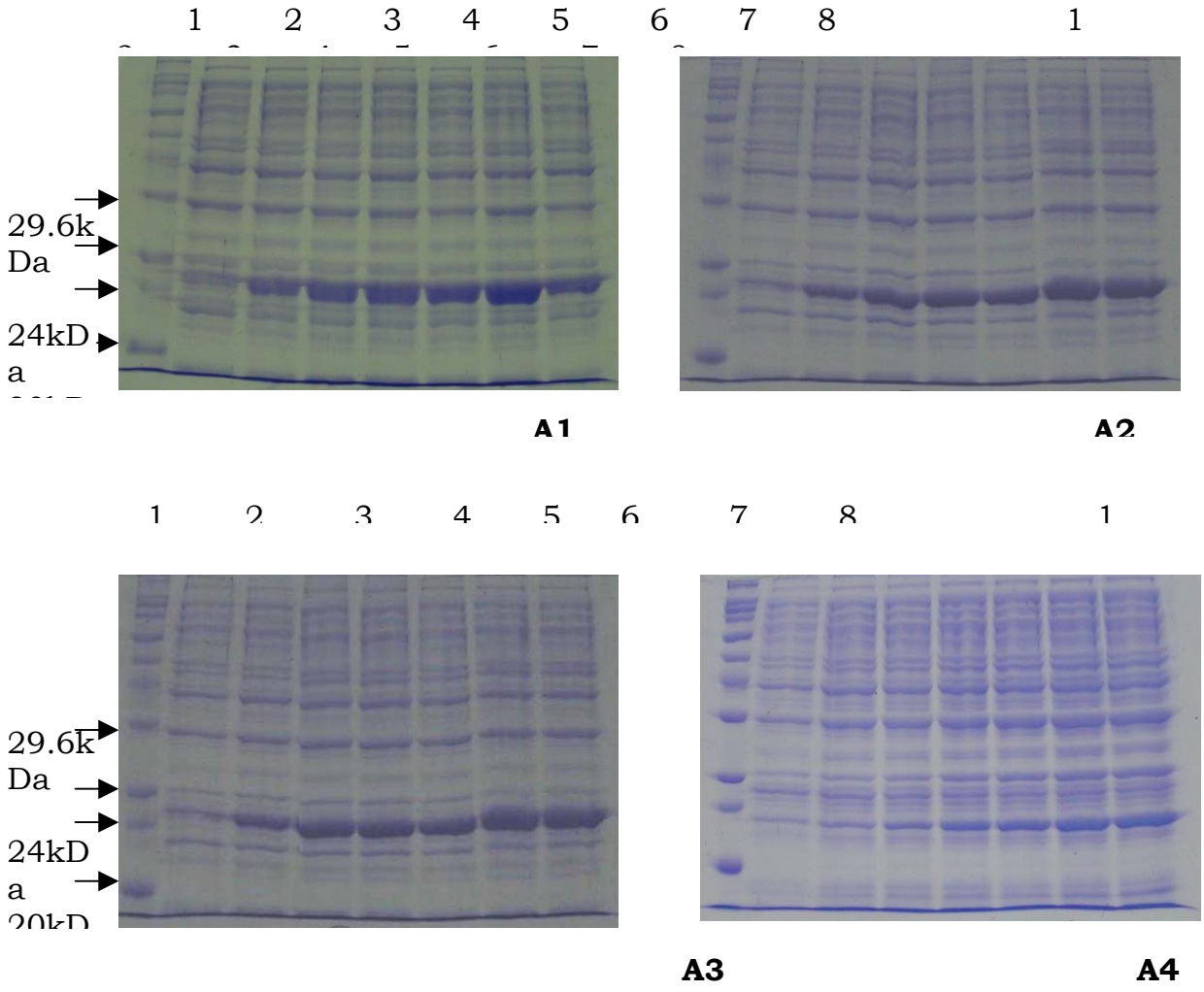


Figura 16: Expresión de la proteína recombinante HMSP5 en condiciones de laboratorio. A1, A2, A3: Réplicas de cultivos inducidos. Línea 1: Marcador de peso molecular de amplio rango (Sigma), 2: Muestra tomada antes de la inducción (**to**), 3-8: Muestras tomados a intervalos de una hora después de la inducción. A4: réplica de cultivo no inducido. Línea 1: Marcador de peso molecular de amplio rango (Sigma), 2-8: Muestras tomadas a intervalos de una hora.

Cuando se determinaron los valores de peso seco, pudimos observar que estos aumentan en el tiempo, sin embargo, el valor máximo que se obtiene es de 0.8 ± 0.0141 g por L de cultivo (Fig. 17). La expresión de las proteínas recombinantes a altos niveles, es una rápida respuesta de estrés y cambios en el metabolismo de *E. coli* (Jürgen y col., 2000). Esta respuesta celular puede llevar a la inestabilidad del plásmido, destrucción del ribosoma, inhibición del crecimiento, e incluso lisis celular (Mec-Jung y col., 2003). Los niveles de expresión de la proteína recombinante HMSP5 al parecer influyen de manera directa y negativa en el crecimiento celular, de ahí que los valores de peso seco máximos no sobrepasen los 0.8 g por L de cultivo, no obstante se obtienen niveles altos de expresión de la proteína.

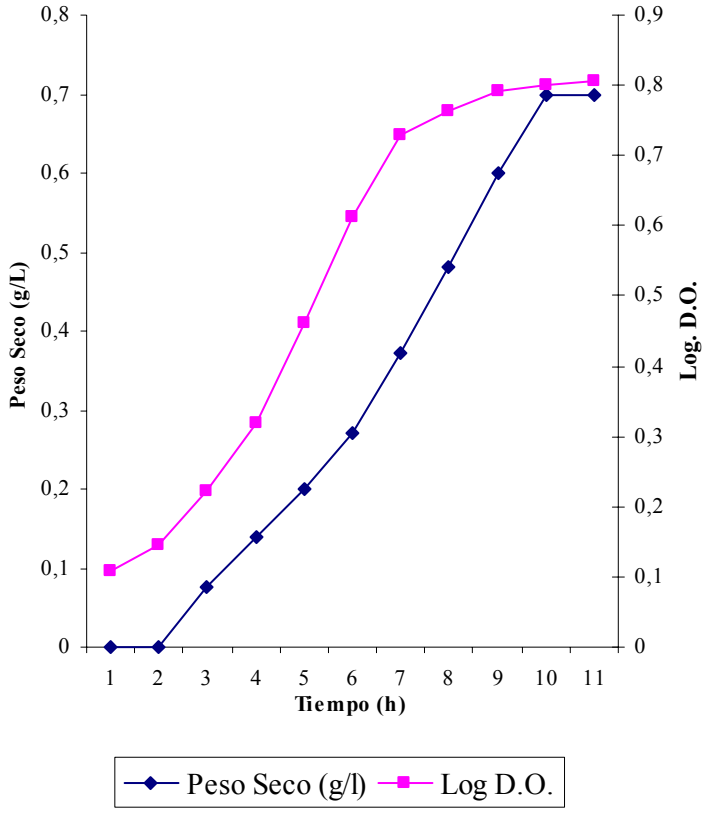


Figura 17: Cinética de crecimiento de la cepa de *E. coli* BL21DEpLysS/pHMSP5 (D.O. y peso seco).

Para el estudio de la estabilidad del plásmido pHMSP5, se seleccionó la dilución 10^{-5}, pues los resultados obtenidos en cuanto al número de UFC/mL de cultivo estaban entre los parámetro indicados (Fig. 18). A partir de la inducción con IPTG se comienzan a observar diferencias significativas ($p \leq 0.05$), entre el número de colonias presentes en el medio con antibiótico y sin este, lo cual no ocurrió antes de la inducción, donde el número de colonias era semejante en ambos medios, debido a la posibilidad que brinda nuestro sistema de expresión, de mantener silente el gen recombinante hasta el momento de la inducción, por lo que al parecer la proteína es tóxica para la célula, pues a partir de que esta comienza a aparecer en el medio de cultivo, es que se ve afectada la estabilidad del plásmido.

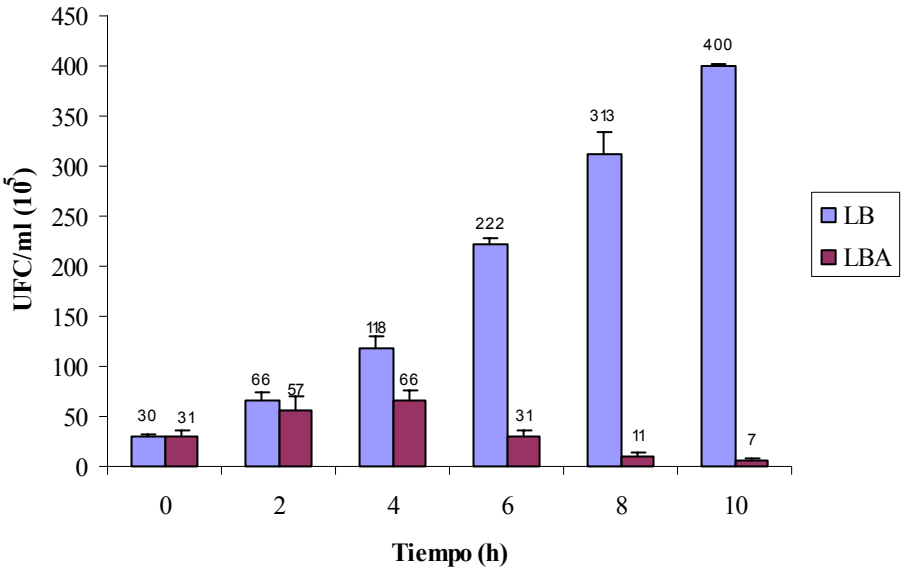


Figura 18: Estudio de estabilidad del plásmido recombinante pHMSP5 con la dilución 10^{-5}.

Resulta importante tener en cuenta que el gen msp5 está clonado bajo el control de señales de transcripción y de traducción del bacteriófago T7, que proporcionan una fuente de T7 RNA polimerasa al medio donde se cultiva la cepa hospedante. Esta enzima es muy activa y selectiva, lo cual provoca que la mayor parte de los recursos de la célula se inviertan en la producción de la proteína recombinante (Olson y col., 1998) y se disminuya la expresión de otras proteínas como la β lactamasa (necesaria para el crecimiento celular en

medio de cultivo con ampicilina). Además, al parecer, los elevados niveles de expresión de HMSP5 tienen un efecto tóxico sobre la célula, llevando consigo un decremento en el crecimiento celular e inestabilidad del plásmido con valores de 3.5 % de estabilidad, calculada para la dilución de 10^{-5} . Como se planteó con anterioridad, estos sistemas que codifican para la T7 RNA polimerasa, bajo el control del promotor *lacUV5*, sintetizan gran cantidad de mARN, lo que puede causar destrucción del ribosoma y muerte celular.

De igual forma, altos niveles de expresión de la T7 RNA polimerasa pueden resultar en inestabilidad en el plásmido e incluso en la expresión; sin embargo, este último aspecto de inestabilidad en la expresión al parecer no afecta la expresión de la proteina HMSP5, si tenemos en cuenta el porcentaje de expresión, con respecto a las proteínas totales de *E. coli*. Similares resultados se obtuvieron por Tierny y col., (1999), con la sobreproducción de una proteína recombinante, que observaron que al disminuir los niveles de expresión de la proteína de interés, la estabilidad del plásmido fue mejorada.

Autores como Berthold y col., (1992) y Saito y col., (1993), plantearon que los sistemas donde se obtienen altos niveles de expresión de las proteínas recombinantes, favorecen la formación de cuerpos de inclusión. Teniendo en cuenta estos planteamientos y los resultados de Haqshenas y col., (2002), que utilizando el sistema de clonaje y expresión en el pRSET C, vector que solo se diferencia del pRSET B, en el corrimiento de una base en el sitio de multiclonaje, expresaron una proteína como cuerpos de inclusión, y que esto se favorece cuando se emplean sistemas que permiten altos porcientos de expresión de los genes clonados (Baneyx, 1999), como los obtenidos para la proteína HMSP5, se realizó un estudio donde se pudieron determinar los parámetros para lograr una óptima solubilización de la proteína bajo condiciones desnaturalizantes. Similares condiciones fueron utilizadas por Yang y col., (2004) y Jaiswal y col., (2004), para la solubilización de proteínas recombinantes que se encontraban en cuerpos de inclusión.

En la Figura 19A, se observa que a medida que aumenta la concentración de urea, aumenta la solubilización de la proteína en el tampón utilizado, por

lo que se seleccionó 8M de urea como la concentración adecuada para estos procesos, a la cual se obtiene la mayor solubilización de la proteína. No existen diferencias cuando se adiciona lisozima en el tampón utilizado para la solubilización de la proteína HMSP5 (Fig. 19A y B). Esto podría deberse a que la cepa utilizada, expresa la lisozima en cantidades considerables y a pesar de que estas disminuyen después de la inducción, aún es suficiente para ejercer su función de corte de la unión de los peptidoglicanos a la pared celular (Zouhar y col., 1999), facilitando la lisis celular y conjuntamente con la sonicación y la presencia de urea 8 M, garantizar el paso de la proteína HMSP5 a la fracción soluble, por lo que se hace innecesaria la adición de la lisozima en el tampón de solubilización.

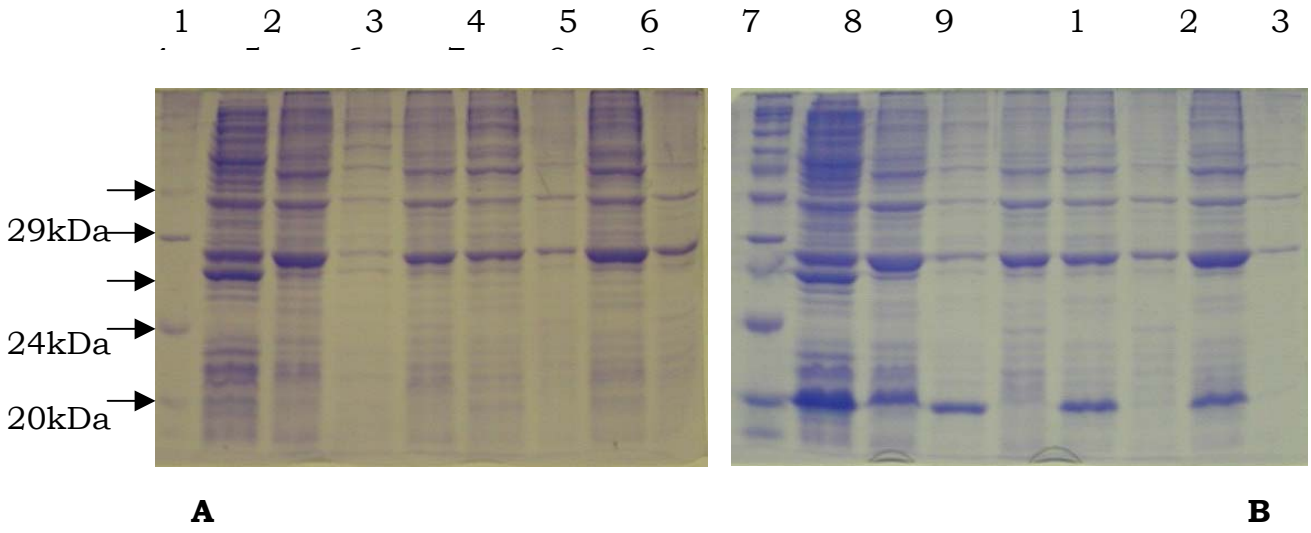


Figura 19: Estudio de las condiciones óptimas de solubilización de la proteína recombinante HMSP5. **A**: en ausencia de lisozima, **B**: con la presencia de lisozima. Línea 1: Marcador de peso molecular de amplio rango (Sigma), 2: Sobrenadante de la solubilización sin urea, 3: Sedimento de la solubilización sin urea: 4: Sobrenadante de la solubilización con urea 4M, 5: Sedimento de la solubilización con urea 4M, 6: Sobrenadante de la solubilización con urea 6M, 7: Sedimento de la solubilización con urea 6M, 8: Sobrenadante de la solubilización con urea 8M, 3: Sedimento de la solubilización con urea 8M.

Se evidencia que no hay diferencias entre los ciclos de sonicación utilizados para lograr el paso de la proteína a la fracción soluble (Fig. 20A y B), por lo que se seleccionó el valor de 10 ciclos de sonicación a 20 amp de 30

segundos cada uno, con intervalos de reposo de 10 segundos, encontrándose este valor en el rango recomendado (The QIA Expressionist, 1997), con el objetivo de lograr la ruptura de la pared por la acción de las ondas ultrasónicas, sin dañar la proteína de interés y además teniendo en cuenta que una sobresonificación puede provocar la copurificación de proteínas del hospedero.

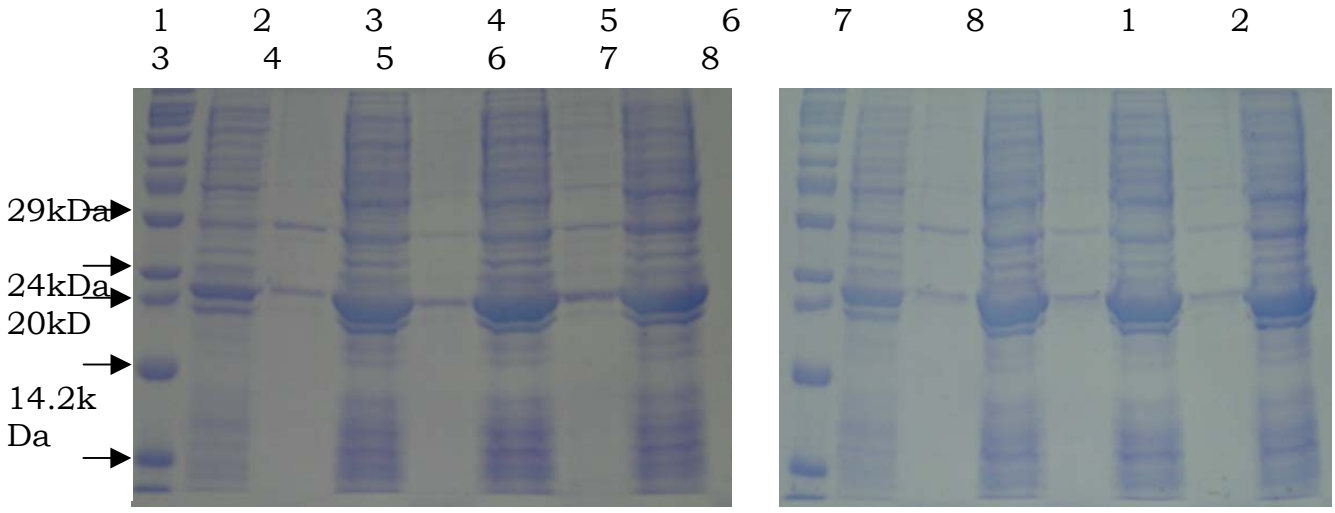


Figura 20: Estudio de las condiciones óptimas de solubilización de la proteína recombinante HMSP5. **A**: Después de una hora de solubilización, **B**: Después de 2 horas de solubilización. Línea 1: Marcador de peso molecular de amplio rango (Sigma), 2: Muestra inicial, 3: Sedimento de 10 ciclos de sonicación, 4: Sobrenadante de 10 ciclos de sonicación, 5: Sedimento de 15 ciclos de sonicación, 6: Sobrenadante de 15 ciclos de sonicación, 7: Sedimento de 20 ciclos de sonicación, 8: Sobrenadante de 20 ciclos de sonicación.

Se comprobó además que no existen diferencias entre las muestras analizadas, tanto para los sedimentos como para los sobrenadantes, a 1 hora y 2 horas de solubilización (Fig. 20A y B), por lo que se seleccionó una

hora para evitar hacer más prolongado y trabajoso dicho proceso y de esta forma completar la estandarización de las condiciones de solubilización de la proteína recombinante. Una vez determinados estos parámetros, se determinaron las mejores condiciones de purificación.

La cromatografía de afinidad por interacción con quelatos metálicos, que se utiliza en el proceso de purificación, se ha convertido en una técnica de amplio uso por las ventajas que ofrece, ya que puede ser aplicada tanto en condiciones desnaturalizantes como no desnaturalizantes, y hace que el proceso de purificación sea más simple.

El imidazol es empleado en la purificación de la proteína, cuando se utiliza la IMAC, con el objetivo de que ocurra la disociación de los residuos de histidina de la matriz de la columna (Ni-NTA), mediante competencia con este reactivo. Los bajos niveles de imidazol, utilizados en el tampón de unión y lavado, permiten la elusión selectiva de contaminantes y proteínas que cosedimentan durante el aislamiento de los cuerpos de inclusión, los que se encuentran unidos menos fuertemente a la resina, mientras que las proteínas con los 6 residuos consecutivos de histidina, como la HMSP5, presentan una fuerte afinidad por la resina Ni-NTA, determinada por dichos residuos, por lo que no se ve afectada su especificidad de unión (Janknecht y col., 1991). Al aumentar la concentración de este reactivo, el mismo se une a la matriz y desplaza a la proteína de interés, ya que tanto la histidina como el imidazol, tienen una estructura química similar, por lo que compiten por los mismos sitios de unión a la resina. Según Hamilton y col., (2003), el imidazol tiene efectos de solubilización y estabilización de proteínas fusionadas a hexapéptidos de histidina y proteínas recombinantes poco solubles.

El empleo de este método de purificación con el imidazol afecta menos a la proteína recombinante, que el que emplea una disminución del pH, ya que este último le puede ocasionar daños a las proteínas (The QIA expressionist, 1997) y el hecho de que no se utilice urea en el tampón de elusión de la proteína, facilita el proceso de purificación, porque evita tener que eliminarla

en pasos posteriores. Un protocolo de elusión similar fue utilizado por Shao-hui Cai y col., (2004), para la purificación de una proteína recombinante, con buenos resultados.

Para la purificación de la proteína recombinante HMSP5 se empleó un sistema de purificación basado en este principio, utilizando los resultados del gradiente de imidazol (Fig. 21), a partir del cual se obtuvieron las concentraciones adecuadas de dicho reactivo para el proceso de purificación. Estas concentraciones fueron de 50 mM para lograr la correcta adsorción de la proteína HMSP5 a la resina de la matriz de la columna y de 250 mM para lograr la elusión de la misma, observándose además que en la fracción correspondiente a la elusión con 200 mM de imidazol también hay una pequeña cantidad de la proteína que eluye, sin embargo en 250 mM es que se logra la mayor elusión de la proteína (Fig. 21).

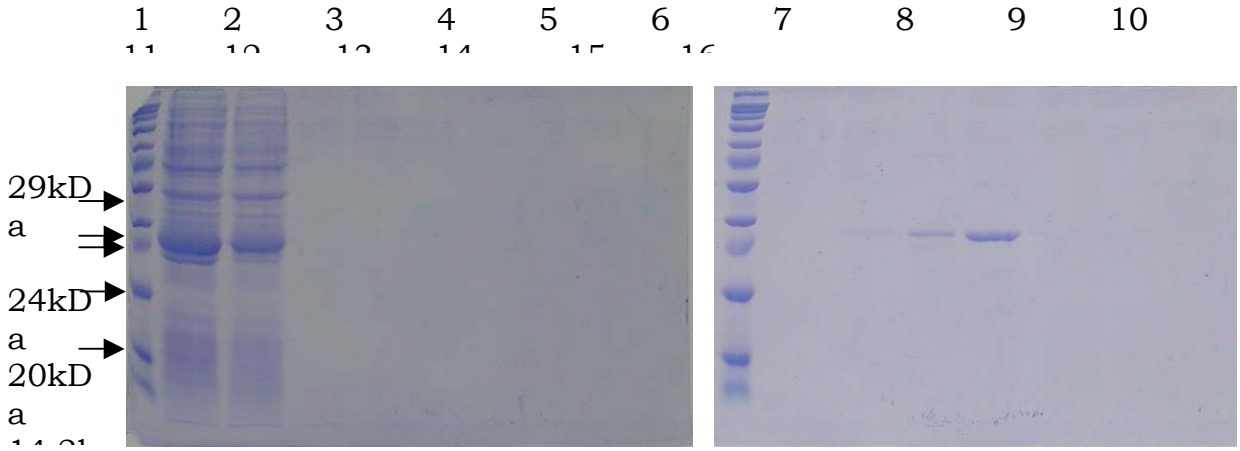


Figura 21: Purificación de la proteína HMSP5 por gradiente de imidazol .1: Marcador de peso molecular de amplio rango (Sigma), 2: Muestra inicial, 3: Muestra pasada por la columna, 4: lavado con tampón de equilibrio (tampón I), 5: Elusión con 10 mM de imidazol, 6: Elusión con 20 mM de imidazol, 7: Elusión con 40 mM de imidazol, 8: Elusión con 50 mM de imidazol, 9: Elusión con 60 mM de imidazol, 10: Marcador de peso molecular de amplio rango (Sigma), 11: Elusión con 100 mM de imidazol, 12: Elusión con 150 mM de imidazol, 13: Elusión con 200 mM de imidazol, 14: Elusión con 250 mM de imidazol, 15: Elusión con 300 mM de imidazol, 16: Elusión con 500 mM de imidazol.

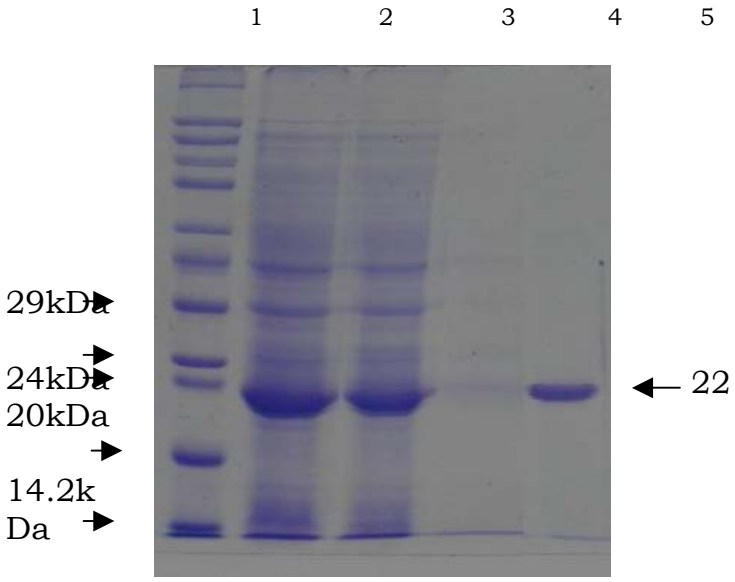


Figura 22: Purificación de la proteína HMSP5. Línea 1: Marcador de peso molecular de amplio rango (Sigma), 2: Muestra inicial, 3: Muestra después de la interacción con la columna, 4: Lavado con tampón de equilibrio, 5: Proteína HMSP5 purificada.

Como se puede observar en la Figura 22, se logró la purificación de la proteína HMSP5 con las condiciones de unión y elusión seleccionadas, sentando las bases para un proceso de producción consistente. En la Tabla 9 se muestran los resultados del cálculo del rendimiento y el recobrado del proceso de obtención de la proteína HMSP5 purificada.

Tabla 9: Eficiencia del proceso de purificación de la proteína HMSP5.

Muestra	Recobrado (%)	Rendimiento (mg/L de cultivo)	Impurezas por SDS-PAGE	% de Pureza
HMSP5	45	41	No visibles	95 %

En el valor obtenido en el recobrado, a pesar de estar en los parámetros establecidos para un proceso eficiente (Boué, 2002), pueden influir razones estereoquímicas, como inestabilidad de la proteína para unirse suficientemente bien a la matriz, al estar asociada con otras proteínas, de manera tal que la cola de histidina no queda suficientemente expuesta

(Platis y Foster, 2003), pues como se observa en la Figura 22, una parte de la proteína no se pegó a la matriz, lo que influye de manera directa en el recobrado de la misma. Sin embargo, el valor de recobrado resultó superior al obtenido por Zouhar y col., (1999) y Platis y Foster, (2003), que logran sólo un 21 % de recobrado, utilizando IMAC con columna de Sepharose- NTA Ni^{2+}. Resulta importante destacar el hecho de obtener la proteína con un 95 % de pureza, lo que permite que pueda ser utilizada en un ensayo diagnóstico para la detección de anticuerpos.

La proteína purificada se reconoció en el inmunoblot por el antisuero policlonal monoespecífico anti MSP5 (Lago y col., 1998) (Fig. 23). La misma, a diferentes concentraciones fue reconocida por un suero de bovino positivo a *A. marginale* y no apareció reacción alguna frente a un suero bovino negativo (Fig. 24), lo que indica que durante el proceso de purificación no perdió sus epitopes a nivel de estructura primaria, aspecto muy importante para el desarrollo de un medio diagnóstico a partir de la misma.

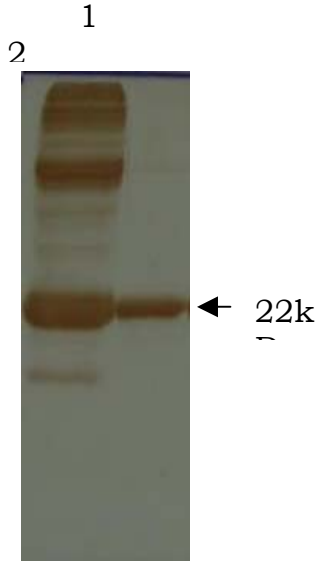
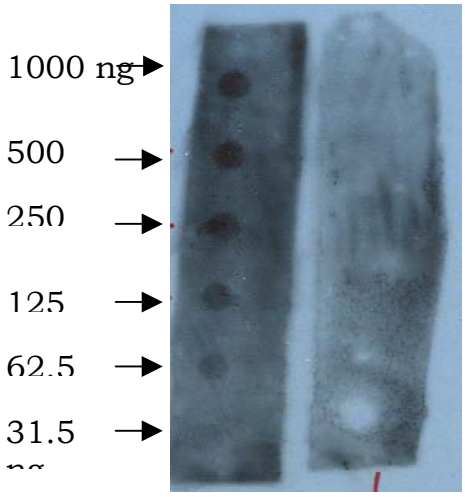


Figura 23: Reconocimiento de la proteína HMSP5 purificada, por el antisuero policlonal monoespecífico anti MSP5. Línea 1: Cepa BL21DE3pLysS/pHMSP5 inducida, 2: Proteína HMSP5 purificada.



A

Figura 24: Resultados del ECL. **A**: Diferentes concentraciones de la proteína HMSP5 purificada, frente a un suero positivo a *Anaplasma marginale*. **B**: Diferentes concentraciones de la proteína HMSP5 purificada, frente a un suero negativo de *Anaplasma marginale.*

Los resultados obtenidos sientan las bases para la obtención de un sistema de alta sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos contra *A. marginale*, ya que el hecho de contar con un antígeno recombinante purificado, no solo posibilita la producción a un menor costo, sino que también permitirá el desarrollo de sistemas inmunocromatocráficos para la detección de portadores asintomáticos de la enfermedad, lo cual está siendo utilizado con mucha fuerza para los estudios epizootiológicos y para el movimiento de ganado a nivel internacional, tomando en cuenta que la anaplasmosis es una enfermedad exótica para muchos países exportadores de ganado.

4.6. Conclusiones parciales

1. La concentración de IPTG de 15 μM es la mínima necesaria para la expresión de la proteína recombinante HMSP5.
2. En condiciones de laboratorio, la proteína recombinante HMSP5 es expresada en un 22 % con respecto a las proteínas totales de *E. coli*, a las cinco horas después de la inducción.
3. La solubilización de la proteína se logra con urea 8 M, con 10 ciclos de sonicación, de 30 segundos, a 20 amp, con intervalos de 10 segundos de reposo entre cada sonicación, seguido de un tiempo de solubilización de 1 hora en hielo.
4. Las mejores condiciones de purificación de la proteína recombinante a escala de laboratorio, se lograron con una columna de Sepharose con Ni^{2+} acoplado (ProBond™), con 50 mM de imidazol para la unión de la proteína a la matriz de la columna y 250 mM para la elusión de la misma.
5. La proteína se logró purificar con un 95 % de pureza y un recobrado final de 41 mg por litro de cultivo.

CAPÍTULO 5: Utilización del gen msp5 y de la proteína recombinante HMSP5 en la detección de *A. marginale* y de anticuerpos contra este, en animales de tres unidades de la provincia La Habana

5.1. Introducción

Los animales que sobreviven a la anaplasmosis bovina aguda, después de una infección primaria, permanecen persistentemente infectados de por vida, independientemente de re-exposiciones a la rickettsia (Eriks y col., 1989), sirviendo como reservorio para la transmisión de la enfermedad en el campo (Eriks y col., 1993).

El control de la anaplasmosis bovina requiere de una vacuna efectiva y de la identificación exacta de los animales portadores. Los dos métodos recomendados para la detección de éstos son la identificación del ADN de la rickettsia en sangre, mediante técnicas moleculares y la detección de anticuerpos específicos contra *A. marginale* en suero (Knowles y col., 1996). Este último se hace difícil por los métodos serológicos de rutina (Nakamura y col., 1989), por lo que se hace necesario contar con técnicas de mayor sensibilidad y especificidad.

Trabajos previos han demostrado que la proteína MSP5 de *A. marginale* resulta de gran utilidad en ensayos de formato ELISA (Torioni y col., 1998), ya que elimina los problemas señalados de los antígenos crudos, utilizados en otras técnicas como la aglutinación en tarjeta y que el gen msp5 es de gran utilidad para el diagnóstico molecular, mediante PCR, en animales persistentemente infectados (Torioni y col., 1998). Este gen y su producto de expresión son recomendados en el monitoreo de animales para el movimiento internacional de ganado y en programas de control de la anaplasmosis bovina (Palmer y McElwain, 1995)

Ante los inconvenientes tecnológicos presentados por los ensayos ELISA, que conllevan la utilización de equipamiento y la necesidad de controlar la eficiencia de los reactivos comerciales, unido a que no son ensayos rápidos, ni de fácil manipulación (Pérez y col., 1995; Moros y col. , 2003,) los ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral, como medio de diagnóstico, constituyen un instrumento de gran utilidad, pues permiten la obtención rápida de datos confiables sobre diversas afecciones (Pemawansa y col., 1990), siendo sistemas muy versátiles y fáciles de realizar al lado del animal, sin necesidad de equipamiento, a lo que se debe agregar el bajo costo de los mismos. Estos sistemas no están descritos

en la actualidad para el diagnóstico de *A. marginale* u otros hemoparásitos de interés en el bovino.

Teniendo en cuenta las ventajas de estos sistemas de diagnóstico rápido y las potencialidades del gen msp5 y de la proteína MSP5, para ser utilizados en la detección de *A. marginale* y anticuerpos contra este, los objetivos del presente capítulo fueron los siguientes:

Objetivos Específicos:

1. Desarrollar un ensayo de PCR para demostrar la presencia de *A. marginale* en muestras de animales en explotación.

2. Demostrar la factibilidad de uso de la proteína recombinante HMSP5 en un ensayo inmunocromatográfico, de tipo tira reactiva, para la detección de anticuerpos contra *A. marginale* en animales en explotación.

5.2. Experimento 1: Detección de *A. marginale* mediante la amplificación por PCR del gen msp5 en animales experimentalmente infectados y muestras de animales en explotación

5.2.1. Materiales y Métodos

5.2.1.1. Soluciones: Las soluciones utilizadas en los experimentos se prepararon según la metodología descrita en el Anexo 1.

5.2.1.2. Muestras trabajadas

Se trabajó con muestras procedentes de tres establecimientos ganaderos de la provincia La Habana que realizan las actividades de cría con propósito lechero y se recogieron los datos que se muestran en la Tabla 10.

Se muestreó un total de 113 animales, de diferentes categorías. La sangre utilizada para el diagnóstico por frotis sanguíneo se obtuvo mediante punción de una vena de la cara interna de la oreja, previo lavado de la piel, con aguja de calibre 26 X 1/2, desechando las primeras gotas (Gainer, 1961). La sangre para el diagnóstico por PCR se obtuvo mediante punción

de la vena yugular, utilizando agujas hipodérmicas calibre 40 X 15 y tubos de cristal de fondo plano (Polylabo) con 10 mg de EDTA como anticoagulante. La sangre se lavó con PBS y se conservó en 30 % de glicerol (Alonso y col., 1988) a -20°C en crioviales (Neogene), sin descongelarse, hasta su uso.

Tabla 10: Características de los animales muestreados.

Vaquería	***Número de animales/ Sexo***	***Categoría/Raza***	***Morbilidad/Mortalidad***
CENSA *(Grupo 1)*	*25 /Hembras*	*Vacas/ Siboney*	*No Mortalidad/ no Morbilidad*
Vallé del Perú (Grupo2)	*46 /Hembras*	*Terneros 8-10 meses/ Siboney*	*No Mortalidad/ no Morbilidad.*
Los Naranjos (Grupo 3)	*42/Hembras*	*Vacas / Holstein*	*No Mortalidad/ no Morbilidad*

5.2.1.2.1. Controles positivos y negativos

Se trabajó con sangre de cinco animales experimentalmente infectados con la cepa Habana de *A. marginale*, (Acápite 2.15, Capítulo 2) y sangre de dos animales negativos a *A. marginale* (Acápite 2.16, Capítulo 2). La sangre se procesó según la metodología descrita en el acápite 5.2.1.2. de este capítulo.

5.2.1.3. Tinción de los frotis sanguíneos con colorante Giemsa

En todos los casos a la sangre de los animales muestreados, así como a los controles positivos y negativos se le realizó frotis, se tiñeron con Giemsa según la metodología descrita por Gainer, (1961) y se observaron al microscopio (OPTON) con lente de inmersión.

5.2.1.4. Purificación del ADN

El ADN de *A. marginale* se purificó siguiendo la metodología descrita por Ambrosio y Potgieter, (1987), a partir de 2 mL de sangre de los animales experimentalmente infectados, de los animales negativos y de los animales de campo, obtenida y procesada según la metodología descrita en los acápites 5.2.1.2. y 5.2.1.2.1. de este capítulo.

5.2.1.5. Amplificación del gen msp5 mediante PCR

La amplificación se realizó en un volumen final de 25 μL, con las mismas condiciones de reacción descritas en el acápite 3.2.1.5, del Capítulo 3, pero en este caso se utilizaron cebadores que no tenían en sus extremo 5´ sitios de reconocimiento para enzimas de restricción (Tabla 11).

Tabla 11: Secuencia nucleotídica (5'-3') de los cebadores utilizados para la amplificación del gen msp5.

Cebadores	*Secuencia*
Sentido	*5´GTGTTCGTTGGGGTGTGATAGATGAG 3´*
Antisentido	*5´TAAGAATTAAGCATGTGACCGCTGAC 3´*

5.2.1.6. Programa de amplificación utilizado

El programa de amplificación utilizado se muestra en la Tabla 12 y se diseñó teniendo en cuenta la Tm de los cebadores calculada según la fórmula descrita en el acápite 3.2.1.5., Capítulo 3.

Tabla 8: Programa de amplificación utilizado para la PCR.

Número de ciclos	*Temperatura (°C)*	*Tiempo (minutos)*
5	94	1
	60	1
	72	1
25	94	0.5
	65	0.5
	72	1
1	72	10

Las amplificaciones se realizaron en un equipo Mastercycler personal (Eppendorf) y los resultados se visualizaron utilizando la metodología descrita en el acápite 2.7., Capítulo 2.

5.2.1.7. Especificidad analítica del PCR

Para determinar la especificidad con otros hemoparásitos, se realizó la amplificación del gen msp5 a partir del ADN de *B. bovis*, *B. bigemina* y *Tripanosoma* spp. Se realizó además la amplificación a partir de ADN bovino. Para esto se utilizaron los mismos materiales y condiciones descritas en los acápites 3.2.1.4 y 3.2.1.5., Capítulo 3, excepto los cebadores.

5.2.1.7.1. Especificidad del PCR con diferentes aislamientos de *A. .marginale*

Para determinar la especificidad con diferentes aislamientos de *A. marginale* se utilizaron 50 ng de ADN de los aislamientos cubanos, Habana, Valle del Perú, Oriente 1 y del aislamiento Florida, obtenidos como se describe en los acápites 3.2.1.1., Capítulo 3 y 2.4., Capítulo 2.

5.2.1.8. Sensibilidad analítica del PCR

Para determinar la más baja concentración de ADN purificado que puede ser detectado, se trabajó con sangre de un animal inoculado con la cepa Habana de *A. marginale*, con un 50 % de parasitemia (Acápite 2.16, Capítulo 2). El ADN se purificó según la metodología descrita por Ambrosio y Potgieter, (1987), se realizaron diluciones en agua destilada estéril y 1μL de cada dilución fue utilizada en el PCR. Los resultados se visualizaron en gel de agarosa al 1 % en TBE 0.5X, según la metodología descrita en el acápite 2.8., Capítulo 2.

Todos los reactivos se manipularon bajo flujo laminar horizontal (BHA 72), utilizando puntas con filtros (Eppendorf) resistentes a los aerosoles.

Tabla 9: Diluciones realizadas al ADN ***de Anaplasma marginale.***

Dilución	*Concentración del ADN*
	100 ng/μL
1/10	10 ng/μL
1/100	1 ng/μL
1/1000	0.1 ng/μL
1/2000	0.05 ng/μL
1/3000	0.03 ng/μL
1/4000	0.025 ng/μL
1/5000	0.020 ng/μL
1/10000	0.010 ng/μL
1/50000	0.002 ng/μL

5.3. Experimento 2: Detección de anticuerpos contra *A. marginale* en animales en explotación, mediante un ensayo inmunocromatográfico rápido, utilizando la proteína HMSP5

5.3.1. Materiales y Métodos

5.3.1.2. Soluciones

Las soluciones utilizadas en este experimento se prepararon según la metodología descrita en el Anexo 1.

5.3.1.2. Muestras trabajadas

Se trabajó con muestras de suero de los animales estudiados por frotis y PCR, citados en el acápite 5.2.1.2. y los controles positivos y negativos citados en el acápite 5.2.1.2.1, de este capítulo .

5.3.1.3. Obtención de los sueros

Para la obtención de los sueros se trabajó con 5 mL de sangre sin anticoagulante, obtenida por punción de la vena yugular, utilizando agujas hipodérmicas calibre 40 X 15. La sangre se incubó a 37°C, durante una hora, posteriormente se mantuvo a 4°C durante 14 horas. Los sueros una vez colectados se conservaron en crioviales (Neogene) a -20°C, hasta el momento de su evaluación.

5.3.1.3. Soporte del ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral

Se empleó como soporte del ensayo, membrana de nitrocelulosa de 10 μr de tamaño del poro, comercializadas por MDI, Schleicher y Schuell, KENOSHA y Millipore, en vínculos con el CIGB.

5.3.1.3.1. Conjugación de la proteína HMSP5

La proteína HMSP5, a una concentración de1 μg/μL, se conjugó con oro coloidal BBi de 20nm de tamaño de partícula, a pH 7.5- 8, con 10 μL de K_2CO_3 0.1 M/mL de coloide. Se incubó 20 minutos a temperatura ambiente

y posteriormente se bloqueó con BSA al 10 % y pvp30 al 1 %, durante una hora a temperatura ambiente. Se centrifugó a 8000 rpm, durante 20 minutos (Centrífuga Jouan MR412) y el conjugado se resuspendió en tampón 1, se le determinó la D.O. a 520 nm y se le realizó una dilución a partes iguales en PBS para aplicar en la tira.

5.3.1.3.2. Preparación de la tira reactiva

En el soporte sólido, en la membrana porosa, se aplicó 1 μg/μL de la proteína HMSP5 purificada en forma de gota y se dejó secar a 37°C, durante una hora. Posteriormente se aplicó en la membrana absorbente la proteína HMSP5 conjugada con oro coloidal (5 μL), teniendo en cuenta la D.O. que se determinó en el acápite 5.3.1.3.1. de este capítulo.

5.3.1.3.3. Reacción frente a las muestras

La tira reactiva con la proteína marcada con oro coloidal fijada en su superficie, se introdujo, durante 10 minutos en las muestras de sueros controles y sueros problemas, diluidos a 1/20 en PBS y se secaron a temperatura ambiente. La muestra será positiva por la aparición de coloración rosada en la zona de aplicación de la proteína HMSP5 y para las muestras negativas no se observa coloración alguna. Una vez obtenidos los resultados las tiras pueden ser archivadas para el registro permanente de los mismos.

5.3.2. Especificidad analítica del ensayo inmunocromatográfico

Para determinar la especificidad analítica del ensayo se evaluó frente a suero de un animal positivo a *B. bovis* y uno positivo a *B. bigemina*.

5.3.3. Sensibilidad analítica del ensayo inmunocromatográfico

Para determinar la sensibilidad analítica del ensayo se utilizó suero de un animal positivo, obtenido según lo descrito en el acápite 2.15, Capítulo 2, al que se le realizaron diluciones seriadas en PBS hasta 1: 5 000. El mismo se tituló por un ELISA experimental (Informe Anual 2003, proyecto INCO 30026), mostrando títulos de anticuerpos de hasta 1: 2000.

5.3.1.4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos por PCR y por el ensayo inmunocromatográfico para las muestras de los animales en explotación se procesaron mediante la prueba Chi cuadrado de independencia- contingencia 2 X 2 (Moore, 1998).

5.4. Resultados y Discusión

El PCR desarrollado resultó específico para *A. marginale*, como se evidencia en la Figura 25, por la no amplificación a partir del ADN de otros hemoparásitos que pueden estar presentes en el bovino, de ADN de un animal negativo y del ADN bovino. La amplificación del gen fue posible en todos los aislamientos de *A. marginale* probados, apareciendo una banda de aproximadamente igual intensidad y de una talla similar en todos los casos (Fig. 26).

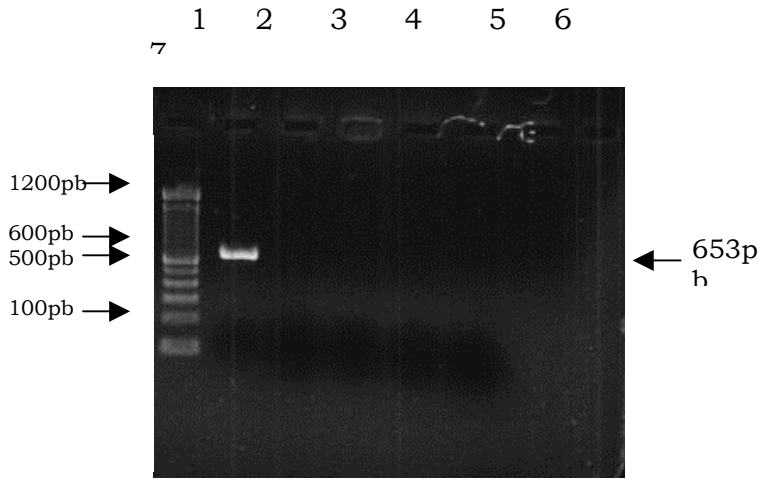


Figura 25: Determinación de la especificidad analítica del PCR. Línea 1: Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega), 2: ADN del aislamiento Habana de *Anaplasma marginale*, 3: ADN de *Babesia bovis*, 4: ADN de *Babesia bigemina*, 5: ADN de *Tripanosoma* spp, 6: ADN bovino, 7: Control de agua.

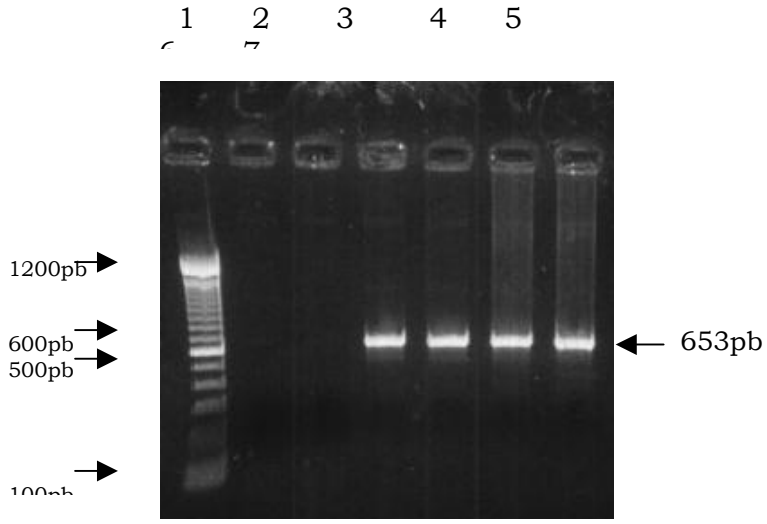


Figura 26: Determinación de la especificidad del PCR, a partir de ADN de aislamientos de *A. marginale* de diferentes regiones geográficas. Línea 1: Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega), 2: ADN bovino, 3: Control de agua, 4: ADN del aislamiento Habana, 5: ADN del aislamiento Valle del Perú, 6: ADN del aislamiento Oriente 1, 7: ADN del aislamiento Florida.

Se determinó la sensibilidad del PCR utilizando diluciones de ADN de *A. marginale,* pudiendo detectar hasta 0.01 ng/µL de ADN genómico de este hemoparásito (Fig. 27), lo que equivale aproximadamente a 1000 eritrocitos parasitados por mL de sangre y un 0.000025 % de parasitemia. Realizamos nuestros cálculos a partir de lo planteado por Eriks y col., (1989), que teniendo en cuenta que el genoma de un simple organismo de esta rickettsia es de aproximadamente 1 200- 1 250 kb (Kringsbury, 1969, Alleman y col, 1993), determinaron que 0.01 ng de ADN es equivalente a aproximadamente 6000 organismos. Se sabe que cada eritrocito parasitado contiene un promedio de 6- 12 organismos de *A. marginale* (Goff y col., 1988), entonces esto es equivalente a 1 000 eritrocitos parasitados por mL de sangre bovina.

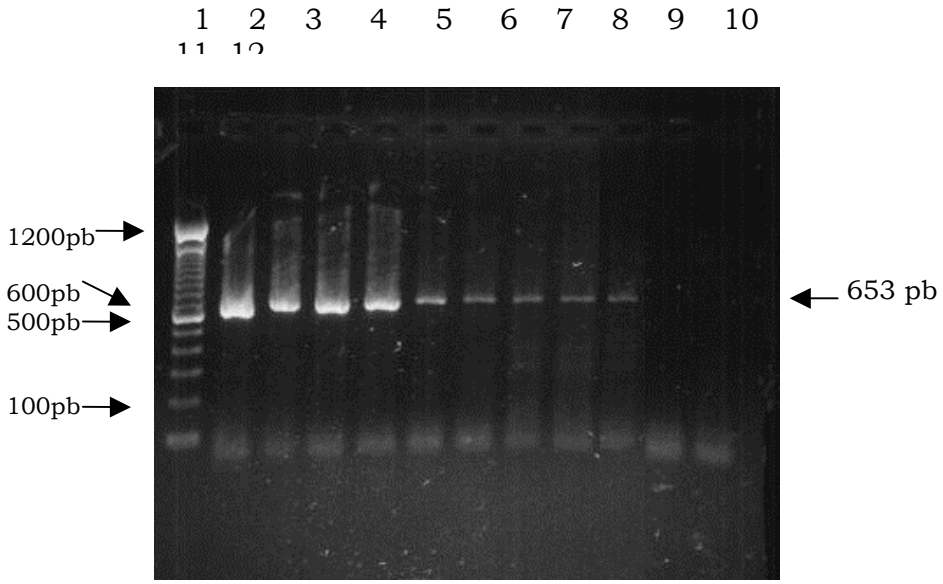


Figura 27: Determinación de la sensibilidad del PCR. Línea 1: Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega), 2: 100 ng/μL, 3: 10 ng/μL, 4: 1 ng/μL, 5: 0.1 ng/μL, 6: 0.05 ng/μL, 7: 0.03 ng/μL, 8: 0.025 ng/μL, 9: 0.020 ng/μL, 10: 0.010 ng/μL, 11: 0.002 ng/μL, 12: Control de agua.

Con relación al frotis sanguíneo, nuestro ensayo resulta altamente sensible, si tenemos en cuenta que la tinción de los frotis de sangre con Giemsa sólo permite detectar niveles de parasitemia del orden del 0.1- 2 %, y parasitemias menores son difíciles de diagnosticar (Melman y col., 2004).

La amplificación del ADN del parásito tiene ventajas sobre otros métodos para la detección en animales persistentemente infectados con *A. marginale,* porque el parásito es difícil de detectar por los métodos de diagnóstico convencional (Melman y col., 2004) cuando el animal tiene bajos niveles de parasitemia. Herrero y col., (1998), realizaron un estudio por PCR para la detección de *A. marginale* en Costa Rica, planteando que el PCR puede detectar bajos niveles de parasitemia en los animales persistentemente infectados, que no pueden ser detectados por los métodos convencionales.

Figueroa y col., (1993b), realizaron un PCR múltiple donde analizan los productos por hibridación con una sonda no radioactiva y encontraron que la sensibilidad fue de 0.00001 % para *B. bovis* y *B. bigemina* y 0.0001 % para *A. marginale*. Este sistema se utilizó posteriormente para estudios epidemiológicos en México y reportó en 420 muestras evaluadas una prevalencia de 59.6 % para *A. marginale* (Figueroa y col., 1993b).

Torioni y col., (1998), pudieron detectar con un PCR simple, amplificando una región de 458 pb del gen msp5, aproximadamente 0.0001 % de parasitemia. La sensibilidad de esta técnica para la detección de *A. marginale* resultó más baja que la del sistema propuesto.

Otros autores han utilizado el PCR para determinar la presencia de *A. marginale* en la hemolinfa (Stich y col, 1993a) y en la saliva (Stich y col, 1993b) de *D. andersoni,* demostrando así, tanto el papel del vector como la vía de transmisión, al hallar el parásito primero en la hemolinfa y luego en la saliva de la garrapata.

A pesar de que no se evaluó la posibilidad del PCR, de detectar infecciones tempranas, podemos inferir que esto sea posible, ya que con la utilización de un sistema de hibridación de ácidos nucleicos, que mostró la misma sensibilidad que el sistema propuesto, se pudo realizar la detección temprana de infección con *A. marginale*, identificando la rickettsemia dos días después de la inoculación (Eriks y col., 1989), por lo que animales con una infección recientemente adquirida pudieran ser identificados como positivos mediante este ensayo.

La utilización del PCR en el diagnóstico de *A. marginale* permite avances significativos no solo en el diagnóstico de la parasitosis, permitiendo diseñar métodos de diagnóstico altamente eficientes (Melman y col., 2004), sino también en estudios epidemiológicos (Figueroa y col., 1993b, 1998) y en investigaciones de transmisión de especies de *Anaplasma* por rumiantes salvajes, como posibles reservorios de la anaplasmosis (Lew y col., 2002). Además, el PCR puede ser recomendado para determinar la presencia de la rickettsia para las importaciones de animales valiosos procedentes de

áreas libres de la enfermedad, en animales de exposiciones y ferias cuando se requiera el traslado de los mismos, sementales y animales donadores de embriones, puede ayudar a monitoreos de programas de lucha integrada de garrapatas y enfermedades asociadas.

Al evaluar las muestras provenientes de los animales experimentalmente infectados todas resultaron positivas por PCR, amplificando una banda de 653 pb, lo que denota la presencia de *A. marginale* en estos (Fig. 28).

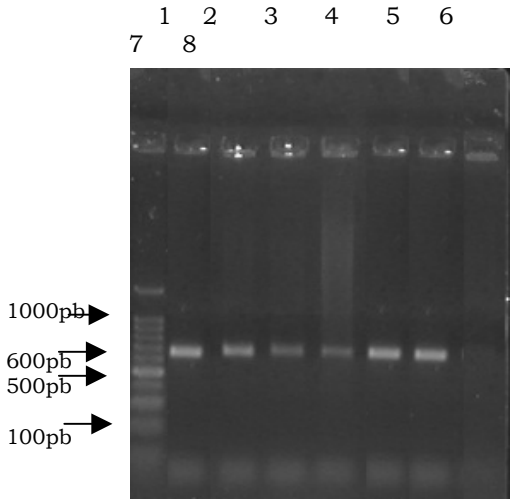


Figura 28: Amplificación del gen msp5 de *Anaplasma marginale* de muestras de animales experimentalmente infectados con la cepa Habana. Línea 1: Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega) 2: ADN del aislamiento Habana de *Anaplasma marginale* , 3-7: Amplificación a partir del ADN de *Anaplasma marginale* purificado de los animales 195, 163, 266, 252, 807; 8: Animal negativo.

De un total de 113 animales estudiados, 22 resultaron positivos por tinción con Giemsa a los frotis de sangre, para un 19.46 % (Tabla 13) y un total de 96 (84.95 %), resultaron positivos por PCR (Tabla 14) (Figs. 29, 30 y 31). Estos animales sin síntomas clínicos de la enfermedad, donde fue posible detectar el microorganismo, son animales que se encuentran persistentemente infectados. En estos, las bandas amplificadas en el PCR fueron de diferente intensidad entre animales de un mismo grupo lo que

puede estar relacionado con los niveles de parasitemia presentes y la habilidad para transmitir la enfermedad, lo que tiene un importante significado epidemiológico según han señalado Eriks y col., (1989), Stich y col., (1993b).

Los animales que resultaron positivos por frotis se encontraban, al parecer, en un pico de la rickettsemia, que hace que los niveles del parásito aumenten y puedan ser visualizados al microscopio, teniendo en cuenta la baja sensibilidad de la técnica (Melman y col., 2004).

Tabla 13: Resultados del diagnóstico de *A. marginale* por tinción con Giemsa a los frotis de sangre de muestras de animales en explotación.

Vaquería	*Positivos*	*Negativos*	*% de positivos*
Grupo 1	*3*	*22*	*12.00*
Grupo 2	*13*	*33*	*28.20*
Grupo 3	*6*	*36*	*14.20*
Total	**22**	**91**	**19.46**

Tabla 14: Resultados del diagnóstico de *A. marginale* por amplificación del gen msp5 mediante PCR a las muestras de animales en explotación.

Vaquería	*Positivos*	*Negativos*	*% de positivos*
Grupo 1	*21*	*4*	*84.00*
Grupo 2	*38*	*8*	*82.60*

Grupo 3	*37*	*5*	*88.09*
Total	**96**	**17**	**84.95**

El estado de portador de anaplasmosis, es un fenómeno que no está suficientemente entendido. Es posible que bajo determinados niveles de parasitemia animales individuales no sean capaces de trasmitir la anaplasmosis, sin embargo, existen factores externos e internos que pueden ser capaces de alterar los niveles de parasitemia de un individuo. Por ejemplo, la inmunosupresión de los animales infectados, el estrés ambiental o nutricional (Corrier y col., 1981) y la infección con otras enfermedades puede provocar una recrudescencia de la anaplasmosis subclínica. Estos factores pueden contribuir con las fluctuaciones en los diferentes niveles de parasitemia de los animales dentro de un mismo grupo. Eriks y col., (1989), determinaron que el número de eritrocitos infectados presente en los animales persistentemente infectados estudiados variaba, con niveles de parasitemia entre 0.0025 % y 0.000025 % y que dentro de un mismo animal estos valores fluctuaban en el tiempo. Con el sistema utilizado en el presente estudio, se puede detectar hasta 0.000025 % de parasitemia, en animales sin síntomas clínicos de la enfermedad, sin embargo, se puede aumentar la sensibilidad del sistema, con la utilización de PCR dobles, de manera que pueda detectar los animales portadores con más bajos niveles de parasitemia, pues según Torioni y Echaide, (2003) en los bovinos que se recuperan de la fase aguda de la enfermedad y que permanecen persistentemente infectados, se producen ciclos continuos de rickettsemia con intervalos aproximados de 5 semanas, con valores entre 0.1 % y 0.0000001 % ó menores, de eritrocitos parasitados. Estos ciclos están asociados a variaciones antigénicas que ocurren en las moléculas de la superficie de *A. marginale*, que caracterizan a nuevas poblaciones del parásito resistentes a la respuesta inmune generada por la anterior, como un mecanismo para evadir el sistema inmune (Torioni y Echaide, 2003).

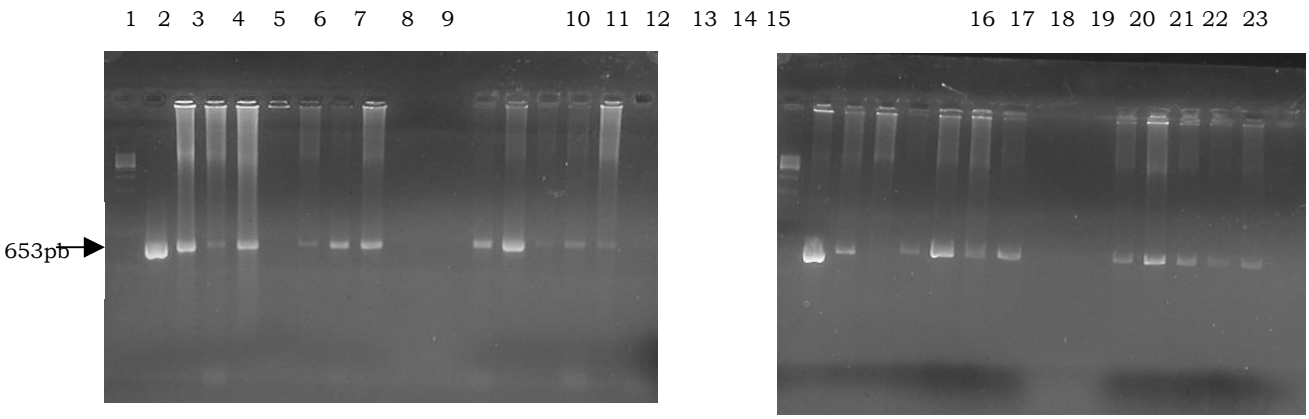


Figura 29: Detección por PCR de *Anaplasma marginale* en muestras procedentes del Grupo 1. Línea 1y 16: Marcador de peso molecular de 1 kb (Promega), 2 y 17: ADN de *A. marginale* del aislamiento Habana, 3-14, 18-28: Muestras de animales de campo, 15 y 29: Control de agua.

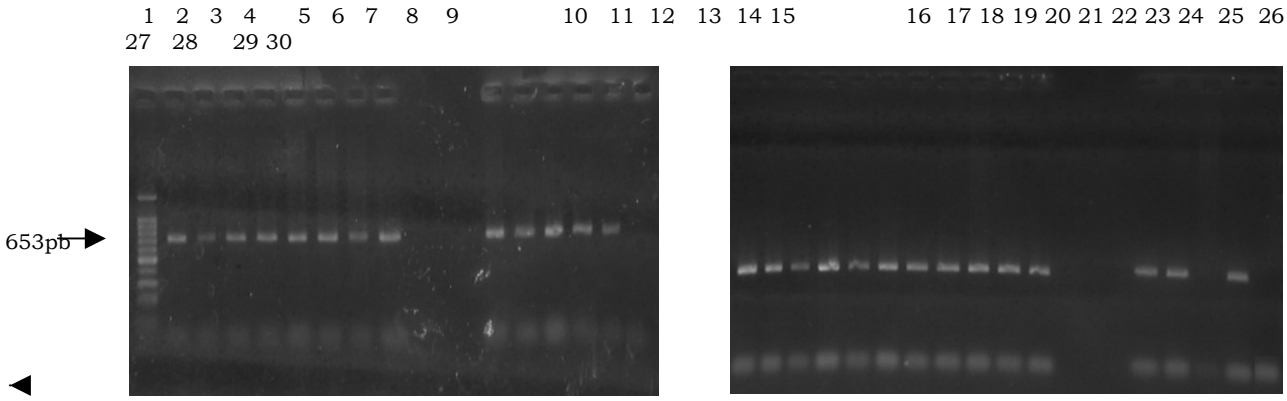


Figura 30: Detección por PCR de *Anaplasma marginale* en muestras procedentes del Grupo 2. Línea 1: Marcador de peso molecular de 1 kb (Promega), 2 y 16: ADN de *Anaplasma marginale* del aislamiento Habana, 3-14, 17-29: Muestras de animales de campo, 15 y 30: Control de agua.

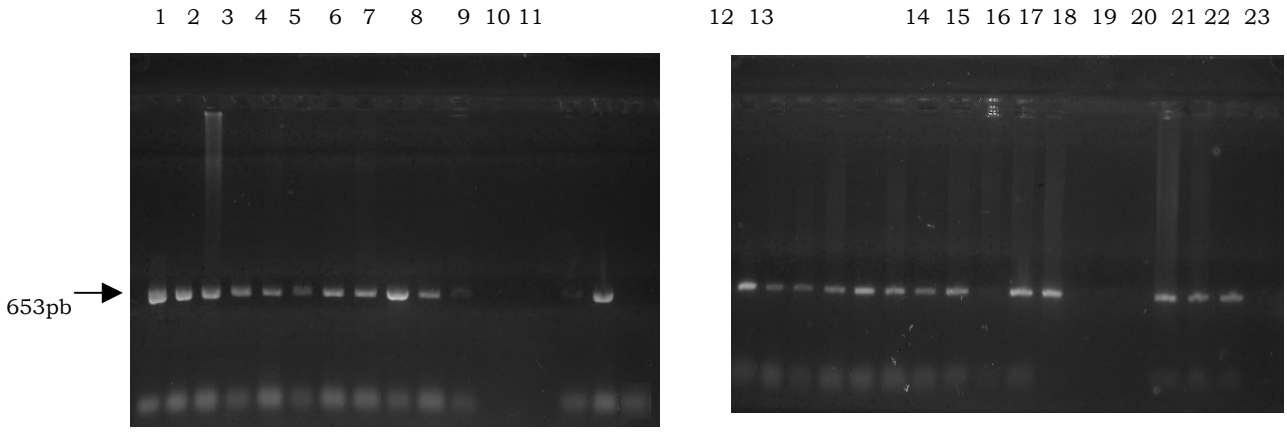


Figura 31: Detección por PCR de *Anaplasma marginale* en muestras procedentes del Grupo 3. Línea 1 y 14: ADN de *Anaplasma marginale* del aislamiento Habana, 2-12, 15-27: Muestras de animales de campo, 13 y 28: Control de agua.

La presencia de un número elevado de animales positivos a *A. marginale,* y sin síntomas clínicos de la enfermedad, en estas unidades de la provincia La Habana puede estar dado por los métodos de control de ixodidos utilizados, que combinan la utilización de la vacuna *Gavac*, con baños garrapaticidas programados, según las características de las unidades, los cuales garantizan que los animales posean un nivel moderado de garrapatas, suficiente para asegurar la infección temprana de los terneros, los que poseen una resistencia innata, aún en ausencia de anticuerpos calostrales hasta cerca de los nueve meses de edad. Durante esta edad los animales adquieren la infección sin presentar signos aparentes de enfermedad y la inmunidad resultante, una vez establecida, es mantenida en el ganado adulto de por vida, mediante re-infecciones, las que son inaparentes clínicamente, por lo que se asume que un animal que se recobra de la enfermedad se convierte en portador (Wagner, 1981, Benavides, 1985, Cetra y col., 2000).

En términos experimentales, el estado de portador significa que los eritrocitos infectados con *A. marginale* continúan circulando, a niveles no detectables, por largos períodos de tiempo, quizás durante toda la vida del

animal, siendo relativamente inmunes a infecciones futuras. Este estado se caracteriza por una actividad de anticuerpos generalmente constante, y la detección no frecuente de eritrocitos infectados en el microscopio (Wagner, 1981).

Hasta el presente se han diseñado numerosas pruebas serológicas para el diagnóstico de *Anaplasma marginale*, sin embargo, la mayoría no resultan útiles en la fase inicial de la infección, debido a la aparición de parásitos antes de que los anticuerpos hayan alcanzado niveles detectables (Melman y col., 2004). Por otra parte, en casos de infecciones múltiples se presentan reacciones cruzadas que podrían conducir a falsos positivos (Bretana y col., 2002). La sensibilidad y especificidad de estos ensayos serológicos dependen en una gran medida de una buena preparación del antígeno que será utilizado, de ahí que antígenos recombinantes purificados, sean fuertes candidatos para el diagnóstico serológico (Melman y col., 2004).

Los medios de diagnóstico de rutina utilizados para la detección de *A. marginale* usan como antígeno una mezcla cruda del parásito con eritrocitos de membrana, por lo que dan altos porcientos de falsos positivos y negativos en la infección aguda y falsos negativos en los animales portadores, persistentemente infectados (Amerault y col., 1981). Para la puesta a punto de un medio de diagnóstico se hace necesario seleccionar un antígeno específico para *A. marginale*, altamente antigénico en todos los estados de la infección y que a la vez esté presente en todos los aislados estudiados del parásito (Palmer y col., 1986).

Según lo planteado por Palmer y col., (1986) la proteína MSP5 de 19 kDa, de *A. marginale*, fue reconocida fuertemente por suero de animales con infecciones peristentes de diferentes aislamientos del parásito y por sueros de animales en los estados tempranos de la infección. Reyna-Bello y col., (1997), confirmaron la importancia de la proteína MSP5 como un antígeno útil para el diagnóstico serológico de la anaplasmosis bovina. Knowles y col., (1996), plantearon que en animales inoculados por vía intravenosa con *A. marginale*, se detectan anticuerpos anti-MSP5 en la infección temprana,

correlacionándose el tiempo en que estos anticuerpos aparecen con la dosis de infección y que permanecen detectables durante 72 meses, sin reexposición, lo que apoya planteamientos anteriores (Eriks y col., 1993), de que *A. marginale* causa una infección por largo tiempo de vida, a consecuencia de la cual es la existencia de un reservorio persistente para la transmisión a animales susceptible, siendo muy importante y necesaria la comparación de los resultados obtenidos en cuanto a la detección de anticuerpos, con los obtenidos por la detección directa de la rickettsemia en animales infectados.

Los planteamientos anteriores, acerca de la proteína MSP5, unido a las ventajas de los sistemas inmunocromatográficos de flujo lateral, de tipo tira reactiva, hacen de éste, un ensayo de elección para la detección de anticuerpos en animales de campo.

Cuando se estudio la especificidad y sensibilidad analíticas del prototipo diseñado se pudo observar que no mostró reacción alguna frente a un suero positivo a *B. bovis* y un suero positivo a *B. bigemina* (Fig. 32). El hecho de no encontrar reacciones cruzadas con estos hemoparásitos se explica por la utilización del antígeno recombinante purificado utilizado en el ensayo. Madruga y col., (2000) al utilizar un antígeno crudo de *A. marginale* en un sistema ELISA describen reacciones cruzadas con sueros positivos a estos microorganismos, de ahí el valor que se le confiere a los antígenos recombinantes obtenidos con alto grado de pureza.

Con el uso del ensayo propuesto fue posible detectar títulos de hasta 1: 500. (Fig. 33). Se conoce que a pesar de que los ensayos ELISA muestran una mayor sensibilidad, estos no son sistemas de fácil y rápida manipulación, por lo que en la actualidad existe una tendencia al desarrollo de inmunoensayos cromatográficos, ya que son pruebas rápidas, en las que se puede tener el resultado en menos de 10 minutos y analizar muchas muestras simultáneamente, requieren además, un adiestramiento mínimo del personal y el equipamiento necesario es

1 2 3

mínimo y sencillo, requiriendo poco espacio y pudiendo realizarse sin electricidad (OMS, 1997).



Figura 32: Especificidad del ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral. Línea 1: Suero positivo a *A. marginale*, 2: Suero positivo a *B. bovis*, 3: Suero positivo a *B. bigemina*.

Figura 33: Sensibilidad del ensayo inmunogromatográfico.

Para demostrar la funcionalidad del prototipo diseñado, se evaluaron sueros provenientes de animales experimentalmente infectados, en los que fue posible detectar la presencia de anticuerpos específicos contra *A. marginale* y comprobar que no hubo reacción con el suero de animales negativos (Fig. 34).

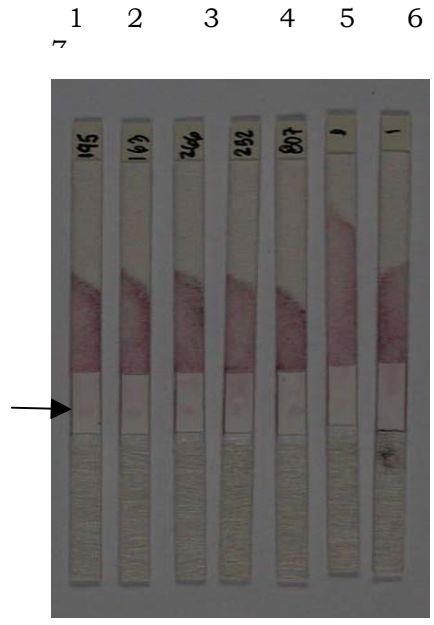


Figura 34: Resultados del ensayo inmunocromatográfico a partir de suero de los animales experimentalmente infectados. Línea 1-5: Animales 195, 163, 266, 252, 807; 6-7: Animales negativos.

En un estudio extendido del ensayo a animales de las tres unidades muestreadas de la provincia La Habana, se detectaron anticuerpos contra la proteína HMSP5, en 102 de estos animales, para un 90.26 %, (Tabla 15) (Figs. 35, 36 y 37).

Tabla 15: Resultados de la detección de anticuerpos contra *A. marginale* en muestras de animales de campo mediante un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral, de tipo tira reactiva, utilizando como antígeno la proteína HMSP5 recombinante.

Vaquería	*Positivos*	*Negativos*	*% de positivos*
CENSA	*21*	*4*	*84*
Valle del Perú	*40*	*6*	*86.95*
Los Naranjos	*41*	*1*	*97.6*
Total	**102**	**11**	**90.26**

C+ C- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25

utilizando

po 1. Línea 1-

25:

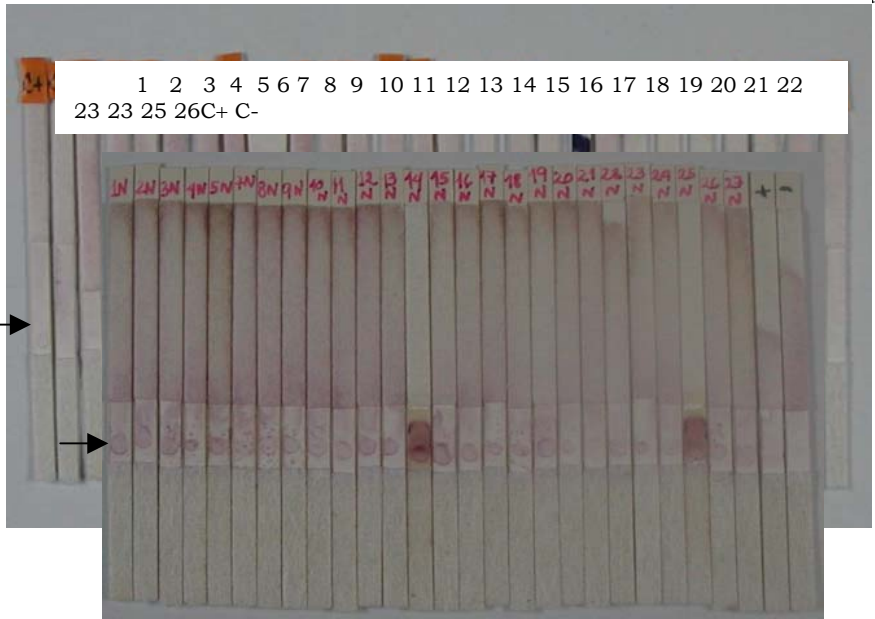


Figura 36: Resultados del ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral, de tipo tira reactiva, utilizando como antígeno la proteína HMSP5 recombinante, con animales del grupo 2. Línea 1-26: Muestras de animales del grupo 2.

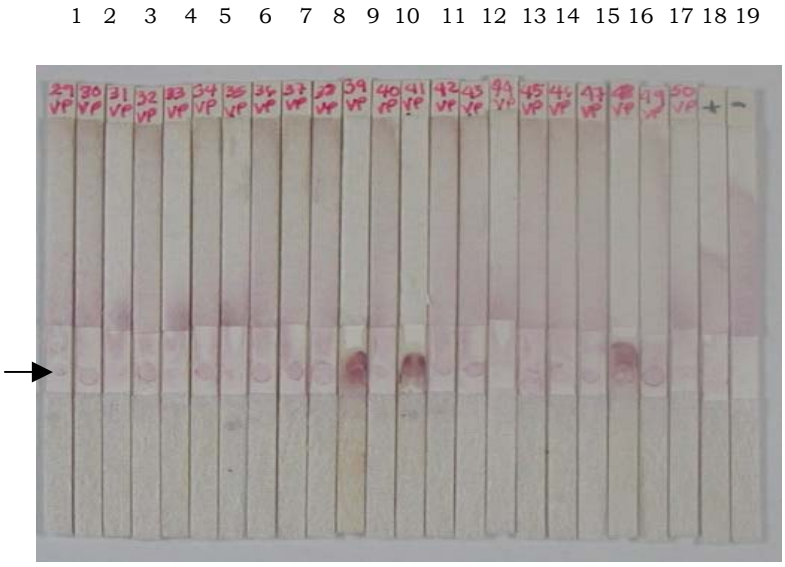


Figura. 37: Resultados del ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral, de tipo tira reactiva, utilizando como antígeno la proteína HMSP5 recombinante, con animales del grupo 3. Línea 1-22: Muestras de animales del grupo 3.

Tabla 16: Comparación entre el ensayo de PCR y el ensayo inmunocromatográfico.

		Ensayo inmunocromatográfico		*Total*
		Negativos	*Positivos*	
PCR	*Negativos*	3	14	17
	Positivos	7	89	96
Total		10	103	113
Porcentaje de coincidencia		81.41		

X^2 = 1.92 p=0.1659

Como se puede observar en la Tabla 15, en las tres unidades estudiadas el porcentaje de animales positivos a la presencia de anticuerpos es de un 90.26%. Al analizar los resultados obtenidos por las dos técnicas encontramos un 81.41 % de coincidencia entre ambas (Tabla 16).

De un total de 17 animales negativos por PCR, 14 fueron positivos a la presencia de anticuerpos, esto se puede explicar si tenemos en cuenta lo planteado por Torioni y Echaide, (2003), quienes señalan que en ocasiones los niveles de parasitemia presentes en los animales portadores son tan bajos como 0.0000001 % o menor, los que sólo pueden ser detectados con un PCR doble, sin embargo, se ha reportado que los anticuerpos contra la MSP5 pueden perisistir por largos perídodos de tiempo en los animales persistentemente infectados (Knowles y col., 1996). A su vez los animales que resultaron positivos por PCR, pero que no fueron seropositivos pudieran ser animales con reciente infección, en los que aún no aparecen niveles de anticuerpos detectables (Nakamura y col., 1989), o pudiera deberse a la presencia de niveles de anticuerpos inferiores a los detectados por el ensayo.

La presencia del microorganismo en animales en explotación, sin síntomas clínicos de la enfermedad y seropositivos, se pudiera relacionar con que un segmento de la población bovina se encuentra persistentemente infectado por la rickettsia, aspecto este que reviste una gran importancia a considerar en estudios epidemiológicos futuros, ya que aunque no se reportan en estos momentos índices importantes de mortalidad por anaplasmosis bovina, estos animales juegan un importante papel en la transmisión de la misma.

Estudios como estos han sido realizados por Cipolini y col., (2003a), que encontraron presencia de anticuerpos en el 100 % de los animales testados mediante aglutinación en tarjeta, señalando la utilidad del estudio serológico para la caracterización epizootiológica de la enfermedad. Yoshihara y col., (2003) también señalan la respuesta serológica positiva en la mayoría de los animales estudiados en el estado de Paraná en Brasil, señalando que el incremento de niveles de anticuerpos séricos en terneros expuestos a *Boophilus microplus*, la detección del parásito en sangre y la aparición de síntomas clínicos, coinciden con el incremento en la población de garrapatas. Por otra parte, Cipolini y col., (2003b) que encontraron una cobertura inmunológica de un 100 % para la anaplasmosis bovina, determinando que el rodeo estudiado se encontraba en estabilidad enzoótica, proponiendo el diagnóstico serológico como herramienta para determinar el estado de inestabilidad enzoótica y prevenir la aparición de brotes.

Los inmunoensayos cromatográficos de flujo lateral no se han descrito hasta el momento en la literatura especializad,a para la detección de anticuerpos contra *A. marginale*, por lo que estos resultados constituyen la primera demostración de la factibilidad de uso de este sistema para este propósito. Una vez determinados sus parámetros de desempeño y realizada su validación, pudiera ser incorporado al monitoreo de programas de control de enfermedades asociadas a la transmisión por garrapatas, teniendo en cuenta que, según su principio inmunológico, ofrecen los resultados en minutos, permitiendo una lectura fácil y confiable, sin requerir preparación de la muestra, combinando la especificidad y sensibilidad de una prueba inmunológica con la rapidez y sencillez de una tira reactiva, lo que permite

conocer el impacto de los programas de control de enfermedades hemoparasitarias. A su vez, dadas sus ventajas puede constituir una herramienta valiosa en estudios epidemiológicos de la enfermedad.

Una vez culminada la validación de los ensayo de PCR e inmunocromatográfico a partir del uso del gen msp5 y su producto de expresión, permitirá contar con técnicas de avanzada para la detección de *A .marginale* y anticuerpos contra este agente, funcionales en animales sin síntomas clínicos de la enfermedad, lo que constituye una poderosa herramienta para la importación y exportación de ganado. Así, Palmer y McElwain, (1995), proponen el gen msp5 y la proteína para ser utilizados en el desarrollo de técnicas de detección, en el movimiento internacional de ganado.

5.5. Conclusiones parciales

1. El ensayo de PCR desarrollado fue específico para *A. marginale,* detectando hasta 0.000025% de parasitemia.
3. El ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral, que utiliza la proteína HMSP5 fue específico para *A. marginale*, detectando títulos de anticuerpos de hasta 1: 500 en el suero de un animal experimentalmente infectado.
4. El ensayo de PCR y el ensayo inmunocromatográfico fueron factibles de usar en la detección de *A. marginale* y anticuerpos contra este en animales en explotación sin síntomas clínicos de la enfermedad.

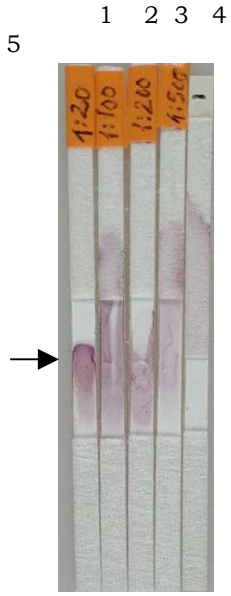
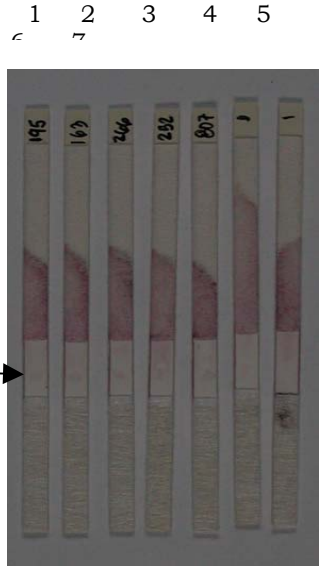


Figura 33: Sensibilidad del ensayo inmunogromatográfico. Línea 1-4: Diferentes diluciones de un suero positivo a *Anaplasma marginale*. 1: Dilución 1:20, 2: dilución 1: 100, 3: dilución 1: 200, 4: dilución 1: 500, 5: suero negativo.

Para demostrar la funcionalidad del prototipo diseñado, se evaluaron sueros provenientes de animales experimentalmente infectados, en los que fue posible detectar la presencia de anticuerpos específicos contra *A. marginale* y comprobar que no hubo reacción con el



suero de animales negativos (Fig. 34).

Figura 34: Resultados del ensayo inmunocromatográfico a partir de suero de los animales experimentalmente infectados. Línea 1-5: Animales 195, 163, 266, 252, 807; 6-7: Animales negativos.

En un estudio extendido del ensayo a animales de las tres unidades muestreadas de la provincia La Habana, se detectaron anticuerpos contra la proteína HMSP5, en 102 de estos animales, para un 90.26 %, (Tabla 16) (Figs. 35, 36 y 37).

Tabla 16: Resultados de la detección de anticuerpos contra *A. marginale* en muestras de animales en explotación, mediante un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral, de tipo tira reactiva, utilizando como antígeno la proteína HMSP5 recombinante.

Vaquería	*Positivos*	*Negativos*	*% de positivos*
CENSA	*21*	*4*	*84*
Valle del Perú	*40*	*6*	*86.95*
Los Naranjos	*41*	*1*	*97.6*
Total	**102**	**11**	**90.26**

C+ C- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25



Fig. 35: Resultados del ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral, utilizando como antígeno la proteína HMSP5 recombinante, con animales del grupo 1. Línea 1-25: Muestras de animales del grupo 1.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 23 25 26C+ C-

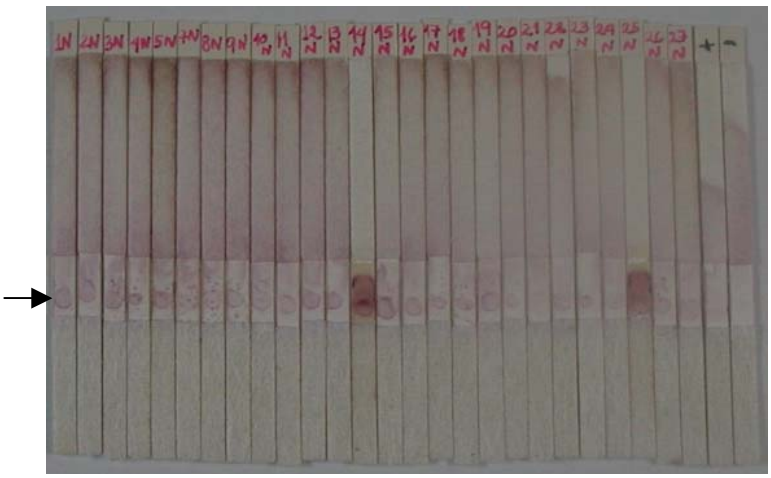


Figura 36: Resultados del ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral, de tipo tira reactiva, utilizando como antígeno la proteína HMSP5 recombinante, con animales del grupo 2. Línea 1-26: Muestras de animales del grupo 2.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

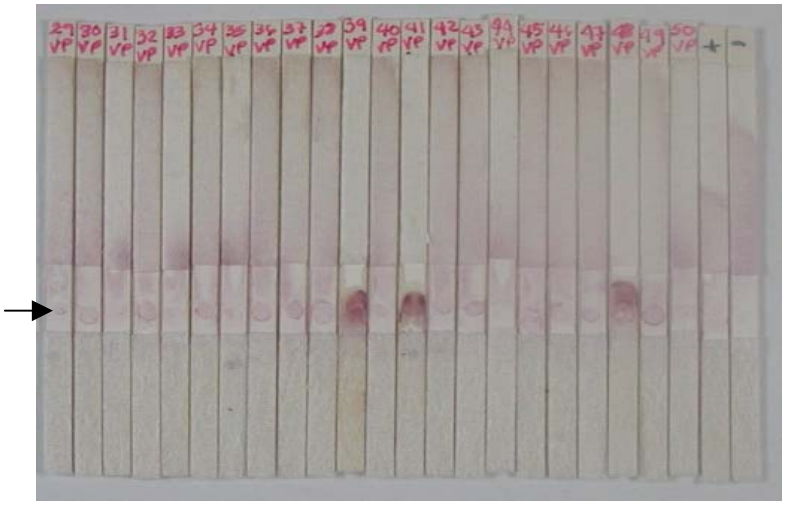


Figura. 37: Resultados del ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral, de tipo tira reactiva, utilizando como antígeno la proteína HMSP5 recombinante, con animales del grupo 3. Línea 1-22: Muestras de animales del grupo 3.

Tabla 17: Comparación entre el ensayo de PCR y el ensayo inmunocromatográfico.

		Ensayo inmunocromatográfico		*Total*
		Negativos	*Positivos*	
PCR	*Negativos*	3	14	17
	Positivos	7	89	96
Total		10	103	113
Porcentaje de coincidencia		81.41		

X^2 = 1.92 p=0.1659

Como se puede observar en la Tabla 16, en las tres unidades estudiadas el porcentaje de animales positivos a la presencia de anticuerpos es de un 90.26 %. Al analizar los resultados obtenidos por las dos técnicas encontramos un 81.41 % de coincidencia entre ambas (Tabla 17), según el análisis estadístico realizado.

De un total de 17 animales negativos por PCR, 14 fueron positivos a la presencia de anticuerpos, esto se puede explicar si tenemos en cuenta lo planteado por Torioni y Echaide, (2003), quienes señalan que en ocasiones los niveles de parasitemia presentes en los animales portadores son tan bajos como 0.0000001 % o menos, de eritrocitos infectados, los que sólo pueden ser detectados con un PCR doble, sin embargo, se ha reportado que los anticuerpos contra la MSP5 pueden perisistir por largos perídodos de tiempo en los animales persistentemente infectados (Knowles y col., 1996). A su vez los animales que resultaron positivos por PCR, pero que no fueron seropositivos pudieran ser animales con reciente infección, en los que aún no aparecen niveles de anticuerpos detectables (Nakamura y col., 1989), o pudiera deberse a la presencia de niveles de anticuerpos inferiores a los detectados por el ensayo.

La presencia del microorganismo en animales en explotación, sin síntomas clínicos de la enfermedad y seropositivos, se pudiera relacionar con que un segmento de la población bovina se encuentra persistentemente infectado por la rickettsia, aspecto este que reviste una gran importancia a considerar en estudios epidemiológicos futuros, ya que aunque no se reportan en estos momentos índices importantes de mortalidad por anaplasmosis bovina, estos animales puede jugar un importante papel en la transmisión de la misma.

Estudios como estos han sido realizados por Cipolini y col., (2003a), que encontraron presencia de anticuerpos en el 100 % de los animales testados mediante aglutinación en tarjeta, señalando la utilidad del estudio serológico para la caracterización epizootiológica de la enfermedad. Yoshihara y col., (2003) también señalan la respuesta serológica positiva en la mayoría de los animales estudiados en el estado de Paraná en Brasil, señalando que el incremento de niveles de anticuerpos séricos en terneros expuestos a *B. microplus*, la detección del parásito en sangre y la aparición de síntomas clínicos, coinciden con el incremento en la población de garrapatas. Por otra parte, Cipolini y col., (2003b) que encontraron una cobertura inmunológica de un 100 % para la anaplasmosis bovina, determinando que el rodeo estudiado se encontraba en estabilidad enzoótica, proponiendo el diagnóstico serológico como herramienta para determinar el estado de inestabilidad enzoótica y prevenir la aparición de brotes.

Los inmunoensayos cromatográficos de flujo lateral no se han descrito hasta el momento en la literatura especializada para la detección de anticuerpos contra *A. marginale*, por lo que estos resultados constituyen la primera demostración de la factibilidad de uso de este sistema para este propósito. Una vez determinados sus parámetros de desempeño y realizada su validación, pudiera ser incorporado al monitoreo de programas de control de enfermedades asociadas a la transmisión por garrapatas, teniendo en cuenta que, según su principio inmunológico, ofrecen los resultados en minutos, permitiendo una lectura fácil y confiable, sin requerir preparación de la muestra, combinando la especificidad y sensibilidad de una prueba

inmunológica con la rapidez y sencillez de una tira reactiva, lo que permite conocer el impacto de los programas de control de enfermedades hemoparasitarias. A su vez, dadas sus ventajas puede constituir una herramienta valiosa en estudios epidemiológicos de la enfermedad.

Una vez culminada la validación de los ensayo de PCR e inmunocromatográfico a partir del uso del gen msp5 y su producto de expresión, se contará con técnicas de avanzada para la detección de *A .marginale* y anticuerpos contra este agente, funcionales en animales sin síntomas clínicos de la enfermedad, lo que constituyen poderosas herramienta diagnósticas. El Manual de la OIE, 2004 recomienda el uso de cELISA con la proteína MSP5 recombinante para el estudio de animales asintomáticos y los ensayos de PCR simples o PCR *"nested"* para la detección de bajos niveles de parasitemia

5.5. Conclusiones parciales

2. El ensayo de PCR desarrollado fue específico para *A. marginale,* detectando hasta 0.000025% de parasitemia.
3. El ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral, que utiliza la proteína HMSP5 fue específico para *A. marginale,* detectando títulos de anticuerpos de hasta 1: 500 en el suero de un animal experimentalmente infectado.
4. El ensayo de PCR y el ensayo inmunocromatográfico son factibles de usar en la detección de *A. marginale* y anticuerpos contra éste, en animales sin síntomas clínicos de la enfermedad.

RESUMEN

Con el objetivo de disponer de técnicas de avanzada para la detección de *Anaplasma marginale* y anticuerpos contra este hemoparásito, se desarrollaron estudios encaminados a obtener un clon recombinante que exprese el gen msp5 del aislamiento Habana; establecer las condiciones de solubilización y purificación de la proteína recombinante HMSP5 y probar la factibilidad de uso del PCR, para la detección de *A. marginale*, mediante la amplificación del gen msp5, así como de un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral, que utilice la proteína recombinante HMSP5, para la detección de anticuerpos contra este hemoparásito en animales en explotación. A partir de estos estudios se obtuvo un clon recombinante que expresa la proteína HMSP5 con un 22 % de expresión, la cual se reconoció por el anticuerpo monoclonal ANAF16C1. El procedimiento de purificación establecido permitió obtener la proteína con un 95 % de pureza y un rendimiento de 41 mg de proteína por litro de cultivo. Con el uso del PCR diseñado en el presente trabajo se demostró la presencia de *A. marginale* en animales sin síntomas clínicos de la enfermedad. Por primera vez se describe la factibilidad de uso de la proteína HMSP5 como antígeno recombinante en un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral para la detección de anticuerpos contra *A. marginale*. En la presente tesis se abordan por primera vez en el país estudios moleculares de un aislamiento autóctono de *A. marginale,* quedando abiertas nuevas estrategias para la detección de la anaplasmosis bovina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- 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. (1998). *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.
- 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.
- 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; 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.

- Arnold, F. H. (1991). Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing. *Bio/Technology*. 9: 150-155.
- Avon. (1958). A Manual for Conducting the complement fixation test for Anaplasmosis. Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, Beltsville, MD 20705, USA.
- Avon. (1974). A microtitre technique for the complement fixation test for anaplasmosis. Veterinary Services, Animal and Plant Health Inspection Service, US Department of Agriculture, Beltsville, MD 20705, USA.
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 411-421.
- 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). Comparisons 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.
- Barbet, A. F.; Whitmire, W.; Kamper, S. M.; Simbi, B. H.; Ganta, G.R.; Moreland, A; Mwangi, D.; McGuire, T.C. y Mahan, S. M. (2001). A subset of *Cowdria ruminantium* genes important for immune recognition and protection. *Gene* 275: 287-298.
- Bautista-Garfias, C. R.; Angeles, L.; García-Ortiz, M. A.; García-Tapia, D. (2000). Variación de los linfocitos BoCD2+, BoCD4+, y BoCD8+ de sangre perif'érica, el índice BoCD4:BoCD8 y los anticuerpos IgG en bovinos infectados y retados con aislados de *Anaplasma marginale* de origen mexicano. *Rev Latinoam Microbiol*. 42 (3):101-109.
- Benavides, O., E. (1985). Consideraciones con relación a la Epizootiología de Anaplasmosis y Babesisois en los bovinos. *Revista ACOVEZ 9* (31): 4-11.

- Benavides, E.; Vizcaino, O.; Britto, C. M.; Romero, A. y Rubio, A. (2000). Attenuated trivalent vaccine against babesiosis and anaplasmosis in Colombia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916: 613-616.
- Berdichersky, Y.; lamed, R.; Frenkel, D.; Gphna, V.; Bayer, E. A.; Yaron, S.; Shoham, Y. y Benhar, I. (1999). Matrix-assisted folding of single-chain Fv cellulose binding domain fusion proteins. *Protein Expr. Purif.* 17: 249-259.
- Berthold, H.; Frorath, B.; Scanarini, M.; Abney, C. C.; Ernest, B. y Northeman, W. (1992). Plasmid pGEX-5T: an alternative system for expression and purification of recombinant proteins. *Biotechnol. Letters*, 14 (4): 245- 250.
- Bretana, A; Nanez, B.; Contreras-Bretana, M. y Giardina, S. (2002). Multiple infections in bovines from the tropics: observation of blood parasites by scanning and transmission electron microscope. *Vet. Parasitol.* 44 (3): 173- 178.
- 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.
- Blouin, 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.
- Boomorshine, W. P.; Stephen Raj, M. L.; Venkat Gapalan y Foster, M. P. (2003). Preparation of uniformly labeled NMR samples in *E. Coli* under the light control of the araBAD promoter expression of an archaeal homolog of the RNase P Rpp 29 protein. *Academic press, Science Direct Protein Expression and Purification.* 28: 246-251.
- Boué, O. (2002). Procesos de purificación de proteínas recombinantes para uso veterinario. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias.

- 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.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Biochemistry*. 72: 248- 254.
- Brayton, K. A., G. H. Palmer, A. Lundgren, J. Yi, and A. F. Barbet (2002). Antigenic variation of *Anaplasma marginale* msp2 occurs by combinatorial gene conversion. *Molecular Microbiology* 43:1151-1159.
- Braz Junior, C. J.; Ribeiro, M. F.; Lima, J. D. Y Passos, L. M. (2002). Development of an ELISA system for detection of anti-*Anaplasma marginale* antibodies in cattle in Brazil. *J. Vet. Med.*B. Infect. Dis Vet. Public Health. 47: 241-248.
- 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.
- Cetra, B.; Ramírez, L. M. y Vangini, V. (2000). INTA, Noticias y Comentarios, No. 339.
- 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.
- Cinquin, O.; Christopherson, R. I. Y Menz, R. I. (2001). A hybrid plasmid for expression of toxic malarial proteins in *Escherichia coli*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 117: 245-247.

- Cipolini, M. F,; Jacobo, R. A. ; Draghi, M. G. y Torioni, E. S. (2003a). Detección de anticuerpos contra anaplasmosis bovina en rodeos de cría del noroeste de la provincia de Corrientes, Argentina. Rev. Vet. 14 (2): 75- 77.

- Cipolini, M. F,; Jacobo, R. A. ; Draghi, M. G.; Resoagli, J. P.; Storani, C. A.; Dansey, B. ; Martínez, D. y Infulesky, R. (2003b). Resultados preliminares del seguimiento sexológico del complejo Tristeza bovina, como medida de prevención de brotes. (http://www1.unne.edu.ar/cyt/2003/comunicaciones/04-veterinarios/V-019.pdf).

- Corona, B.; Albina, E.; Minet, C. y Martínez, S. (2002). Sequence of MSP1α gene of *A. marginale* Havana isolate. *Rev. Salud Animal* (En prensa).

- Corrier, D. E.; Wagner, G. G. y Adams, L. G. (1981). Recrudescence of *Anaplasma marginale*- induced immunosuppression with cyclophosphamide. *Am. J. Vet. Res*. 42: 19-21.

- 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.

- 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.

- Dalgliesh, R. J. (1979). Consideraciones actuales sobre las babesiosis y anaplasmosis del Ganado bovino. Publicado en *Veterinaria*, No. 13, 1984.

- Datar, R. V.; Cartwright, T. y Rosín, C. G. (1993). Process economics of animal cell and bacterial fermentation: a case study analysis of tissue plasminogen activator. *Bio/Technology*. 11: 349.357.

- Davis, R. W.; Botstein, D. y Roth, J. R. (1980). Advanced bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

- de la Fuente J.; García-García, J. C.; Blouin, E. F.; Rodríguez, S. D.; García, M. A. y Kocan, K. M. (2001). Evolution and funtion of tandem repeats in the major surface protein 1a of the ehrlichial pathogen *Ana plasma marginale*. *Anim. Health Res. Rev*. 2: 163-173.
- de la Fuente J.; García-García, J. C.; Blouin, E. F.; Saliki, J. T. Y Kocan, K. M. (2002a). Infection of tick cells and bovine erythrocytes with one genotype of the intracellular ehrlichia *Anaplasma marginale* excludes infection with other genotypes. *Cli. Diagn. Lab. Immunol*. 9: 658-668.
- de la Fuente, J.; Van Den Bussche, R. A.; García-García, J. C.; Rodríguez, S. D.; García, M. A.; Guglielmone, A. A.; Mangold, A. F.; Friche, Passos, L. M.; Barbosa Ribeiro, M. F.; Blouin, E. F. Y Kocan, K. M. (2002b). Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. *Vet. Microbiol*. 88: 275-285.
- de la Fuente, J.; Bloiun, E. F. y Tocan, K.M. (2003b). Infection Exclusion of the Rickettsial Pathogen *Anaplasma marginale* in the Tick Vector *Dermacentor variabilis. Infec. Immun.*10 (1): 182- 184.
- de la Fuente, J.; Golsteyn, E. J.; Van Den Bussche, R. A.; Hamilton, R. G.; Tanaka, E.; Druhan, S. E. y Tocan, K. M. (2003a). Characterization of *Anaplasma marginale* Isolated from North American Bison. *Appl Environ Microbiol*. 69 (8): 5001–5005.
- Dumler, J. S.; Barbet, A. F.; Bekker, C. P.; Dasch, G. A.; Palmer, G. H.; Ray, S. C. ; Rikihisa, Y. y Rurangirwa, F. R. (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrichia equi* and HE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. (2001). *Int. Syst. Evol. Microbiol.* 6: 2145- 2165.
- 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.

- 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.
- Eriks, I. G., Stiller, D. y Palmer, G. H. (1993). Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2091- 2096.
- 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.
- Figueroa, J. V.; Chieves, L. P.; Johnson, G. S. y Buening, G. M. (1993a). 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.
- Figueroa, J. V.; Álvarez, J. A.; Ramos, J. A.; Vega, C. A. y Buening, G. M. (1993b). Use of multiplex polymerase chain reaction-based assay to conduct epidemiological studies on bovine hemoparasites in Mexico. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop.* 46 (1-2): 71- 75.
- Figueroa, J. V.; Alvarez, J. A.; Ramos, J. A.; Rojas, E. E.; Santiago, C.; Mosqueda, J. J.; Vega, C. A. y Buening, G. M. (1998). Bovine babesiosis and anaplasmosis follow-up on cattle relocated in an endemic area for hemoparasitic diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 849: 1- 10.
- Fischer, B.; Summer, I. y Goodenough, P. (1992). Isolation and denaturation of bioactive proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Arzneimittelforschung.* 42: 1512-1515.

- 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.
- Gaberc-Porekar y Menart, V. (2001). Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 49: 335-360.
- Gainer, J. H. (1961). Demonstration of *Anaplasma marginale* with the fluorescent dye, acridine orange; comparisons with the complement-fixation test and Wright stain. *Am. J. Vet. Res*. 22: 882- 886.
- 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.
- 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.
- Georges, K.; Loria, G. R.; Riilis, S.; Greco, A.; Caracappa, S.; Jongejan, F. y Sparagano, O. (2001). Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridization with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Vet. Parasitol*. 99: 273-286.
- Glascock, C.B y Weickert M. J. (1998). Using chromosomal $lacI^{q1}$ to control expression of genes on high-copy number plasmid in *Escherichia coli. Gene*. 223: 221-231.

- Glynou, K.; Ioannou, P. C. y Christopoulos, T. (2003). One-step purification and refolding of recombinant photoprotein aequorin by immobilized metal-ion affinity chromatography. *Protein Expr. Purif.* 27: 384- 390.
- Goff, W.; Barbet, 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: 919-92.
- 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.
- Gosling, J. P. (1990). A decade of development in immnunoassay methodology. *Clin. Chem*. 36 (8): 1408.
- Grossman, T.H.; Kawasaki, E. S.; Punreddy, S. R. Y Osburne, M. S. (1998). Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene.* 209: 95-103.
- 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.
- Hainfeld, J. F. y Furuya, F. R.(1992). A 1.4-nm gold cluster covalently attached to antibodies improves immunolabeling**.** *J. Histochem. Cytochem.* 40: 177-184.
- Hamilton, S.; Odili, J.; Pacifico, M. D.; Wilson, G.D. y Kupsch, J. M. (2003). Effect of imidazole on the solubility of a his-tagged antibody fragment. *Hybind Hybridomics*. 22(6) 347-355.
- Hans, A. S. (2001). http: //www. capra.iespana.es/capra/datos/andes.
- Haqshenas, G.; Huang, F. F.; Fenaux, M.; Guenette, D. K.; Pierson, F. W.; Larsen, C. T.; Shiraprasad, H. L.; Toth, T. E. y Meng, X. J. (2002). The putative capsid protein of the newly identified avian hepatitis E virus shares antigenic epitopes with that of swine and human hepatitis

E viruses and chicken big liver and spleen disease virus. *Journal of General Virology*. 83, 2201-2209.

- Harlow, E. y Lane, D. (1988). Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory: 559.
- Herrero, M. V.; Pérez, E.; Goff, W. L.; Torioni E. S.; Knowles, D. P.; McElwain, T. F. Álvarez, V., Álvarez, A. y Buening, G. M. (1998). Prospective study for the detection of *Anaplasma marginale* Theiler, 1911 (*Rickettsiales: Anaplasmataceae*) in Costa Rica. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 849: 226- 233.
- 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.
- Hugh-Jones, M. E.; Scotland, K.; Appewhaiti, L. M. y Alexander, F. M. (1988). Seroprevalence of anaplasmosis and babesiosis in livestock on St. Lucia, 1993. *Trop. Anim. Health Prod*. 20: 137- 139.
- *INOKUMA, H., BROUQUI, P., DRANCOURT, M., Y RAOULT, D. (2001). CITRATE SYNTHASE GENE SEQUENCE: A NEW TOOL FOR PHYLOGENETIC ANALYSIS AND IDENTIFICATION OF EHRLICHIA.* CLIN. MICROBIOL. *VOL. 39, (9): 3031-3039.*
- Jaiswal, S.; Khanna, N. y Swaminathan, S. (2004). High-level expression and one-step purification of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein in *E. coli*. *Protein Expr Purif*. 33(1): 80-91
- Janknecht, R.; de Martynoff, G.; Lon, J.; Hipskind, R. A.; Nordheim, A. y Stunnenberg, H. G. (1991). Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *PNAS* 88. pp : 8972-8976.
- Jerpseth, M.; Jerpseth, B.; Breister, L. y Greener, A. (2004). High-efficiency derivates of the BL21 series for protein expression. (http://www.stratagene.com/Newsletter/vol11_1/p3-4.htm).
- 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.
- Jürgen, B. H:; Lin, Y.; Riemschneider, S.; Scharf, C.; Neubauer, P.; Schmid, R.; Hecker, M. y Schweder, T. (2000). Monitoring of genes that respond to overproduction of an insoluble recombinant protein in *Escherichia coli* glucose limited fed- batch fermentation. *Biotechnol. Bioeng*. 70: 217- 224.
- Kano, F. S.; Vidotto, O.; Pacheco, R. C. y Vidotto, M. C. (2002). Antigenic characterization of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. *Vet Microbiol.* 87: 131-138.
- Katoh, S. y Katoh, Y. (2000). Continuous refolding of lysozyme with fedbatch addition of denatured protein solution. *Process. Biochem*. 35: 1119- 1124.
- Kessler, R. H. (2001). Consideracoes sobre a transmissao de *Anaplasma marginale*. *Pesq. Vet. Bras*. 21 (4): 177-179.
- Kieser, S. T.; Eriks, I. S. y Palmer, G. H. (1990). Cyclic rickettsemia during persistent anaplasmosis infection in cattle. *Infect. Immun.* 58: 1117-1119.
- Kingsbury, D. T. (1969). Estimate of the genome size of various microorganisms. *J. Bacteriol*. 98: 1400- 1401.
- Kinhm, U. (2002). Anaplasmosis bovina en Suiza. *Informaciones Sanitarias*. 15 (37): 177.
- 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.; Blouin, E. F.; Palmer, G. H.; Eriks, I. S. y Edwards, W. L. (1996). Strategies to interrupt the development of *Anaplasma marginale* in its tick vector. The effect of bovine derived antibodies. *Am. N. Y. Acad. Sci.* 791: 157- 165.
- Kocan, K.M.; Blouin, E. F. y Barbet, A. F. (2000). Anaplasmosis control. Past, present and future. *Ann. NY. Acad. Sci*. 966: 501- 509.

- Kocan, K. M.; hair, J. A.; Edwing, S. A. y Stralton, L. G. (1981). Transmiossion of *Anaplasma marginale* Theiler by *Dermacentor andersoni* Stiler and *Dermacentor variabilis* (say). *Am. J. Vet. Res*. 42: 15- 18.
- 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.
- Koltermann, A.; Boidol, W.; Danm, J.; Scholz, P. y Donner, P. (1997). Production of human interleukin-8 expressed in *Escherichia coli* from a laboratory scale for a GMP-compatible production. *J. Botechnol*, 54: 29-42.
- Lago, E.; Ortiz, F.; Finalet, J. y Martínez, S. (1998). Solubilización y purificación parcial de la proteína MSP5 de *Anapalsma marginale* expresada en *Escherichia coli*. *Rev. Salud Animal*. Vol. 20 (3): 159- 162
- Lemercier, G.; Bakalara, N. y Santarelli, X. (2003). On-column refloding of an insoluble histidine tag recombinant exopolyphosphatase from *Tripanosoma brucei* overexpressed in *Escherichia* coli. *J. Chromatog.r B*. 786. 305- 309.
- Lew, A. E.; Bock, R. E.; Minchin, C. M.;Masaka, S. (2002). A msp1α polimerase chain reaction assay for spesific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. *Vet. Mycrobiol*. 86:
- Li, M.; Su, Z-G. y Janson, J. C. (2004). In vitro protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Expr. Purif*. 33: 1-10.
- Lohr, C. V.; Brayton, K. A.; Shkap, V.; Molad, T.; Barbet, A. F.; Brown, W. C. y Palmer, G. H. (2002). Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 operon-associated protein during mammalian and arthropod infection. *Infect. Immun*. 70: 6005-6012.

- 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.
- Mahan, S.M., Allsopp, B., Kocan, K. M., Palmer, G. H. Y Jongejan, F. (1999). Vaccine strategies for *Cowdria ruminatum* infections and their application to other Ehrlichial infections. *Parasitol. Today.* 15: 290-294.
- Manual de la OIE. (2004). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.3.7. Bovine anaplasmosis.
- Martinko, M. (1999). Crecimiento microbiano. En: Brock: Biología de los microorganismos. Tomo II. Octava Edición: 149-177.
- 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.
- Medellín, J. A. (2003). Comunidad Virtual de veterinaria.org. (http://www. veterinaria. org/revistas/redvet/n080803.html).
- Melendez, R. D. y Forlano, M. (1997). Seroprevalence and incidence of babesiosis and anaplasmosis in a Corora breed herd from Venezuela. *Revista Brasilera de Parasitología Veterinaria.* 6: 105- 109.
- Melman, S., Hart, Y. y Giardina S. (2004). El uso de la biología molecular en el diagnóstico de *Anaplasma marginale*. (http://investigación.unefm.edu.ve).
- Mec-Jung, H.; Jong-Shin, Y. y Sang Yup, L. (2003). A proteomic approach to engineer improved cell growth and increased production of serine- rich proteins in E. coli. Genome Informatics 14: 541- 542.
- McElwain, T. F. (2000). Bovine anaplasmosis. Chapter 2.3.7. In Manual of standads for diagnostic test and vaccine, 4th edition. O.I.E., Paris: 399- 341.
- 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.
- Meeus, P. F.; Brayton, K. A.; Palmer, G. H. y Barbet, A. F. (2003). Conservation of a gene conversion mechanism in two distantly related paralogues of *Anaplasma marginale. Mol. Microbiol.* 47: 633-643.
- Melendez, R. D. y Forlano, M. (1997). Seroprevalence and incidente of babesiosis and anaplasmosis in a Carora breed herd from Venezuela. *Brazil J. Vet. Parasitol*: 105-109.
- 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.
- Montenegro-James, S.; James, M. A.; Toro Benitez, M.; Leon, E.; Back, B. K. and Guillen, A. T. (1991). Efficacy of purified *Anaplasma marginale* initial bodies as a vaccine against anaplasmosis. *Parasitol. Res.* 77:93-101.
- Moore, D. S. (1998). Estadística Aplicada Básica. Editorial Antoni Bosch.
- Moros, Z. C.; Abad, M. J.; Arsenal, M.; Martínez, D.; VCierco, M. M.; Costagliola, A.; Urbina, L.; Taylor, L.; Liprandi, F. y Helene, F.. (2003). Diagnóstico molecular y sexológico de un brote de dengue en Coro,

estado Falcón, Venezuela. Investigación Clínica, V. 44, No. 3. http://scielo.org.ve/scielo.php

- 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. (1989). 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 principales proteínas recombinantes del VIH 1 y 2. Tesis de Doctorado, CIGB, La Habana, Cuba.
- Narciandy R. E.; Fernández, J. R.; García, J.; Madrazo, J.; Padrón, G.; Novoa, L.I. y Herrera, L.(1996). Production and purification of a fused recombinant protein gp-36 (HIV-2) from *Escherichia coli. J. Chem. Tech. Biotechnol.* 66: 1-6.
- Ndungú, 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.
- Oliveira, S.B.; Madruga, C. R.; Schenk, M. A. Kessler, R. H.; Miguita, M. Y Araujo, F. R. (2003). Antigenic characterization of Brazilian isolates of *Anaplasma marginale*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98: 395-400.

- Olson, P.; Zhang, Y.; Olsen, D.; Owens, A.; Cohen, P.; Nguyen, K.; Ye, J. J.; Bass, S. y Mascarenhas, D. (1998). High level expression of eukaryotic polypeptides from bacterial chromosomes. *Infect. Immun.* 14: 160-166.
- OMS. (1997). A rapid dipstick antigen capture assay for the diagnosis of falciparum malaria. ISSN 1829- 4989. *Rev. Panam. Salud Pública.* 1: 41-47
- Osta, R (1994): Caracterización genética de proteínas lácteas y sexaje de embriones en ganado vacuno mediante la aplicación de la biotecnología al análisis del DNA. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España.
- 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.; Brown, W. C. y Rurangirwa, F. R. (2000). Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Microbes and Infections*. 2: 167.
- 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.; Oberle, S. M.; Barbet, A. F.; Davis, W. C. Goff, W. L. y McGuire, T. C. (1988b). Immunization with a 36 kDa surface protein induces protection against homologous and heterologous *Anaplasma marginale* challenge. *Infect. Immun.* 56: 1526-1531.
- Palmer, G. H.; Rurangirwa, F. R. Y McElwain, T. F. (2001). Strain composition of the ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a mammalian reservoir for tick transmission. *J. Clin. Microbiol. 39*: 631-635.
- Payne, R. C. y Scott, J. M. (1982). Anaplasmosis and Babesiosis in El Salvador. *Trop. Anim. Health Prod.* 14: 75- 80.
- Pearson, W. R. Y Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequences analysis, PNAS. 85: 2444-2448.
- Pemawansa, K. P. W., Heisler, M. D., Blackwell, S. L., Cymes, L., Mahalak, K. L. y Kraus, M. A. (1990). An advanced affinity membrane for covalent binding of amino ligands. *Biotechniques*. 9 (3): 352.
- Pérez, J. L.; Navarro, M. O.; Gimeno, C. y Mendoza, J. (1995). Diagnóstico de laboratorio de las infecciones por herpesvirus. Revisión Científica. Foro Bioquímico. http://orbita.estarmedia.com

- Platis, D. y Foster, G. R. (2003). High yield expression, refolding, and characterization of recombinant interferon α2/α8 hybrids in *Escherichia coli. Protein Expression and Purification*. 31: 222- 230.
- PPO4.09.014.93. (2003). Chequeo de la estabilidad plasmídica. Edición 05, CIGB.
- 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.
- Ramchuran, S.B.;Nordberg Karlsson, E.; Velut, S.; De Marc, L.; Hagander, P. y Holst, O. (2002). Production of heterologous thermostable glycoside hydrolases and the presence of host cell proteases in substrate limited fed-batch cultures of *E. coli* BL21(DE3*). Appl Microbiol Biotechnol*. 60(4); 408-416.
- Rey, C.; Aso, P. M. y Coronado, A. (2003). Homologous and heterologous immune reactions betwewn Venezuelan geographic isolates of *Anaplasma marginale. Ann. NY. Acad. Sci.* 916: 658-661.
- Reyna-Bello, A.; Cloeckaert, A.; Vizcaíno, N.; Gonzatti, M. I.; Aso, P. M.; Dubray, G. y Zygmunt, M. S. (1998). Evaluation of an Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in Venezuela. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. Vol. 5. 2: 259-262.
- Ribeiro, M. F.; Passos, L. M. (1996). Ultrastructural alterations on *Anaplasma marginale* caused by dimethyl sulfoxide. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 48: 657-664.
- Ribeiro de Araújo, F.; Ramires dos Santos, L.; Madruga, C. R.; Fragoso, S. S.; Umaki, A. C. y Soare, C.O. (2002). Clonagem e expressáo do gene msp5 de um isolado brasileiro de *Anaplasma marginale.*(http://www.cnpgc.embrapa.br/publicacoes/ct/ct29).
- 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. 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.
- Rius, F.; Barón, F. J.; Sanchéz, E. y Parras, L. (1999). Manual de la Universidad de Málaga. Bioestadística, Métodos y Aplicaciones. 3ra Edición.
- Rodríguez, J.; Alonso, M.; Blandino T.; Abreu, R. y Gómez, E. (1987). Manual de Técnicas Parasicológicas. Ciudad de la Habana, Ediciones ENPES, 1987.
- Roge, H.; Kosemund, K.; Kuhlbrandt, W. y collision, I. (1998). Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography. *FEBS Letters.* 432: 21-26.
- Sachse, K.; Grojetzki, C.; Pfutzer, H, y Hass, R. (1992). Comparison of *Mycoplasma bovis* strains based on SDS-PAGE and immunoblot patterns. *J. Vet. Med*. 39: 246-252.
- Saito, S.; Fijasawa, A.; Ohkawa,S.; Nishimura, N.; Abe, T.; Kodama, K.; Kamogawa, K.; Aoyama, S.; Irotani, Y. y Hayashi, Y. (1993). Cloning and DNA sequence of 29kDa polypeptide gene of *Myicoplasma 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.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1992). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sasson, A. (1998). Biotecnologías aplicadas ala producción de fármacos y vacunas. *Alfos Scientiae*, La Habana, Cuba.

- Shao-hui CAI; Yi Tan; Xian-da REN; Xiao-hong, LT; Shao-xi CAI y Jun Du. (2004). Loss of c-terminal α-helix decreased SDF-1-α mediated signaling and chemotasis without influencing CX-CR 4 internalization. *Acta Pharmacol Sin*. 25(2): 152-160.
- 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.
- Smith, R. D.; Levy, M. G.; Kuhleschmitdt, M. S.; Adams, J. H.; Rzechula, D. G.; Hardt, T. A. y Kocan, K. M. (1986). Isolate of *Anaplasma* marginale not transmitted by ticks. *Am. J. Vet. Res*. 47: 127- 129.
- Spath, E. J. A. (2003). http://www.inta.gov.ar/balcarse/gsa/inform-epidem/comercio/htm.
- 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.; Kocan, K. M.; Palmer, G. h.; Edwing, S. A.; Hair, J. A. y Barron, S. J. (1989). Transstadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentor variables*. *Am. J. Vet. Res*. 50: 1377- 1380.
- Stich, R. W.; Bantle, J. A. y Kocan, K. C. y Fekete. A. (1993a). Detection of Anaplasma marginale (*Rickettsiales: Anaplasmataceae*) in hemolymph of *Dermacentor anderosni* (*Acari: Ixodidae*) with the polymerase chain reaction. *J. Medical Entomology*. 30: 781- 788.
- Stich, R. W.; Sauer, J. R.; Bantle, J. A. y Kocan, K. C. (1993b). Detection of *Anaplasma marginale* (*Rickettsiales: Anaplasmataceae*) in

secretagogue-induced secretions of *Dermacentor andersoni* (*Acari: Ixodidae*) with the polymerase chain reaction. *J. Medical Entomology*. 30: 789- 794.

- Studier, F. W. (1991). Use of bacteriophage T7 lisozime to improve on inducible T7 expression system. *J Mol Biol*. 219: 37-44.
- Swartz, J. R. (2001). Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. Current Opinion in Biotechnology. 12: 195-201.
- 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.
- Teclaw, R. F.; García, Z.; Romo, Z. y Wagner, G. C. (1985). Incidente of babesiosis and anaplasmosis infection in cattle sampled monthly in the Mexican states of Nuevo Leon and San Luis. *Prev. Vet. Med*. 3: 427-435.
- Tierny, Y. y Hounsa, C. G.; Horney, J. P. (1999) Efects of a recombinent gene product and growth conditions on plasmid stability in pectinolytic *E. coli* cells. *Microbiol*. 97 (386): 30-53.
- Torres, E.; Muñoz, M.; Rocha, M. D.; López, J. L.; Romero, M.; Medina, A. L. y Garcóa, A. C. (1998). Validación clínica del inmunoensayo rápido BioLine-hCG para el diagnóstico rápido del embarazo BioLine-hCGG. *Rev. Cubana Med.* 37 (3): 131- 135.
- Torioni, E. S.; 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.
- Torioni, E. S. y Echaide, I. E. (2003). Anaplasmosis de los bovinos. (http://www.veterinario.sursf.com.ar/muestrapublicacion.php).
- 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.
- Varnerin, J. P.; Smith, T.; Rosenblun, C. I.; Vongs, A.; Murphy, B. A.; Nunes, C.; Mellin, T. N.; King, J. J. y Burgess, B. V. (1998). Production of leptin in *Escherichia coli*: a comparison of methods. *Protein Expr. Purif.* 14: 335-342.
- Vidotto, M. C.; Andrade, G. M.; Palmer, G. H.; McElwain, T. F. Y Knowles, D. P. (1998). Seroprevalence of *Anaplasma marginale* on cattle in Parana State, Brazil, by major surface protein 5 competitive enzyme linked immunosorbent assay. *Ann. NY Acad. Sci.* 849: 424-426.
- 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.
- Viseshakul y col. (2002). Sequence and expression analysis of a surface antigen gene family of the rickettsia *Anaplasma marginale*. Department of Pathobiology, University of Florida. PO Box 110880.
- 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 Dumler, S. D. (1996). Emergence of the ehrlichioses as human health problems. *Emerging Infect.* 2: 18-29.
- Wagner, G. (1981). Immunoglobulin responses of cattle associated with recrudescent Anaplasma marginale infections. *Proceedings: 7th National Anaplasmosis Conference 7*: 307- 320.

- West, S. M.; Chaudhuri, J. B. y Howell, J. A. (1998). Improved protein refolding using hollow-fibre membrane dialysis. *Biotechnol. Bioeng*. 57: 590- 599.
- Wickwire, K. B.; Kocan, K. M. y Barron, S. J. (1987). Infectivity of three *Anaplasma marginale* isolates for *Dermacentor andersoni*. *Am. J. Vet. Res*. 48: 96- 99.
- Wirth, 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.
- Yang, X. A.; Dong, X. Y.; Wang, Y. D.; Chen, W. F. (2004). Purification and refolding of a novel cancer/testis antigen BJ-HCC-2 expressed in the inclusion bodies of *E. coli*. *Protein Expr. Purif*. 33(2) 332-338.
- Yeruham, J. y Braverman, Y. (1981). The transmission of *Anaplasma marginale* to cattle by blood- sucking arthropods. *Refuah. Vet*. 38: 37-44.
- Yilma, T. (1994). Recombinant vaccines and rapid diagnostic kits: transfer of technology to developing countries. En: recombinant and synthetic vaccines (Eds.). G. P. Talwar et al. Narosa Publishing House, New Delhi, India.
- Yoshihara,E.; Vidotto, O.; Yamamura, M. H.; Marana, E. R.; Pacheco, R. y Silveira, A. P. (2003). Studies of natural infection with *Anaplasma marginale* in Nelore cattle in the Umuarama municipality, Paraná state, Brazil. *J. Vet. Parasitol*. 12 (1): 21- 26.
- Zachariou, M. (2004). Immobilized metal ion affinity chromatography of proteins. *Methods Mol. Bio*l. 251: 89- 102.

- 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.
- Zouhar, J.; Nanak, E. y Brzobohaty, B. (1999). Expresión, single-step purification, and matriz-assisted refolding of a maize cytokinin-specific β-glucosidase. *Protein Expession and Purification*. 17: 153- 162.

ANEXO 1

Medios de cultivo, Soluciones y Marcadores de peso Molecular

Medios líquidos
LB

Triptona----------10g
NaCl----------10g
Extracto de levadura----------5g
H_2O destilada----------hasta 1000mL
pH 7.5

SOB

Triptona----------20g
NaCl----------0.5g
Extracto de levadura----------5g
KCl----------186mg
H_2O----------hasta 1000mL
pH 7
Una vez autoclaveado, añadir 10mL de solución 1M $MgCl_2/MgSO_4$.

Medios sólidos

Placas de medio LB, agar, ampicilina (por L de medio LB)
Agar----------15g
Ampicilina----------50µg/mL

Placas de medio SOB, agar, ampicilina, cloranfenicol (por L de Medio SOB
Agar----------15g
Ampicilina----------50µg/mL
Cloranfenicol----------35µg/mL

Ampicilina: Se prepara a 100mg/mL en H_2O destilada estéril, conservándose a -20°C. La concentración de trabajo es de 50µg/mL.
Cloranfenicol: Se prepara a 35mg/mL en etanol absoluto, conservándose a -20°C. La concentración de trabajo es de 35µg/mL.

Solución TBE 10X
Tris base----------108g
Ácido bórico----------35g
Disolver en 900ml de H_2O desionizada
Adicionar 40ml de EDTA 0.5M, pH 8
Completar con H_2O desionizada hasta 1L
Conservar a temperatura ambiente ó 4°C.

Solución EDTA 0.5M, pH 8
Disodium ethylenediaminetetraacetate x $2H_2O$---- 186.1g

H_2O---------- 800ml
Agitar vigorosamente en agitador magnético. Ajustar a pH 8 con NaOH
Dispensar en alícuotas y esterilizar por autoclave.

Tampón carga de ADN 10X
Azul de bromofenol---------- 0.25% (p/v)
EDTA---------- 25mM
Glicerol---------- 50% en H_2O (v/v)

Tampón de PCR (Promega)
KCl---------- 10 mM
Tris HCl---------- 200 mM
$MgCl_2$---------- 2.5 mM,
Triton X-100---------- 0.1%
pH 8.8

1. Tampón carga de proteínas 2X
2. **Tris-HCl pH 6.8---------- 1.23ml**
3. **β- mercaptoetanol---------- 1ml**
4. **SDS (20%)---------- 2mL**
5. **Glicerol ---------- 2mL**
6. **Bromofenol azul ---------- 2mg**
7. **Completar con H_2O estéril hasta 10 mL**
8.
9. Solución de PBS
10. **NaCl---------- 8g**
11. **KCl---------- 0.2 g**
12. **Na_2HPO_4 ---------- 1.5 g**
13. **KH_2PO_4 ---------- 0.2 g**
14. **H_2O estéril---------- 1000 mL**
15. **pH 7.2-7.4**
16.
17. PBS-Tween 20 0.05%
18. **50 µL de Tween 20 para 100 mL de PBS**
19.
20. Solución de Coomassie (0.1%)
21. **Etanol---------- 40 mL**
22. **Ácido acético---------- 10 mL**
23. **H_2O estéril---------- 50 mL**
24. **Coomassie---------- 0.1 g**
25.
26. Solución colorante Rojo Ponceau (0.2%)
27. **Rojo Ponceau S 2%---------- 20 mL**
28. **Completar a 200 mL de H_2O estéril.**
29.
30. Sustrato del conjugado peroxidasa
31. **Diaminobencidina---------- 9 mg**
32. **PBS----------18 mL**
33. **H_2O_2 ---------- 9 µL**
34.

35.
36.
37. Solución tampón fosfato 8X, pH 7.4
38. **Na_2HPO_4 X $2H_2O$----------1.42g**
39. **NaH_2PO_4 X H_2O----------1.11g**
40. **NaCl---------- 23.38g**
41. **H_2O----------hasta 100ml**
42.
43. Tampón A
44. **Solución tampón fosfato 1X**
45. **PMSF 1mM**
46.
47. Tampón A + lisozima
48. **Solución tampón fosfato 1X**
49. **PMSF 1mM**
50. **Lisozima 0.75 mg/ml**
51.
52. Tampón A + Urea
53. **Solución tampón fosfato 1X**
54. **PMSF 1mM**
55. **Urea (4M, 6M, 8M)**
56.
57. Tampón A + lisozima + Urea
58. **Solución tampón fosfato 1X**
59. **PMSF 1mM**
60. **Lisozima 0.75 mg/ml**
61. **Urea (4M, 6M, 8M)**
62.
63. Tampón B
64. **Solución tampón fosfato 1X**
65. **Urea 8M**
66.
67.
68. Tampón C
69. **Solución tampón fosfato 1X**
70. **Urea 8M**
71. **Imidazol 10mM**
72.
73. Tampón D
74. **Solución tampón fosfato 1X**
75. **Imidazol 10, 20, 40, 50, 60, 100, 200, 250, 300, 500mM**
76.
77. Tampón E
78. **Solución tampón fosfato 1X**
79. **Urea 8M**
80. **Imidazol 50mM**
81.
82. Tampón F
83. **Solución tampón fosfato 1X**
84. **Imidazol 250mM**

85.
86. Tampón 1
87. **Tris 5mM, pH 7.5**
88. **BSA 2%**
89. **pvp30 0.05%**
90. **Azida de sodio 0.1%**
91.

Wide Molecular Weight Range (Sigma)

205.000 (Miosina, músculo de conejo)
116.000 (β-Galactosidasa, *Escherichia coli*)
97.400 (Fosforilasa B, músculo de conejo)
84.000 (Fructosa- 6 -fosfato quinasa, músculo de conejo)
66.000 (Albúmina, suero bovino)
55.000 (Glutamato deshidrogenasa, hígado bovino)
45.000 (Ovalbúmina, huevo de pollo)
36.000 (Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, músculo de conejo)
29.000 (Anhidrasa carbónica, eritrocitos bovinos)
24.000 (Tripsinógeno, páncreas bovino)
20.000 (Inhibidor de tripsina, frijol de soya)
14.200 (α-Lactoalbúmina, leche bovina)
6.500 (Aprotinina, pulmón bovino)

Marcador de peso molecular de 1kb (Promega)

10kb
8kb
6kb
5kb
4kb
3kb
2.5kb
2kb
1.5kb
1kb
500pb

Marcador de peso molecular de 100pb

1200pb
1000pb
900pb
800pb
700pb
600pb
500pb
400pb
300pb
200pb
100pb
50pb

Anexo 3

Tabla 5: Promedio de la D.O. y las desviaciones estándar de la cinética de crecimiento en el tiempo de la cepa recombinante de *E. coli* contentiva del plásmido pHMSP5 para el cultivo inducido y no inducido.

Tiempo (horas)	D.O. Cultivo Inducido (media)	D.S.	D.O. Cultivo No Inducido (media)	D.S.
1	0.107	0.001	0.104	0.002
2	0.144	0.005	0.142	0.002
3	0.223	0.010	0.216	0.005
4	0.318	0.008	0.313	0.003
5	0.461	0.021	0.444	0.006
6	0.613	0.014	0.675	0.105
7	0.729	0.005	0.735	0.092
8	0.764	0.013	0.819	0.103
9	0.791	0.027	0.906	0.108
10	0.799	0.030	0.970	0.100
11	0.805	0.034	1.003	0.073

Tabla 6: Promedio del porciento de expresión y las desviaciones estándar de la cinética de crecimiento en el tiempo de la cepa recombinante de *E. coli* contentiva del plásmido pHMSP5 para el cultivo inducido.

Tiempo (horas)	% Expresión (media)	D.S
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	15.46	0.9799
7	18.53	0.7049
8	18.79	0.8169
9	19.86	1.9640
10	21.70	0.8430
11	20.18	1.0104

Tabla 7: Promedio de los valores de peso seco y las desviaciones estándar de la cinética de crecimiento de los cultivos inducidos

Tiempo (horas)	Peso Seco (g/L)	D.S
1	0	0
2	0	0
3	0.077	0.0071
4	0.140	0.0141
5	0.200	0.0071
6	0.271	0.0071
7	0.372	0.0071
8	0.480	0.0212
9	0.600	0.0000
10	0.799	0.0283
11	0.805	0.0141

Tabla 8: Promedio del número de colonias en LB y LBA y las desviaciones estándar.

	Estabilidad en LB		Estabilidad en LBA	
Tiempo (horas)	# de Colonias (media)	D.S	# de Colonias (media)	D.S
0	30	2.23	31	4.72
2	66	8.24	57	12.39
4	118	12.39	66	9.99
6	222	5.14	31	5.79
8	313	21.20	11	2.69
10	400	2.55	7	1.65

TABLA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Amp	Ampicilina
BSA	Albúmina de suero bovino

Clor	Cloranfenicol
C-terminal	Carboxilo-terminal
CENSA	Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria
CIGB	Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
$dNTP_s$	Desoxiribonucleótidos
D.O.	Densidad óptica
ECL	Ensayo quimioluminiscente
EDTA	Etilendiaminotetraacético
EIA	Inmunoensayo enzimático
ELISA	Inmunoensayo ligado a enzima
G+ C	Guanina + Citosina
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFNγ	Interferón γ
IMV	Instituto de Medicina Veterinaria
IPTG	β-D-isopropil-tiogalactopiranósido
IMAC	Cromatografía de afinidad por interacción con quelatos metálicos
Ig	Inmunoglobulina
kb	kilobase
kDa	kilodalton
kpb	kilopares de bases
lacIq	Mutante que superproduce la proteína represora del operón lactosa
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
LBA	Medio de cultivo Luria Bertani/amp 50μg/mL
LBAC	Medio de cultivo Luria Bertani/amp 50μg/mL/clor 35μg/mL
N-terminal	Amino terminal
pb	par de base
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pvp	Polivinilpirrolidona

PCR *"nester"*	Reacción en cadena de la polimerasa doble
RFLP	Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SOB	Medio de cultivo para *E. coli*
SOBAC	Medio de cultivo SOB: amp 50μg/mL; clor 35μg/mL
TEMED	N, N, N´, N´-tetrametiletilenediamida
t_d	Tiempo de duplicación
Tm	Temperatura de unión de los cebadores
t_o	tiempo inicial
UFC	unidades formadoras de colonias
vvm	volumen de aire/volumen de líquido/minuto
λ	Longitud de onda
μ	Velocidad de crecimiento
p/v	Peso/volumen
v/v	Volumen/volumen

Conclusiones Finales

1. El clon recombinante obtenido expresa la proteína MSP5 de *Anaplasma marginale*.

2. A partir del procedimiento desarrollado se obtuvo la proteína recombinante HMSP5 con un 95% de pureza.

3. El ensayo de PCR desarrollado resultó útil para la detección de *A. marginale* y el ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral propuesto es factible de usar en la detección de anticuerpos contra *A. marginale* en animales sin síntomas clínicos de la enfermedad.

RECOMENDACIONES

1. Validar el ensayo de PCR, determinando sus parámetros de desempeño.
2. Desarrollar y validar el ensayo inmunogromatográfico de flujo lateral para su posterior uso comercial.
3. Realizar un estudio de factibilidad económica de los sistemas propuestos.