

016941



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION ANIMAL Y DE LA SALUD ANIMAL

CARACTERIZACION DE NUEVOS ANTIGENOS EN TRES CEPAS MEXICANAS DE Anaplasma marginale

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A
R O B E R T B A R I G Y E

TUTOR: PhD SERGIO DARIO RODRIGUEZ CAMARILLO
COMITE TUTORAL: PhD. CARLOS AGUSTIN VEGA Y MURGUIA
PhD. ROGELIO ALONSO MORALES

CIUDAD UNIVERSITARIA, COYOACAN A JULIO, 2003

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Como tutores del alumno de doctorado Robert Barigye manifestamos que hemos estudiado la tesis que el candidato presenta para obtener el grado de Doctor en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la Universidad Nacional Autónoma de México y le concedemos nuestra aprobación:


**PhD Sergio Dario Rodriguez Camarillo (Tutor principal)**

FIRMA:  ..... FECHA: 3 de julio de 2003

**PhD Carlos Agustin Vega y Murguía (Asesor)**

FIRMA:  ..... FECHA: 1 de julio de 2003

**PhD Rogelio Alonso Morales (Asesor)**

FIRMA:  ..... FECHA: 3 Julio 2003

## CONTENIDO

Dedicatoria.....	9
Agradecimientos.....	10
Declaración.....	12
Vitae.....	13
Lista de figuras.....	14
Resumen general.....	20
<b>CAPÍTULO I</b>	
1.0 INTRODUCCIÓN.....	24
<b>CAPÍTULO II</b>	
2.0 REVISIÓN DE LITERATURA.....	32
2.1 Definición y patogénesis de la enfermedad.....	32
2.2 Clasificación.....	35
2.3 Morfología.....	37
2.4 Transmisión.....	38
2.4.1 Transmisión biológica y ciclo biológico.....	38
2.4.2 Transmisión mecánica.....	41
2.4.3 Transmisión iatrogénica.....	41
2.4.4 Transmisión vertical.....	42
2.5 Epidemiología e importancia económica.....	42
2.5.1 Distribución.....	42
2.5.1.1 Prevalencia de la anaplasmosis a nivel mundial.....	42
2.5.1.2 Prevalencia de la anaplasmosis en México.....	44
2.5.2 Importancia económica.....	45
2.5.3 Susceptibilidad de razas bovinas.....	46
2.5.4 Susceptibilidad por edad.....	46

TESIS CON  
 FALLA DE CUBIEN

2.6	Vacunación contra la anaplasmosis.....	47
2.6.1	Preinmunización con <i>A. marginale</i> .....	47
2.6.1.1	Preinmunización con una cepa virulenta de <i>A. marginale</i> .....	47
2.6.1.2	Preinmunización con una cepa atenuada de <i>A. marginale</i> .....	47
2.6.2	Preinmunización con <i>A. centrale</i> .....	48
2.6.3	Vacunas inactivadas de <i>A. marginale</i> .....	49
2.7	Inmunidad y profilaxis.....	50
2.8	Epidemiología molecular.....	51
2.9	Antígenos inmunoprotectores.....	54
2.9.1	MSP-1.....	54
2.9.2	MSP-2.....	57
2.9.3	MSP-3.....	59
2.9.4	MSP-4.....	60
2.9.5	MSP-5.....	61
2.10	Otros antígenos de <i>A. marginale</i> .....	61
2.11	Antígenos de la etapa de <i>A. marginale</i> en la garrapata.....	62
2.12	Mecanismos inmunológicos.....	62
2.12.1	La respuesta humoral.....	63
2.12.2	La respuesta celular.....	64
2.12.3	Protección cruzada e inmunidad específica de cepa.....	67

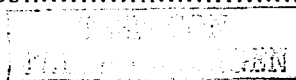
### CAPÍTULO III (EXPERIMENTO I)

3.0	Resumen.....	70
-----	--------------	----



3.1 INTRODUCCIÓN.....	71
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
3.2.1 Aislados de <i>A. marginale</i> .....	73
3.2.2 Animales experimentales.....	74
3.2.3 Purificación de antígeno de <i>A. marginale</i> .....	76
3.2.4 Purificación de proteínas de las membranas de eritrocitos bovinos no infectados.....	76
3.2.5 Determinación de concentración de proteínas en el extracto de <i>A. marginale</i> y de eritrocitos bovinos no infectados por la técnica de Bradford.....	77
3.2.6 Electroforesis e inmunoblot del extracto de <i>A. marginale</i> y del estroma de eritrocitos no infectados.....	78
3.2.6.1 Electroforesis.....	78
3.2.6.2 Electrotransferencia.....	79
3.2.6.3 Inmunoblot.....	81
3.3 RESULTADOS.....	81
3.4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	90
 <b>CAPÍTULO IV (EXPERIMENTO II)</b>	
Resumen.....	92
4.1 INTRODUCCIÓN.....	92
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	94
4.2.1 Animales experimentales.....	94
4.2.2 Experimentos de inmunización.....	95
4.2.2.1 Preparación del inmunógeno experimental.....	95
4.2.2.2 Inmunización de bovinos.....	95
4.2.3 Ensayo de inmunoenzimático de ELISA indirecta.....	96
4.2.4 Estudios de linfoproliferación in vitro.....	97

4.2.4.1 Preparación de reactivos.....	97
4.2.4.2 Muestreo y aislamiento de células mononucleares.....	98
4.2.4.3 Ensayo de linfoproliferación.....	99
4.2.5 Identificación de antígenos-IgG1 e IgG2 específicos.....	101
4.2.5.1 Inmunoblot en una dimensión.....	101
4.2.5.2 Electroforesis en dos dimensiones e inmunoblot para proteínas IgG1 e IgG2 específicas.....	104
4.2.5.2.1 Electroforesis de doble dimensión.....	104
4.2.6 Identificación de MSP con anticuerpos específicos.....	105
4.2.7 Toma y evaluación de datos clínicos en el periodo posdesafío.....	106
4.3 RESULTADOS.....	106
4.3.1 Respuestas humoral y celular.....	106
4.3.1.1 ELISA indirecta.....	106
4.3.1.2 Linfoproliferación in vitro.....	108
4.3.2 Antígenos IgG, IgG1 e IgG2 específicos.....	111
4.3.3 Inmunoblot para las MSP.....	112
4.4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	137
<b>CAPÍTULO V (EXPERIMENTO III)</b>	
Resumen.....	145
5.1 INTRODUCCIÓN.....	146
5.2 MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	147
5.2.1 Electroforesis de flujo continuo de proteínas de <i>A. marginale</i> Méx-17.....	147
5.2.2 Procesamiento de fracciones.....	148
5.2.3 Re-estimulación de los bovinos.....	150



5.2.4 Tipificación de células CD4+.....	150
5.2.5 Determinación de IFN- $\gamma$ en PBMC cultivadas en presencia de <i>A. marginale</i> .....	151
5.3 RESULTADOS.....	153
5.4 DISCUSSION Y CONCLUSIONES.....	166
6.0 BIBLIOGRAFÍA.....	170

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## DEDICATORIA

Ésta tesis se dedica;

A mi esposa la Sra. Esther Tumuhairwe Barigye, por estar a mi lado aunque estaba yo lejos y por encargarse de todas las responsabilidades en nuestra casa durante el largo tiempo de mi ausencia,

A mis queridos hijos por haber aguantado mi ausencia durante mucho tiempo, por siempre tenerme en sus corazoncitos y por darme el amor verdadero,

A mi querida madre la Sra. Sophia Kebeyi Kashoro por darme las primeras enseñanzas de la vida y por ser la inspiración que me ha llevado lejos en la búsqueda de un lugar en el mundo de la ciencia y a mi papa; Mzee Gershom Kashoro por su lucha incansable de educar a sus hijos y por inculcarme que el secreto del éxito conlleva el tesón y la paciencia.

TESIS  
FALLA DE ORIGEN

## AGRADECIMIENTOS

Antes que nada quiero agradecer a mi tutor principal Dr. Sergio Darío Rodríguez Camarillo por aceptarme en sus proyectos de investigación y por el apoyo y las enseñanzas que me ha dado desde que empecé la investigación de tesis doctoral en su laboratorio. Sus experiencias y enseñanzas han sido de enorme utilidad para formarme como un investigador y siempre se las agradeceré.

A mis asesores: Dr. Rogelio Alonso Morales y Dr. Carlos Agustín Vega y Murguía, les agradezco su tiempo, consejos y amistad durante los tres años de mi estancia como alumno de doctorado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Miguel Ángel García le agradezco por su apoyo, no solo en asuntos laborales sino también afuera del laboratorio. La amistad que me ha brindado junto con su familia y su preocupación por mi bienestar están amablemente agradecidos.

A todos mis compañeros en el CENID-Parasitología Veterinaria del INIFAP les agradezco por el amor que me han brindado durante el tiempo que estuve con ustedes. Particularmente quiero agradecer al Dr. Alejandro Sánchez Albarran quien estaba a mi lado cuando hacia falta lo que fuera y al Dr. Julio Vicente Figueroa Millán por sus consejos.

Agradezco al pueblo mexicano por darme todo lo que necesitaba, sea en forma de recursos económicos o las sonrisas para animarme en esos momentos cuando me sentía casi derrotado y estaba a punto de rendirme. Las experiencias durante los cuatro años de mi estancia en



este hermoso país siempre serán parte de mis mejores recuerdos de mi vida.

A mi familia por aguantar mi ausencia y por estar siempre allá esperándome.

A los compañeros de la División de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, como el Dr. Flores Covarrubias y otros más por todo el apoyo que me brindaron durante el tiempo que estuve estudiando en esta gran casa de estudios.

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología en México (CONACYT) bajo el proyecto No. 30416B mientras que la Secretaría de Relaciones Exteriores de México y la Universidad Nacional Autónoma de México me otorgaron becas para mi manutención durante el periodo de mis estudios doctorales por lo que están especialmente agradecidos y reconocidos.

Doy miles de gracias a varias personas no mencionadas aquí pero a quienes en una manera u otra contribuyeron enormemente para el éxito de este trabajo.

**Robert Barigye.**

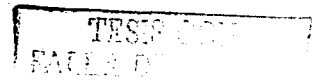
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DECLARACIÓN

Yo **Robert Barigye** doy fe que esta tesis es mi propio trabajo de investigación y que ha sido presentado a ninguna otra universidad para obtener el título de doctorado.

FIRMA:  .....

FECHA: ..... 11/07/2003 .....



## VITAE

El Dr. Robert Barigye, de nacionalidad ugandésa, nació el 20 de noviembre del año 1967 en la ciudad de Kampala-Uganda. Del año 1975 al 1981, Robert estudió la primaria en *Kashenyi Primary School* en el distrito de Rukungiri-Uganda. Del año 1982 al 1985, ingresó en *Kyambogo College School*, Kampala-Uganda, donde estudió la secundaria y después ingresó en la preparatoria de: *Busoga College Mwiri* (Jinja-Uganda) donde estudió durante dos años: Biología, Química y Física. El año 1988, Robert ingresó en la Universidad de Makerere, Kampala-Uganda, donde estudió licenciatura en Medicina Veterinaria y terminó la carrera en el año, 1993. En el mismo año empezó a trabajar como ayudante de profesor (*Assitant Lecturer*) en el departamento de Patología Veterinaria de la misma universidad. Del año 1996 al 1997, Robert fue becado por el banco mundial para estudiar una Maestría en Patología Veterinaria en la Universidad de Londres (*Royal Veterinary College*), Inglaterra y se recibió de *MSc in Veterinary Pathology with Distintion* en el mes de junio, 1998 y regresó como profesor en la universidad de Makerere-Uganda. En el mes de junio, 1999 Robert ganó una beca de la Secretaría de Relaciones de México para estudiar doctorado en el area de Ciencias de la Producción Animal y de la Salud Animal en la Universidad Nacional Autonoma de México. Robert Barigye actualmente cuenta con permiso para estudiar en México y terminando regresará a su puesto de profesor en la universidad de Makerere-Kampala, Uganda. Robert es casado y tiene hijos.

TESIS CON  
FALLA DE CALIFICACION

## LISTA DE FIGURAS

## CAPÍTULO II

Figura i: La manifestación clínica de la anaplasmosis bovina.

Figura ii: Ciclo biológico de *A. marginale*.

## CAPÍTULO III

Figura 1: Glóbulos rojos del bovino 06 infectado con *A. marginale* (Méx-15).

Figura 2: Cuerpos iniciales extra-eritrocíticos de la cepa Méx-17.

Figura 3: Electroforesis de proteínas de la cepa Méx-17 en un gel de poliacrilamida al 10%.

Figura 4: Ensayo de inmunotransferencia de proteínas de la cepa Méx-17 después de separación en un gel de poliacrilamida al 10%.

Figura 5: Ensayo de inmunotransferencia de proteínas de las cepas Méx-15, Méx-17 y Méx-30 después de separación en un gel de poliacrilamida al 10%.

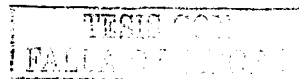
Figura 6: ELISA para proliferación celular de un bovino inmunizado y un testigo una semana después de la tercera inmunización.



- Figura 7: Perfil de proteínas en tres cepas mexicanas de *A. marginale* en un gel de poliacrilamida teñido por Azul de Coomassie-R-250.
- Figura 8: Perfil de antígenos reconocidos por IgG en las tres cepas mexicanas de *A. marginale*.
- Figura 9: Perfil de antígenos IgG2 específicos en las tres cepas mexicanas de *A. marginale*.
- Figura 10: Antígenos IgG2 específicos en la cepa Méx-17 de *A. marginale*.
- Figura 11: Inmunoblot de las proteínas principales de superficie en la cepa Méx-17 de *A. marginale*.
- Figura 12: Antígenos IgG2 específicos en la cepa Méx-15 de *A. marginale*.
- Figura 13: Antígenos IgG1 e IgG2 específicos en la cepa Méx-30 de *A. marginale*.
- Figura 14: Reconocimiento diferencial de antígenos IgG1 e IgG2 específicos en la cepa Méx-17 por sueros de dos bovinos inmunizados.
- Figura 15: Un gel de poliacrilamida al 10% teñido con la técnica de plata después de enfoque isoeléctrico de antígenos de *A. marginale* (Méx-17).
- Figura 16: Inmunoblot de antígenos de *A. marginale* (Méx-17) separado por isoelectroenfoque.

## CAPÍTULO V

- Figura 17: Electroforesis de las fracciones No. 20 a 210 de proteínas de *A. marginale* (Méx-17) obtenidas por electroforesis de flujo continuo.
- Figura 18: Ensayo de inmunotransferencia de las fracciones No. 20 a 55 de proteínas de *A. marginale* (Méx-17) obtenidas por electroforesis de flujo continuo.
- Figura 19: Ensayo de inmunotransferencia de las fracciones No. 60 a 95 de proteínas de *A. marginale* (Méx-17) obtenidas por electroforesis de flujo continuo.
- Figura 20: Ensayo de inmunotransferencia de las fracciones No. 100 a 160 de proteínas de *A. marginale* (Méx-17) obtenidas por electroforesis de flujo continuo.
- Figura 21: Ensayo de inmunotransferencia de las fracciones No 165 a 225 de proteínas de *A. marginale* (Méx-17) obtenidas por electroforesis de flujo continuo.
- Figura 22: Índice de estimulación en células mononucleares de la sangre periférica estimuladas con las diferentes fracciones de proteínas de *A. marginale* (Méx-17).
- Figura 23: Análisis citométrico para linfocitos CD4+ en células mononucleares de la sangre periférica cultivadas de en presencia de la fracción No. 25 y los controles:





concanavalina A y proteína de glóbulos rojos no infectados.

Figura 24: Análisis citométrico para linfocitos tipo CD4+ en células mononucleares de la sangre periférica cultivadas de en presencia de las fracciones No. 30, 50, 85, 125 y 210.

Figura 25: Ensayo inmunoenzimático para la determinación de interferón gamma en sobrenadantes de células mononucleares cultivadas en presencia de fracciones de proteínas de *A. marginale* (Méx-17).

## LISTA DE GRÁFICAS

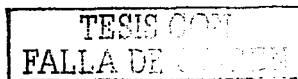
### CAPÍTULO IV

Gráfica 1: Cinética de IgG en dos grupos de bovinos inmunizados.

Gráfica 2: Cinética de la respuesta celular de células mononucleares de la sangre periférica.

Gráfica 3: Índices de estimulación promedio de células mononucleares de la sangre periférica provenientes de los bovinos inmunizados con Méx-17 en saponina cultivadas *in vitro* en presencia de extractos de cuatro cepas mexicanas de *A. marginale*.

Gráfica 4: Índices de estimulación de células mononucleares de la sangre periférica, provenientes de un bovino inmunizado, con Méx-17 cultivados *in vitro* 17 semanas



pos-inmunización en presencia de extractos de las cepas Méx-17 y Méx-31 de *A. marginale*.

- Gráfica 5: Índice de estimulación de células mononucleares de la sangre periférica de un bovino testigo en los periodos pre-inmunización y pos-inmunización.
- Gráfica 6: Índice de estimulación de células mononucleares de la sangre periférica de un bovino inmunizado en el periodo pre-inmunización y una semana después de la tercera inmunización.
- Gráfica 7: Valores de hematocrito promedio de dos grupos de bovinos inmunizados con el inmunógeno de *A. marginale* (Méx-17) y dos testigos durante el periodo pos-desafío.
- Gráfica 8: Valores de temperatura rectal promedio de dos grupos de bovinos inmunizados con el inmunógeno de *A. marginale* (Méx-17) y dos testigos durante el periodo pos-desafío.
- Gráfica 9: Valores de porcentaje de eritrocitos infectados promedio en dos grupos de bovinos inmunizados con el inmunógeno de *A. marginale* (Méx-17) y dos testigos durante el periodo pos-desafío.

## LISTA DE CUADROS.

### CAPÍTULO III

Cuadro 1: Datos clínicos de bovinos esplenectomizados utilizados para producción de sangre infectada con *A. marginale*.



#### CAPÍTULO IV

Cuadro II: Datos clínicos de bovinos inmunizados con inmunógeno de *A. marginale* en saponina y de un testigo durante el periodo pos-desafío.

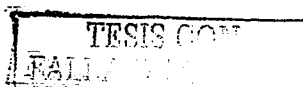
Cuadro III: Datos clínicos de bovinos inmunizados con inmunógeno de *A. marginale* en IMS 1313 y de un testigo durante el periodo pos-desafío.

Cuadro IV: Resumen de los datos clínicos de bovinos inmunizados con inmunógeno de *A. marginale* y los testigos durante el periodo pos-desafío.

Cuadro V: Índices de estimulación de células mononucleares de sangre periférica ensayadas *in vitro* contra las cepas Méx-17 y Méx-30 en los bovinos inmunizados y testigos en el periodo pos-desafío.

#### CAPÍTULO V

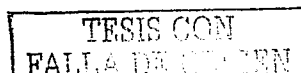
Cuadro VI: Densidades ópticas del ensayo inmunoenzimático para la determinación de interferón gamma en sobrenadantes de cultivo de células mononucleares cultivadas en presencia de fracciones de proteínas de *A. marginale* (Méx-17).



## RESUMEN

La vacunación sería el método de control más efectivo y económico para la anaplasmosis bovina pero no existen vacunas comerciales altamente eficaces todavía a nivel mundial. El desarrollo de vacunas de calidad superior a las actuales se puede lograr basándose en el entendimiento puntual de todos los mecanismos de protección contra esta enfermedad, en la identificación de antígenos capaces de estimular la respuesta inmune y en la caracterización de dichos mecanismos. Se ha reportado que la protección contra la anaplasmosis se basa en una respuesta de linfocitos Th1 en asociación con la producción del isotipo de anticuerpo opsonizante IgG2. La capacidad de los antígenos de *A. marginale* para estimular éste tipo de respuesta ha sido recientemente utilizada para identificar y caracterizar antígenos inmunoprotectores de esta rickettsia. Hasta ahora, se han reportado sólo tres proteínas de la membrana de *A. marginale* denominadas MSP-1, MSP-2 y MSP-3 con propiedades inmunoprotectoras pero altamente variables y otras dos considerablemente inmunoreactivas (MSP-4 y MSP-5) pero carentes de propiedades inmunoprotectoras. Para obtener antígenos para el estudio actual, se inocularon bovinos esplenectomizados vía intramuscular con sangre infectada equivalente a  $1 \times 10^8$  eritrocitos infectados de cada uno de los tres aislados estudiados. Sangre infectada en criopreservación se pasó en una serie de tres vaquillas esplenectomizadas y se exsanguinó la tercera de cada serie cuando la rickettsemia estaba en la fase logarítmica. Los datos obtenidos indican que en el tercer bovino, las cepas Méx-15, Méx-17 y Méx-30, respectivamente alcanzaron rickettsemias de 94%, 67% y 76%. Extractos de cada una de las tres cepas preparados de esta manera, separados en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio teñidos con Azul de Coomassie R-250 y en inmunoblots, contenían proteínas,

algunas altamente inmunogénicas. Para la cepa Méx-17, se demostró un total de hasta 17 bandas de proteína en un gel de poliacrilamida-SDS a 10% teñidos con Azul de Coomassie R-250 y en todas las cepas estudiadas se identificaron 13 antígenos inmunoreactivos en un inmunoblot. La purificación del inmunógeno para estos estudios, se llevó a cabo por centrifugación de la sangre infectada en solución salina de Puck pH. 7.4 por centrifugación en Percoll a 30% lo que disminuyó considerablemente la cantidad de membranas de los glóbulos rojos. Se concluye que, la inoculación de bovinos esplenectomizados sigue siendo un método práctico para producir antígeno de *A. marginale*. La calidad del antígeno fue suficiente para usar en varios estudios como los de inmunización de animales susceptibles y linfoproliferación *in vitro*. Para investigar la existencia de nuevos antígenos IgG2-específicos, capaces de estimular una respuesta celular *in vitro*, y presentes en los tres aislados mexicanos de *A. marginale* (Méx-15, Méx-17 y Méx-30), se estudiaron las respuestas humoral y celular en bovinos inmunizados con la cepa Méx-17 y desafiados 164 días después de la primera inmunización con la cepa Méx-30. El análisis de los sueros por ELISA y de los índices de estimulación *in vitro* de linfocitos de la sangre periférica cultivados en presencia de extractos de cada uno de los tres aislados, mostraron valores positivos en el periodo pos inmunización en los bovinos inmunizados en comparación con los testigos. Los valores del volumen celular aglomerado, rickettsemia y temperaturas rectales durante el desafío mostraron diferencias entre los bovinos inmunizados y los testigos. Al probarse por inmunotransferencia, los sueros pos-inmunización de bovinos inoculados reconocieron hasta 14 proteínas de peso molecular (PM) entre 15 a 209kDa de las cuales 12 fueron específicamente reconocidas por IgG2 en extractos de las tres cepas; Méx-17, Méx-15 y Méx-30. Se identificaron por lo menos 12 antígenos que inducen



una respuesta de IgG2 y reconocidas solo por animales inmunizados y protegidos. Estas proteínas incluyen; las MSP-1a, MSP-2 y MSP-5 ya reportadas y siete proteínas (PM 28, 33, 37, 50, 52, 56, 170 kDa) nunca antes publicadas en la literatura por su especificidad a IgG2. Al fraccionar estas proteínas por electroforesis en dos dimensiones (2-D), se mostró la presencia de proteínas novedosas ya demostradas por inmnotransferencia en inmunoblots de una dimensión excepto la Am52, Am56 y Am170, pero mostró una proteína adicional de 37 kDa que en una dimensión migraba junto con el MSP-2. La proteína altamente inmunoreactiva de aparente PM de 28 kDa se reveló en dos proteínas con distintos puntos isoelectricos y PM de 27 kDa y 28 kDa, de las cuales sólo la última fue reconocida por IgG2. Basado en estos datos, se concluye que las proteínas novedosas que mostraron especificidad de IgG2 jugaron un papel en la protección de bovinos inmunizados y siendo proteínas de *A. marginale* se nombran desde aquí en adelante: Am28, Am33, Am37, Am50, Am52, Am56 y Am170 respectivamente. Las letras "Am" corresponden a la especie *A. marginale* mientras que el número representa su aparente PM. Para estudiar la capacidad de inducir la respuesta de linfocitos CD4+ y la consecuente producción de gamma interferon, se fraccionó el inmunógeno de la cepa Méx-17 por electroforesis de flujo continuo y las fracciones obtenidas se probaron en geles de poliacrilamida teñido por la técnica de plata e inmnotransferencia para seleccionar los antígenos de interés de acuerdo con el PM de las proteínas anteriormente reconocidas por IgG2. Se cultivaron linfocitos *in vitro* en presencia de fracciones proteicas y se analizaron por el ensayo de proliferación (LP) *in vitro* y por el de citometría para evaluar la respuesta de células CD4+. De las nuevas proteínas, la de PM de 28 kDa mostró una respuesta positiva de LP *in vitro* comparable con la que dio el antígeno crudo de Méx-17 utilizado como control positivo. Además, los resultados de citometría no mostraron diferencias

significantes entre la señal de CD4+ en células estimuladas por fracciones de y extractos crudos de Méx-17 pero se detectaron cantidades de IFN- $\gamma$  en sobrenadantes de PBMC cultivado *in vitro* en presencia de las proteínas: Am28, Am37, y las proteínas de 75, 84, y 100 kDa. Basado en estos datos se concluye que las nuevas proteínas, especialmente Am28, son candidatos para desarrollar una vacuna recombinante o de subunidad. Antes de ser probadas *in vivo* se recomienda desarrollar herramientas inmunológicas y de biología molecular para purificarlas en cantidades suficientes que permitan estudios detallados y minuciosos en cuanto a sus características fisicoquímicas, su ubicación en el cuerpo inicial de *A. marginale* y sus funciones biológicas. Ésta última información fortalecerá los bases para el uso de las nuevas proteínas como vacunas contra la anaplasmosis.

## CAPITULO 1

### 1.0 INTRODUCCIÓN:

La anaplasmosis es una enfermedad infecciosa no contagiosa, de alta importancia en la ganadería, es causada por rickettsias del género *Anaplasma*. El agente causal es transmitido biológicamente por garrapatas y en algunos casos en forma mecánica e iatrogénica. La especie *Anaplasma marginale* fue descubierta como el agente causal de la anaplasmosis bovina en el año 1908 por Theiler en Sudáfrica (Theiler, 1910) y enseguida se descubrió *A. centrale* que es una especie relativamente menos virulenta y que Theiler erróneamente confundió con *A. marginale*. (Theiler, 1911).

La anaplasmosis causada por *A. marginale* en bovinos se caracteriza por una anemia severa, pérdida de peso, disminución en la producción de leche, ictericia y fiebre. Frecuentemente causa la muerte, en animales gestantes puede ocasionar abortos (Kuttler, 1984). Después de la enfermedad aguda, los animales pueden recuperarse pero quedan infectados de manera persistente y así fungen como reservorios de la enfermedad ya que las garrapatas u otros vectores mecánicos pueden alimentarse de la sangre de éstos animales y transmitir la rickettsia a otros hospederos susceptibles (Dickmans, 1950; Ewing, 1981).

La anaplasmosis bovina tiene un gran impacto económico en la producción de leche y carne a nivel mundial debido a las pérdidas de producción y la muerte asociadas con las manifestaciones clínicas.

La anaplasmosis causada por *A. marginale* es de distribución mundial, pero es de mayor importancia en las zonas tropicales y subtropicales (Ristic, 1980) incluyendo México (Trapaga y col., 1988). En México, sólo existe *A. marginale* (Trapaga y col., 1988) que desafortunadamente es la especie más patógena (Osorno y Ristic, 1977). La transmisión biológica de *Anaplasma* involucra varios

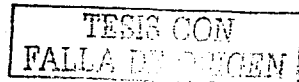




géneros de garrapatas ixódidas entre cuales se cuentan; *Boophilus spp.*, *Dermacentor spp.*, *Ixodes spp.*, *Rhipicephalus spp.* (Potgieter y col., 1983; Zaugg y col., 1986; Kocan, 1986). La transmisión puede ser en forma mecánica por insectos hematófagos como: mosca de establo (*Stomoxys calcitrans*), mosquitos del género *Siphona spp* y tábanos (Yeruham y Braverman, 1981) o en forma iatrogénica (Ristic, 1980) por el uso de instrumentos quirúrgicos no bien esterilizados. Se han documentado casos de transmisión vertical (Salabarría y Pino, 1988; Potgieter y van Rensburg, 1987) aunque se cree que ésta vía no es de gran importancia en términos epidemiológicos.

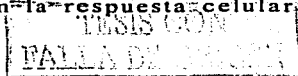
La anaplasmosis sigue siendo una de las enfermedades del ganado responsables por mayor mortalidad y pérdidas económicas en animales susceptibles a nivel mundial (Barnett, 1974) y en México se le considera responsable del 26% de la mortalidad total de los animales manejados en programas de mejoramiento genético por la industria aseguradora, y además se estima que fue responsable en el año 1980 por pérdidas de hasta 130 millones de dólares (Delegación Mexicana, 1981). Estas pérdidas ocurren por muertes, disminución en la producción de leche y carne, los abortos en bovinos gestantes, los gastos de tratamiento y la compra de pesticidas usados en el control de ectoparásitos vectores de ésta enfermedad. Los acaricidas usados para controlar los ectoparásitos también llevan el peligro de residuos tóxicos en la carne y leche de los animales tratados así como el ambiente. Todos estos factores han justificado que la investigación se dirija hacia métodos de control más adecuados, como la vacunación en la lucha contra esta enfermedad.

Desde los tiempos de Theiler (1912) se ha investigado en diferentes países del mundo la vacunación como un método para controlar la Anaplasmosis, pero una vacuna altamente eficaz, desafortunadamente no existe todavía. Uno de los primeros intentos de prevención contra la anaplasmosis se basaba en la premunización; es decir la



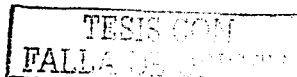
inoculación de bovinos con sangre infectada con cepas de campo de *A. marginale* seguido por tratamiento con tetraciclina, induciendo una protección inmunológica sólida. Otro método de vacunación fue iniciado por Theiler (1912) inoculando bovinos susceptibles con una cepa viva de *A. centrale*, la que normalmente induce una infección ligera asociada con una protección sólida. Este tipo de vacunas todavía se utilizan en países como Israel (Krigel y col., 1992), Australia, Sudáfrica, Argentina, Uruguay y algunos países del Caribe (Anon, 1984). Estas primeras vacunas tenían desventajas por la posibilidad de transmitir otras enfermedades como leucosis bovina (Rogers y col., 1988) y en el caso de la vacuna de *A. centrale* existe un riesgo de ocasionar una grave enfermedad clínica especialmente en zonas donde esta rickettsia es exótica; como es el caso de México. De hecho, el uso de este último tipo de vacuna no ha sido permitido en México por el temor de introducir esta cepa en el país cuya consecuencias podría ser graves (CONASA, 1995).

En estudios en diferentes países del mundo como EE.UU., México o Zimbabwe se han probado inmunógenos inactivados de cuerpos iniciales (CI) de *A. marginale*. Los CI se purifican a partir de sangre infectada y se utilizan como vacunas contra la anaplasmosis (Brock y col., 1965, McHardy y Simpson, 1973; Carson y col., 1976; Carson y col. 1977). Los inmunógenos de este tipo se pueden inactivar utilizando varios químicos aprobados como el glutaraldehído y la  $\beta$ -propiolactona. Por lo general, se ha reportado protección adecuada contra desafíos homólogos pero en la mayoría de los casos sólo protección parcial contra desafíos heterólogos. Otras desventajas con este tipo de vacunas son: dificultades en estandarizar la vacuna, y el problema de la contaminación con membranas de glóbulos rojos (GR), lo que puede ocasionar isoeritrolisis neonatal en algunos becerros nacidos de vacas vacunadas. Carson y col., (1977) fueron de los primeros investigadores que estudiaron la respuesta celular inducida



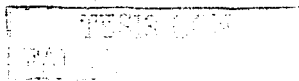
por este tipo de vacunas y desde entonces, otros investigadores las han probado en diferentes países del mundo. En México, los resultados del trabajo de Rodríguez y col., (1999) acerca de un inmunógeno inactivado de tres cepas mexicanas de *A. marginale* muestran una protección completa contra desafíos homólogos y protección parcial en el caso de desafíos heterólogos. En el pasado, en los Estados Unidos, se investigaron y comercializaron vacunas compuestas por CI de *A. marginale* (Brock y col., 1965; Hart y col., 1988; Hart y col., 1990; Montenegro-James y col., 1991) preparados a partir de sangre infectada proveniente de bovinos esplenectomizados. Las desventajas con estas vacunas fueron que eran costosas de producir, difícil de estandarizar, y estaban altamente contaminadas con membranas de GR. Con este tipo de vacunas, se ha observado también una protección significativa contra desafíos homólogos y una protección parcial contra desafíos heterólogos. El último caso se ha explicado en términos de la variación antigénica que existe entre las diferentes cepas de *A. marginale*, un fenómeno más marcado en cepas ampliamente separadas geográficamente, pero también existe variación antigénica entre aislados de la misma cepa (Barbet y col., 2000). La vacuna denominada Plazvax<sup>®</sup> fabricada en los EE.UU. fue probada en México bajo condiciones de campo por el grupo de Figueroa y col., (1997) pero los resultados mostraron que no inducía ninguna protección en bovinos desafiados con cepas locales. Considerando los numerosos problemas asociados con esta vacuna, finalmente fue retirada del mercado.

En otros países particularmente en los EE.UU. se han ensayado extractos de la membrana, de *A. marginale* como vacunas experimentales y se cuenta ahora con seis proteínas de la membrana llamadas Proteínas del complejo Mayor de Superficie (ó en inglés *Major Surface Proteins*; MSP: MSP-1a, MSP-1b, MSP-2, MSP-3, MSP-4, y MSP-5). Sólo los MSP-1a y 2 han mostrado protección



adecuada cuando se utilizaron como inmunógenos mientras que el MSP-3 mostró protección menor (Palmer y col., 1988; Palmer y col., 1989; Brown y col., 1998) en comparación con las dos anteriores. Además, la protección que inducen los inmunógenos de MSP-1, 2 y 3 es adecuada contra desafíos homólogos y sólo parcial en desafíos heterólogos. Las limitaciones para producir vacunas hechas de extractos de proteínas de la membrana de *A. marginale*, como la dificultad de producir vacunas a nivel comercial y el desconocimiento de otros antígenos inmunoprotectores, han resultado que la investigación se dirija hacia una vacuna recombinante. Para lograr esto ha sido justificable que se investiguen antígenos inmunoprotectores en cepas locales para que se las incluyan en dichas vacunas. El entendimiento de los mecanismos inmunoprotectores tanto como de todos los posibles antígenos responsables para la inmunoprotección serán el preámbulo para la elaboración de vacunas de eficacias superiores a las vacunas anteriormente descritas.

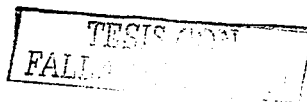
A pesar de que ya se conocen seis MSP hay una alta probabilidad de la existencia de proteínas o antígenos inmunoprotectores desconocidos. La evidencia se ha mostrado en varias publicaciones en las cuales se informan de un número variado de proteínas reconocidas por anticuerpos presentes en sueros hiperinmunes a *A. marginale* de bovinos vacunados. Barbet y col., (1983) utilizaron una técnica en la cual se marcaron radiactivamente las proteínas de *A. marginale* con <sup>35</sup>S-metionina y luego se las revelaron por isoelectroenfoque. De esta manera, estos investigadores documentaron, en cada una de las cepas de *A. marginale* Washington y Florida, la existencia de hasta 200 proteínas cuyos pesos moleculares (PM) se ubicaban entre 14-200 kDa. Desafortunadamente la comunidad científica que se dedica a la investigación de vacunas contra la anaplasmosis bovina ha ignorado el papel que juegan algunas de estas proteínas en la respuesta inmunoprotectora. Quizás esto se atribuye a la creencia de que las



MSP funcionarían como candidatos de vacuna por ser altamente inmunoreactivas.

No cabe duda de que el éxito en la elaboración de una vacuna debe de tomar en cuenta no solo los mecanismos de protección, sino también los antígenos inmunoprotectores que preferiblemente sean proteínas conservadas en la mayoría de las cepas mundiales de *A. marginale*. Esto por sí, significa que la investigación no solo debe de dirigirse hacia la identificación de antígenos inmunoprotectores sino también hacia el entendimiento de los mecanismos de cómo estos antígenos estimulan al sistema inmune de los bovinos. De lo que ya se sabe y dadas las características del agente causal, se cree que la protección inmunogénica en la anaplasmosis bovina está asociada con una respuesta de células T cooperadoras de tipo 1 (Th1) que se asocian con la producción de citocinas como Interleucina-12 (IL-12), Interleucina-2 (IL-2), Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y la producción de una inmunoglobulina de isotipo IgG2 (Brown y col., 1998). En este mecanismo, se considera que los macrófagos activados llevan a cabo la resolución de la infección a través de la fagocitosis. Los mismos investigadores han llevado a cabo estudios en los cuales han mostrado la asociación de células Th1 y protección parcial cuando utilizaron MSP-1 como agente vacunal (Palmer y col., 1989) mientras que, el mismo grupo (Palmer y col., 1988) había anteriormente mostrado lo mismo con la MSP-2. En sus conclusiones relacionadas al trabajo de las MSP como agentes vacunales, Brown y col., (1998) mencionan que deben de existir otras proteínas inmunoprotectoras todavía no caracterizadas en cepas diferentes de *A. marginale*.

En México, la anaplasmosis es endémica y para su control se ha intentado importar vacunas desde los EE.UU. para controlar la enfermedad. Estas vacunas extranjeras como *Plazvax*® no han mostrados protección adecuada contra desafíos heterólogos de cepas mexicanas de *A. marginale* (Figuroa y col., 1997); muy



probablemente por las diferencias antigénicas que existen entre las cepas vacunales y las prevalentes de México. Esto ha justificando esfuerzos científicos en México hacia la investigación de cepas de origen regional y el desarrollo de vacunas a partir de las mismas.

Este trabajo se basó entonces en la hipótesis de que:

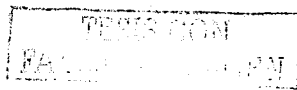
Se ha estudiado solo seis proteínas de la membrana (MSP) de *A. marginale* y tres de ellas (MSP-1, MSP-2 y MSP-3) tienen propiedades protectoras contra desafíos homólogos. Se espera que existen nuevos antígenos de *A. marginale* capaces de inducir protección en bovinos inoculados con un inmunógeno inactivado de CI de *A. marginale* y esta inmunidad se basa en los mecanismos celulares mediados por las células Th1 (producción de IFN- $\gamma$  e IgG2).

Objetivos:

Se diseñó este estudio para identificar nuevos antígenos derivados de los cuerpos iniciales de tres cepas mexicanas de *A. marginale* (Méz-15, Méz-17 y Méz-30) y caracterizar la respuesta protectora de linfocitos Th1 en bovinos inmunizados con un inmunógeno inactivado;

Los objetivos específicos de este estudio fueron;

1. Evaluar la protección de bovinos inmunizados con un inmunógeno inactivado de *A. marginale* y desafiados con una cepa heteróloga.
2. Probar la capacidad de cuerpos iniciales de *A. marginale* para inducir una respuesta humoral de IgG y una respuesta celular *in vitro* en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de bovinos inmunizados.



3. Identificar por inmunoelectrotransferencia antígenos IgG2 específicos presentes en los tres aislados mexicanos de *A. marginale*, y determinar cuales de éstos son las MSP ya publicadas y cuales son antígenos nuevos capaces de estimular una respuesta inmunoprotectora en bovinos vacunados y desafiados.
4. Probar la capacidad *in vitro* de los nuevos antígenos IgG2 específicos para inducir proliferación de linfocitos CD4+ y la producción de IFN- $\gamma$ .

TESIS CON  
FALLA DE CALIDAD

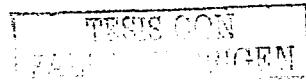
## CAPITULO II

### **2.0 REVISIÓN DE LITERATURA:**

#### **2.1 Definición y patogénesis de la enfermedad:**

La anaplasmosis bovina es una enfermedad hemoparasítica, infecciosa no contagiosa causada en bovinos por la rickettsia *Anaplasma marginale*, la que pertenece al *genogrupo II* de las erlichias en el orden *Rickettsiales* y la familia *Anaplasmataceae* (Ristic y Kreir, 1984; Dumler y col., 2001). El agente causal es biologicamente transmitido por garrapatas ixódidas de varios géneros pero también se puede transmitir iatrogénicamente por instrumentos quirúrgicos no esterilizados y mecánicamente por insectos hematófagos.

La especie *A. marginale* es la más patógena y, al igual que la otra especie menos patógena de *A. centrale* tienen al eritrocito como el único sitio para desarrollarse (Ristic y Watrach, 1963), característica que les hace ocasionar una anemia grave en los casos clínicos de la enfermedad. La anaplasmosis se caracteriza por anemia severa, fiebre, ictericia, anorexia, pérdida de peso corporal, disminución en producción de leche y la muerte puesto que se ha informado una mortalidad de hasta 34% de los casos (Alderink y Dietrich, 1981). Clínicamente, la anaplasmosis se puede presentar desde la forma hiperaguda asociada con la muerte casi inmediata a la infección, hasta la forma crónica. Es en la presentación aguda en la que se observan con mayor claridad los signos clásicos de la enfermedad. Después de que la rickettsia entra en el bovino, inicia su multiplicación y,





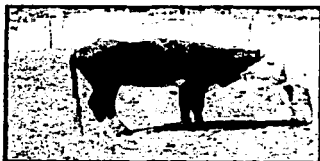
**Figura 1: La manifestación clínica de la anaplasmosis bovina:**



a



b



c

**LEYENDA:** a) aborto, b) muerte y c) caquexia severa por una infección experimental de anaplasmosis.

durante los siguientes 15 a 45 días los bovinos no muestran signos clínicos de la enfermedad. La rickettsemia, representada como el número de GR infectados (en porcentaje), se inicia en forma discreta, en ausencia de fiebre, posteriormente, en un periodo muy corto se inicia la destrucción acelerada de los eritrocitos. Éste periodo coincide con la mayor multiplicación de la rickettsia y con el aumento de la temperatura rectal (Tr) mayor de 40°C. Alrededor de este tiempo, se empiezan a manifestar los signos clínicos de la enfermedad como; debilidad, anorexia, deshidratación, pérdida de peso, disminución de producción láctea e ictericia. Los animales sobrevivientes tardan varios meses en recuperar su peso y producción



inicial y se convierten en los principales portadores de la rickettsia. La pérdida de peso se atribuye parcialmente a los efectos de la citosina factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) una de las citosinas proinflamatoria liberadas por parte de los macrófagos activado durante el transcurso de esta enfermedad. Durante el periodo crónico de la infección se han observado variaciones submicroscópicas en el número de eritrocitos infectados. Estas variaciones se han atribuido a ciclos de variaciones antigénicas que se presentan durante la etapa crónica, en estos ciclos al menos participan las proteínas variables del superficie MSP-2 y MSP-3 codificada por los genes *mSP2* y *mSP3* (Alleman y col., 1997; French y col., 1999).

La anemia, que es una característica típica de la anaplasmosis bovina es ocasionada por la destrucción extravascular de los eritrocitos en el bazo por parte de los macrófagos activados y esta destrucción se asocia con ictericia en ausencia de hemoglobinemia y hemoglobunuria. Es interesante que se ha observado que la destrucción de eritrocitos totales es mayor al porcentaje de eritrocitos infectados; este hecho se ha explicado como un fenómeno autoinmune; sin embargo se ha discutido la posibilidad de que algunos factores que intervienen en la respuesta inmune, como el óxido nítrico producido por macrófagos activados, también participan en el proceso patogénico. Al respecto de los mecanismos autoinmunes en relación al desarrollo de anemia, Mann y Ristic (1963) reportaron la presencia de anticuerpos autoinmunes en el superficie de eritrocitos infectados tanto como eritrocitos no infectados y en los sueros de animales infectado por *A. marginale*. Se cree que estos anticuerpos contribuyen a la destrucción de los GR mediante la activación del complemento.

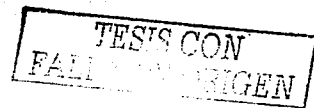


## **2.2 Clasificación:**

*A. marginale* pertenece a un grupo de bacterias cocoides, pequeñas, Gram negativas y parásitos obligados intracelulares que infectan células eucarióticas (Dumler y col., 2001) y se replican en la célula hospedera dentro de lo que se ha denominada vacuola parasitófora (Rikihisa, 1991); un órgano delimitado por una membrana derivada de la célula hospedera. Notablemente, todos los miembros de la familia *Anaplasmataceae*, tienen la propiedad de infectar y replicarse en el hospedero vertebrado específicamente en células derivadas de tejidos del mesodermo particularmente en las células hemopoyéticas (Rikihisa, 1991; Barbet, 1995; Logan y col. 1987). En el caso de *A. marginale*, la única célula hospedera en el vertebrado son los glóbulos rojos de bovinos (Ristic y Watrach, 1963).

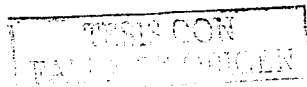
Este grupo de patógenos infecciosos empezó a ser conocido después del descubrimiento de *A. marginale* por Theiler en el año 1908 (Theiler, 1910), el que le dió ese nombre basándose en la ubicación de los cuerpos de inclusión de la rickettsia en la parte periférica del glóbulo rojo infectado. Cuatro años después, el mismo investigador descubrió la otra especie *A. centrale* (Theiler, 1911) cuya ubicación en el glóbulo rojo infectado era más central en comparación con *A. marginale*. Sin embargo, los médicos veterinarios, Smith y Kilborne (1893) habían investigado casos clínicos de anaplasmosis en Texas, EE.UU., los cuales erróneamente confundieron como una etapa de la babesiosis (ó la fiebre de Texas) basándose en la apariencia de CI de *Anaplasma marginale* que vieron en frotis teñidos con colorante de Giemsa.

Según la clasificación en el *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey* citada por Ristic y Kreir, (1984), la clasificación del genero *Anaplasma spp* se podría resumir:



Reino	Procariotes
División	Gracilicutes
Clase	Scotobacteria
Orden	Rickettsiales
Familia	Anaplasmataceae
Género	<u>Anaplasma</u>
Especies	<i>A. marginale</i> <i>A. centrale</i> <i>A. caudatum</i> <i>A. ovis</i>

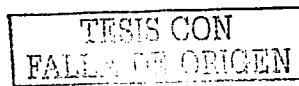
Hasta el año 2000, al género *Anaplasma spp* pertenecían las rickettsias intra-eritrocíticas: *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis* y *A. caudatum* (Ristic y Kreir, 1984). Desde que se publicó esta clasificación en el *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey*, se han hecho más estudios taxonómicos para reclasificar las rickettsias dentro del orden *Rickettsiales*. La clasificación más reciente fue publicada por Dumler y col., (2001) y se llevó a cabo basándose en los protocolos descritos por Weisburg y col., (1989), que utilizando técnicas moleculares, encontraron similitudes en las secuencias de DNA en el gen de la subunidad ribosomal 16S corroboradas por análisis del patrón antigénico y el análisis de la literatura acerca de la ecología y distribución geográfica de estas rickettsias. Considerando las propiedades genéticas de estas rickettsias, Dumler y col., (2001) reclasificaron el género *Anaplasma spp* para incluir las especies: *A. marginale*, *A. centrale*, *A. caudatum*, *A. ovis*, *A. bovis*, *A. platys* y *A. phagocytophila* [sinónimo también con *A. equi*, y el agente del ehrlichiosis granulocítica humana (HGE)]. Un resultado espectacular de esta publicación, fue la re-clasificación de la rickettsia; *Ehrlichia phagocytophila* como *Anaplasma phagocytophila* dado que la similitud en el gen de RNA 16S de esta rickettsia era de



un mínimo de 96.1% en comparación con otros miembros del género *Anaplasma spp.* Según esta nueva clasificación, las especies *A. phagocytophila*, *E. equi* y el agente responsable para la ehrlichiosis granulocítica humana se consideran como una misma especie debido a que la similitud en los nucleótidos del gen 16S RNA en estas tres especies es de 98.2%. Según los mismos investigadores, la re-clasificación de las rickettsias dentro del género *Anaplasma spp* basada en similitudes del gen del rRNA 16S y las del patrón antigénico de estas rickettsias, se ha mostrado una similitud en los nucleótidos del gen 16S RNA de 99.1% entre las especies de; *A. marginale*, *A. ovis*, *A. centrale* y *A. phagocytophila*.

### **2.3 Morfología:**

*A. marginale* es una rickettsia alargada, esférica, cocoide u oval de 0.2 a 1.0 micras de diámetro (Hugh-Jones y col., 1988) aproximadamente veinte veces mas pequeña que la célula que infecta, el eritrocito bovino. Celularmente, *Anaplasma spp* se caracterizan como todas las rickettsias, por no tener su cromatina organizada en un núcleo con membrana limitante y por carecer de retículo endoplásmico. Dentro del eritrocito infectado, *A. marginale* aparece como cuerpos de inclusión en la región periférica ó central del eritrocito. Un eritrocito infectado puede tener de 1 a 8 cuerpos iniciales (Sieber, 1910; Theiler, 1910) los cuales pueden estar organizados en un cuerpo de inclusión. Las especies de *Anaplasma* son Gram negativas y en frotis delgados de sangre periférica los CI de *Anaplasma spp* se tiñen con color azul-morado. En el microscopio electrónico, los CI son electrodensos y muestran una estructura interna de cuerpos redondos cuya parte central es menos densa. En otros estudios se han reportado que algunas especies de *Anaplasma spp* tienen colas que están hecha de materias proteicas (Kreir y Ristic, 1963; Kocan y col., 1978; Kocan y col., 1984).

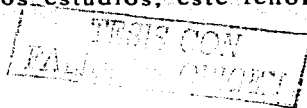


## **2.4 Transmisión:**

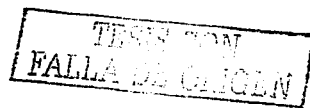
### **2.4.1 Transmisión biológica y ciclo biológico:**

Smith y Kilborne (1893) fueron los primeros investigadores que descubrieron el papel de las garrapatas como vectores de enfermedad del ganado cuando establecieron la transmisión de *Babesia spp* en bovinos por garrapatas. Por lo general, este grupo de ectoparásitos es responsable para la transmisión biológica de enfermedades de ganado como la babesiosis, la cowdriosis, la teileriosis y la anaplasmosis cuyas consecuencias económicas al nivel mundial es una catástrofe. Con respecto a la anaplasmosis, varios investigadores han mostrado el papel de varias especies de garrapatas ixódidas involucradas en esta forma de transmisión particularmente las siguientes especies; *Boophilus microplus*, *B. decoloratus*, *B. annulatus*, *Rhipicephalus simus*, *R. bursa*, *Ixodes ricinus*, *Hyalomma lusitanicum*, *Dermacentor variabilis*, *D. andersoni*, *D. occidentalis* (Sieber, 1990; Ristic, 1968; Yeruham y Braverman, 1981, Zaugg y col., 1986). Estudios epizootiológicos indican que *B. microplus* es un vector importante de la anaplasmosis en Australia y en muchos países sudamericanos (Seddon, 1952; Uilenberg, 1968; Corrier y col., 1983) mientras que en un estudio realizado en Israel, Samish y col. (1993) reportan transmisión trans-estadial de la anaplasmosis por la especie *B. annulatus*. En México el vector biológico principal es la garrapata *B. microplus* y se encuentra en las zonas tropicales y subtropicales del territorio nacional (Trappaga y col. 1988).

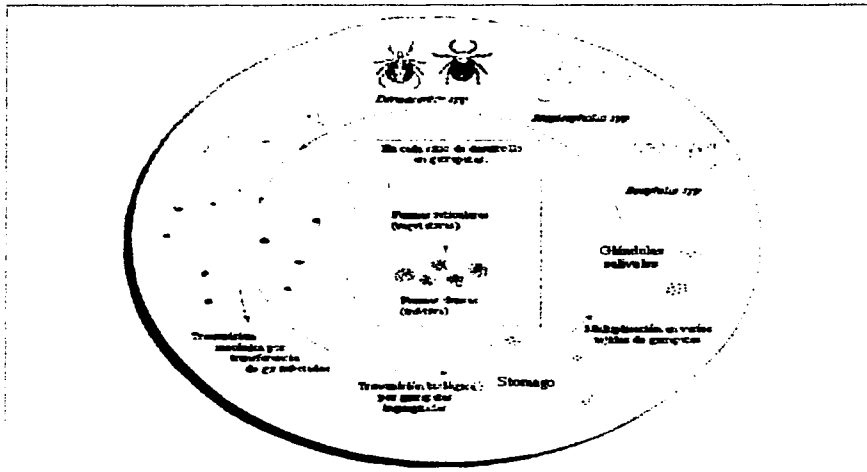
El grupo de Kocan y col., (1992a&b) ha realizado estudios acerca la garrapata *D. andersoni* y reportan que como un vector biológico este ectoparásito puede transmitir la anaplasmosis seis días después de alimentación en un bovino infectado con *A. marginale*. En este mismo y otros estudios, se mencionan que las garrapatas machos son más eficientes para transmitir la enfermedad que las hembras (Kocan y col. 1992a&b; Ge y col. 1996). Según estos estudios, éste fenómeno



se debe a la infección generalizada y persistente de la rickettsia, muy característica en garrapatas machos en comparación con las hembras de esta especie. Además de ésta observación, se ha notado que la transmisión intra-estadial es un mecanismo importante en los machos de la garrapata *D. andersoni* ya que adquieren la infección tras un corto periodo de alimentación en un bovino infectado y transmiten la rickettsia de manera repetitiva a múltiples hospederos bovinos. Considerando estas características de la garrapata *D. andersoni*, los machos se consideran un reservorio importante en la epizootiología de la anaplasmosis donde existe esta especie.



**Figura ii: Ciclo biológico de *A. marginale*:**



**LEYENDA: Citado de Parasitology Today, 1999. Vol. No. 15(169).**

La transmisión biológica de *A. marginale* involucra una etapa de multiplicación y de desarrollo de la rickettsia en varios tejidos de la garrapata los que incluyen; las células epiteliales de la parte media del estómago (Stiller y col., 1989; Kocan y col.1992a&b), células musculares, el hemocele y las glándulas salivales. La transmisión ocurre cuando la garrapata se alimenta de un animal susceptible (Kocan, 1986; Kocan y col., 1992a&b Ge y col., 1996). Al ser introducidos en la sangre de un bovino susceptible, los CI de *Anaplasma marginale* rápidamente invaden los eritrocitos maduros. El proceso de la invasión del GR involucra un mecanismo en el cual ciertos receptores en la superficie del eritrocito y otros en la



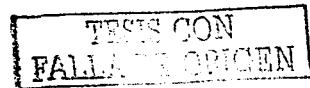
membrana externa de la *A. marginale* permiten que la rickettsia penetre la membrana plasmática de la futura célula hospedera. Una vez en el interior del eritrocito, los CI, se multiplican por bipartición hasta alcanzar un número entre 2 y 8 CI agrupados en un cuerpo de inclusión. Posteriormente, el cuerpo de inclusión libera los CI que invaden y se multiplican secuencialmente en nuevos eritrocitos (Losos, 1986) hasta alcanzar altos porcentajes de GR infectados. De esta manera, las garrapatas pueden transmitir *Anaplasma spp* de la sangre infectada a otro bovino susceptible cumpliendo el ciclo biológico de la rickettsia.

#### **2.4.2 Transmisión mecánica:**

La transmisión mecánica ocurre por las picaduras de insectos hematófagos como; moscas de establo (*Stomoxys calcitrans*), mosca del cuerno (*Haematobia irritans*), los tábanos (*Tabanus fasicatus*, *T. atratus*, *T. abacator*, *T. equilis* y *T. erithraetus*) y mosquitos de los géneros *Psorophora spp* y *Aedes spp*. (Brock y col., 1965; Lotze, 1944; Howell, 1957; Yeruman y Braverman, 1981). Se le considera como transmisión mecánica porque no se ha demostrado una etapa de multiplicación ó replicación de *Anaplasma spp* en tejidos de las moscas (Ristic, 1968). En esta forma de transmisión, la eficiencia depende del tiempo entre la interrupción de alimentación de una mosca y la próxima alimentación.

#### **2.4.3 Transmisión iatrogénica:**

Esta puede ocurrir durante manipulaciones quirúrgicas como vacunaciones, castraciones, descornes (Dickmans, 1950) cuando los utensilios no han sido esterilizado adecuadamente. Se puede incluir la transmisión experimental que se logra por inoculación via intravenosa, intramuscular, subcutánea (Marktl, 1990; Stoger, 1990) bajo la transmisión iatrogénica. Interesantemente éstos últimos



autores reportan la transmisión vía oral bajo condiciones experimentales.

#### **2.4.4 Transmisión Vertical:**

Algunos investigadores han reportado la transmisión *in útero* de la anaplasmosis. En un estudio realizado en Sudáfrica, Potgieter y Rensburg, (1987) reportan una prevalencia de 15.6% de infecciones neonatales de *Anaplasma* por transmisión *in útero*, en becerros cuyas madres tenían anaplasmosis. En otro estudio hecho en Cuba, Salabarría y Pino (1988) reportan una alta incidencia de 86.4% de CI de *A. marginale* en sangre de un grupo de 37 terneras hijas de vacas que estuvieron afectadas por anaplasmosis clínica durante el tiempo de gestación, aunque las parasitemias eran menos de 1% en todos los casos. Aún cuando la transmisión vertical de *A. marginale* ha sido demostrada por numerosos investigadores, no ha sido considerada de importancia epizootológica (Ristic, 1960; Dalgliesh, 1984).

### **2.5 Epidemiología e Importancia económica:**

#### **2.5.1 Distribución:**

##### **2.5.1.1 Prevalencia de la anaplasmosis a nivel mundial:**

La anaplasmosis es de distribución mundial y es más importante en zonas tropicales y sub-tropicales aunque también se localiza en zonas templadas (Callow, 1976). La anaplasmosis se encuentra en regiones diferentes del mundo abarcando varios países en África, Asia, Australia, medio Oriente, partes de Estados Unidos, México, Sudamérica y Centroamérica.

Jorgensen y col. (1992) estudiaron la sero-prevalencia de la anaplasmosis en zonas climatológicas diferentes de Sri Lanka y reportaron diferencia en las seroprevalencias con cifras hasta de 98% para las zonas de mucha lluvia y menos en zonas secas. En un estudio seroepidemiológico realizado en la zona centro-occidental de



Venezuela, James y col., (1985) utilizaron las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y aglutinación en latex para estudiar las seroprevalencias de anaplasmosis en bovinos de varias edades y razas y registraron prevalencias de 57.7% y 48.6% respectivamente. En Zimbabwe se reportó una seroprevalencia de 50 y hasta 75% (Norval y col., 1984) mientras que, en un estudio abarcando un periodo de 1980 al 1983 en el estado de Idaho en los EE.UU. se reportó una prevalencia del 31% al 37% (Maas y col., 1986). Anteriormente una seroprevalencia de 60% fue registrada en el estado de Oregon (Peterson, 1983) basado en el análisis de datos de fijación del complemento (FC) realizado con sueros de bovinos del estado. Según los resultados de este estudio, la distribución de esta enfermedad estaba asociada a la distribución de las garrapatas vectores *D. andersoni* y *D. occidentalis* la cual variaba en las diferentes zonas climatológicas del estado con diferentes tipos de vegetación. El área del estudio cuenta también con presencia de otra garrapata *Ixodes pacificus*. En el mismo estudio, se reporta que la prevalencia de la anaplasmosis era mayor en ranchos de carne que en los de producción de leche en el estado de Oregon.

La distribución de la anaplasmosis además de estar relacionada con la distribución de las garrapatas vectores es complicada por presencia de animales silvestres como el venado (*Odocoileus hemionus hemionus*) que fungen como reservorios en el caso de los estados de Idaho y de Oregon en los EE UU (McCallon, 1976), el búfalo, la jirafa y un número de antílopes (Potgieter y Stoltz 1994) y la gacela (*Taurotragus oryx*) Ngeranwa y col., (1997) en Sudáfrica. Las garrapatas mantienen la transmisión entre los reservorios silvestres y los bovinos susceptibles.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **2.5.1.2 Prevalencia de la anaplasmosis en México:**

En México, la anaplasmosis es por lo general endémica (Trápaga y col., 1988) con mayor incidencia en zonas tropicales y subtropicales (Fragoso, 1991) en relación directa con la presencia de los vectores artrópodos en esas regiones. Dentro de las zonas donde la anaplasmosis es endémica se encuentra el estado de Veracruz donde se han realizado varios estudios seroepidemiológicos en los municipios del centro y del sur del estado registrando prevalencias del 35 al 86% (López y col., 1983; Ramírez y col., 1984). En un estudio realizado en la parte norte de Veracruz por Cossío-Bayugar y col., (1997), usando la técnica de Fijación del complemento (FC) y la de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se registraron prevalencias de 54.6% y 69.2% respectivamente en bovinos de varias edades. La enfermedad es de alta prevalencia también en otros estados con similares condiciones climatológicas como; Tamaulipas, Chiapas, Guerrero y Puebla (López y col., 1984; Fragoso y Millán, 1983; Paniagua y Sánchez, 1992, López y col., 1981, López y col., 1984). En el caso de Tamaulipas, resultados del ensayo de FC dieron seroprevalencias de 16.7% en bovinos de 37 meses en adelante y seroprevalencia de 15.8% en los de 25 a 36 meses de edad. Considerando todas las edades en general la prevalencia era de 11.11% (López y col., 1984). En 1985, los mismos autores realizaron una investigación en el municipio de Villa Comaltitlán, Chiapas y reportaron una seroprevalencia de 33.6% en todos los bovinos muestreados. Fragoso y Millán (1983) reportan una seroprevalencia de 78.9% en el estado de Guerrero mientras que en un trabajo más reciente Nochebuena y col., (1993) mencionan una seroprevalencia general de 42.3% en el mismo estado.



### **2.5.2 Importancia económica:**

La anaplasmosis es de gran importancia económica en el mundo, representando uno de los mayores obstáculos para la producción de carne y leche en regiones tropicales y subtropicales. En estas zonas, los productores pierden dinero a través de tratamientos y acaricidas muy costosos, muertes, pérdidas de peso (carne) y disminución de producción de leche en animales enfermos. Esta pérdida a nivel mundial es incalculable pero en casos individuales de algunos países, particularmente los EE.UU. se han realizado estudios acerca de la economía de la enfermedad. Se mencionan en un estudio basado en cuestionarios en el estado de Texas de los EE.UU., pérdidas por la anaplasmosis por 10 millones de dólares en el año de 1968 (Vaughn y col., 1973) mientras que en el estado de California del mismo país se estimaron pérdidas de hasta 5,244,318 dólares en el año 1976 (Goodger y col., 1979). En el estudio de Texas por Alderink y Dietrich (1981), se menciona que además de las pérdidas por muerte (en cual 39.5% de los bovinos estudiados murieron), también son importantes las pérdidas de peso en animales sobrevivientes de la infección (promedio pérdida de peso corporal de 86kg) y abortos en 26.8% de los animales gestantes estudiados. Según el análisis de los resultados de este estudio, el promedio de los costos de tratamiento de un caso clínico de anaplasmosis era de \$ 65.44 dólares y esta cantidad incluye los costos de los medicamentos y honorarios del médico veterinario. Los mismos autores estiman que las pérdidas por gastos en acaricidas fueron de \$2.88 por animal anual en comparación a la vacunación a un costo \$1.73 anual por cada animal.

En los EE.UU. se estima que las pérdidas anuales por la anaplasmosis son de orden de 100 millones de dólares en todo el país (McCallon, 1973) mientras que en un estudio realizado en México en 1980 se estimaron pérdidas en el orden de tres mil millones de pesos mexicanos (Delegación Mexicana, 1981).

RECIBIDO  
11

### **2.5.3 Susceptibilidad de razas de bovinos:**

Se han realizado varios estudios para investigar si hay diferencias en la susceptibilidad a la anaplasmosis entre las razas de *Bos taurus* y de *Bos indicus* y los resultados han sido variables. Varios investigadores han reportado más susceptibilidad a la anaplasmosis en las razas *Bos taurus* en comparación con las razas *Bos indicus* (Rogers y col., 1978.; Parker y col., 1985; Bock et al. 1997) pero en la mayoría de los estudios de este tipo se concluye que las dos especies de bovinos son igualmente susceptibles a esta enfermedad. En estudios realizado en Australia por Wilson y col., (1980) y otros realizado por Otim y col., (1980) se mostró que no habian diferencias en susceptibilidad entre las dos especies. Sin embargo, las razas de *Bos indicus* son relativamente resistentes a la infestación masiva por garrapatas lo que ocasiona una errónea apreciación de que son resistentes a la anaplasmosis (Osorno y Ristic, 1977; Otim y col., 1980).

### **2.5.4 Susceptibilidad por edad:**

Los becerros son más resistentes que los animales adultos (Jones y col., 1968; Lotze, 1947) con un aumento en susceptibilidad arriba de 3 años de edad. Ésto puede deberse a anticuerpos, en la mayoría de los casos de tipo IgG1, que son transferidos de la madre al becerro en calostro aunque en experimentos controlados en las cuales se han desafiados becerros no se ha mostrado un efecto protector por anticuerpos calostrales (Zaugg y Kuttler, 1984). Lotze (1947) explica la resistencia en animales jóvenes en términos de la capacidad superior que tienen para producir glóbulos rojos en comparación a los animales adultos.

## **2.6 Vacunación contra la anaplasmosis:**

La primera vacuna contra la anaplasmosis fue desarrollada por Theiler en 1912, que demostró por primera vez la protección cruzada que presentaban los aislados de *A. centrale* en confrontaciones con *A. marginale* (Theiler, 1912). Desde entonces, ha habido esfuerzos por parte de varios investigadores en diferentes partes del mundo hacia la elaboración de una vacuna eficaz pero todavía no se cuenta con una vacuna universal contra esta enfermedad.

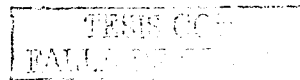
### **2.6.1 Premunización con *A. marginale***

#### **2.6.1.1 Premunización con una cepa virulenta de *A. marginale*:**

Este tipo de vacunas se basa en la inoculación de bovinos susceptibles con sangre infectada con una cepa viva y virulenta de *A. marginale* seguido por tratamiento de los animales con tetraciclinas cuando la infección se inicia para prevenir la presentación de signos clínicos en forma más severa. Este método conlleva el riesgo de transmitir otros patógenos como el virus de leucosis bovina (Rogers y col., 1988) y también hace difícil la estandarización de la dosis.

#### **2.6.1.2 Premunización con una cepa atenuada de *A. marginale*:**

Se ha investigado el uso de cepas atenuadas de *A. marginale* en vacunas experimentales contra la anaplasmosis (Ristic y Carson, 1977). Los métodos de atenuación utilizados han sido la irradiación de *A. marginale* virulenta con una dosis de rayos gamma y la selección de una cepa no virulenta de *A. marginale* mediante la inoculación seriada de *A. marginale* irradiado adaptada en dos venados esplenectomizados y un número dado de ovinos. Este tipo de vacuna ha mostrado protección confiable en animales jóvenes (Ristic y col., 1968; Ristic y Carson, 1977) pero puede inducir en animales adultos, abortos, cuadros clínicos agudos y mortalidad (Henry y col., 1983); ante estas circunstancias no se ha vuelto a utilizar.



### **2.6.2 Premunización con *A. centrale*:**

En el trabajo de Theiler (1912) se mostró la capacidad de protección cruzada que presentaba *A. centrale* contra infecciones con *A. marginale*. A partir de entonces se ha utilizado una cepa de *A. centrale* de origen sudafricana en diferentes lugares del mundo (Potgieter, 1979). Entre los países donde se ha utilizado este tipo de vacuna están: Israel (Pipano, 1986), Australia (Rogers y Shiels, 1979), Sudáfrica (Potgieter, 1979), Uruguay (Nari y col. 1979), Malawi (Tjornhoj y col. 1997) y muy recientemente en Zimbabwe (Turton y col. 1998). Este tipo de vacuna no se ha utilizado en México donde la especie *A. centrale* no ha sido reportada y de hecho se le considera exótica y para evitar la posibilidad de introducir patógenos emergentes en el país no se permite su uso como un agente vacunal (CONASA, 1995). Theiler (1912) estableció que la vacuna basada en la inoculación con *A. centrale* no previene completamente la infección de *A. marginale* en bovinos vacunados sino que da protección que reduce notablemente la rickettsemia y la severidad de los signos clínicos en comparación a los controles. Varios científicos se han dedicado a estudiar el mecanismo de la inmunoprotección inducida por esta vacuna. Se sabe que la cepa vacunal de *A. centrale* al inocularse en los bovinos produce una infección ligera seguida por una infección persistente y sub-clínica de *A. centrale* (Krigel y col., 1992). Estos investigadores reportan resultados de un experimento en el cual transmitieron *A. centrale* a bovinos esplenectomizados por la inoculación de sangre de bovinos que habían sido vacunado de tres a cinco y medio años anteriormente. Molloy y col., (2000) reportan la detección de anticuerpos específicos de *A. centrale* en bovinos que habían sido vacunados con una cepa Sudafricana de *A. centrale* nueve años antes. Estos investigadores desarrollaron un ensayo enzimático basado en un anticuerpo monoclonal específico al antígeno de *A. centrale* de PM de 116 kDa para detectar bovinos persistentemente

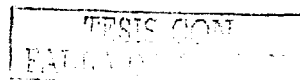
TESIS CON  
FALLA DE CALIDAD



infectados con la cepa vacunal de *A. centrale* algo importante para diferenciar animales vacunados con esta cepa y los verdaderamente infectados con *A. marginale* ya que la diferencia entre las dos cepas no es fácil debido a las similitudes en frotis teñido con el colorante de Giemsa. Recientemente, Shkap y col., (2002) reportaron que la protección de *A. centrale* contra desafíos de *A. marginale* se basa en epítomos conservados CD4+ en los extremos carboxílico y amino de los variantes de antígenos codificados por el gene multifamiliar de *msp-2*. Este gene existe en las dos especies de *Anaplasma* y esto explica muy claramente la respuesta de memoria inducida por un desafío de *A. marginale* en bovinos previamente vacunados con la cepa vacunal de *A. centrale*.

### **2.6.3 Vacunas inactivadas de *A. marginale*:**

Uno de los primeros estudios para investigar el uso de vacunas inactivadas contra *A. marginale* fue hecho por Carson y col., (1977) quienes compararon la respuesta inmunoprotectora en tres grupos de bovinos; uno vacunado con un inmunógeno vivo de cepa virulenta de *A. marginale*, el segundo con inmunógeno atenuado y el tercero con inmunógeno inactivado de *A. marginale* con un adyuvante oleoso. Aunque los primeros dos inmunógenos mostraron una respuesta celular asociada con una protección *in vivo* superior al del inmunógeno inactivado, el último inmunógeno mostró una reducción en el grado de anemia cuando se desafiaron los bovinos inmunizados con una cepa virulenta de *A. marginale*. La vacuna Anaplaz<sup>®</sup> (Forte Dodge Laboratories, Forte Dodge, IA) elaborada en EE.UU. estaba basada en un inmunógeno inactivado de *A. marginale* de origen de glóbulos rojos bovinos infectados. Antes del trabajo de Carson y col., (1977), Brock y col., (1965) y McHardy y Simpson (1973) habían investigado el uso de vacunas inactivadas y una de las desventajas reportadas con estas vacunas fue la inducción de isoeritrólisis



neonatal (Dennis y col., 1970) que se veía en algunos becerros de vacas vacunadas con este tipo de inmunógeno. La destrucción de eritrocitos está ocasionada por acción de anticuerpos desarrollados contra eritrocitos bovinos junto con el complemento dado que el antígeno utilizado para la inmunización se prepara a partir de GR infectados y está altamente contaminado con membranas del eritrocito. En un trabajo hecho por Montenegro-James y col., (1991) este grupo estudió la inmunoprotección dada por un inmunógeno inactivado de CI de *A. marginale* en adyuvante Saponina (Quil-A<sup>®</sup>) a la concentración de 1.5mg/ml y se reportó protección contra desafíos homólogos tanto como contra desafíos heterólogos en bovinos vacunados. El grupo de Hart y col., (1991) informaron el proceso detallado de producir a nivel comercial una vacuna inactivada contra la anaplasmosis. Esta vacuna se basa en la purificación de antígeno de *A. marginale* por centrifugación diferencial en gradientes de densidad de Renografina<sup>®</sup> al 40%. El antígeno así purificado es inactivado con glutaraldehído en una proporción de 1:100 a 37°C durante 72 horas y se utiliza para la vacunación a concentración de 10 a 20µg/ml en el adyuvante saponina (Quil-A<sup>®</sup>) en una concentración de 3mg/ml. Rodríguez y col., (2000) en México recientemente publicaron protección de 100% y 80% contra un desafío homólogo y heterólogo, respectivamente en grupos de bovinos vacunados con inmunógeno inactivado de cepas mexicanas de *A. marginale* en adyuvante STDCM (RIBI<sup>®</sup>) y desafiados con cepas nacionales de esta rickettsia.

### **2.7 Inmunidad y Profilaxis:**

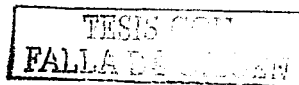
Un poco después del descubrimiento de la anaplasmosis por Theiler en el año 1908, el mismo investigador observó que los animales se podían proteger inmunológicamente con la inoculación de una cepa viva de la especie menos patógena de *A. centrale* la cual ocasionaba



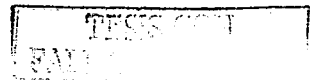
una enfermedad ligera asociada con protección (Theiler, 1912). Casi cinco décadas después, se demostró en experimentos más amplios que bovinos vacunados con una cepa viva de *A. marginale* seguida por tratamiento con tetraciclinas desarrollaban inmunidad contra desafíos homólogos (Ristic y Carson, 1977) aunque la protección contra desafíos heterólogos no era satisfactoria (Palmer, 1989). Basándose en estas observaciones, varios investigadores han diseñado inmunógenos profilácticos para proteger animales en regiones donde la anaplasmosis es endémica (Losos, 1986; Palmer, 1989). A pesar de éstos esfuerzos científicos, no se cuenta todavía con una vacuna universal y las investigaciones siguen hacia el diseño de una vacuna de alta eficacia y fácil de elaborar a nivel comercial. La falta de dicha vacuna se puede explicar debido a los pocos conocimientos de los mecanismos inmunoprotectores y de los propios antígenos responsables para esta inmunoprotección, factores importantes en el diseño de cualquier vacuna. La elaboración de una vacuna recombinante que tenga todas estas características sigue siendo el motivo de muchos estudios para mejorar las vacunas existentes contra la anaplasmosis.

## **2.8 Epidemiología molecular:**

Se han utilizado varias técnicas de biología molecular e inmunología para identificar las diferencias que existen en los varios aislados de *A. marginale* tanto como en otras rickettsias a nivel de genes y las proteínas que codifican. El concepto de la epidemiología molecular entonces ha sido importante en el entendimiento de la variación antigénica, un fenómeno muy característico en este grupo de patógenos. A lo largo de los años, varios investigadores han clasificado y caracterizado diferentes aislados de *A. marginale* basándose en las variaciones a nivel de los antígenos de superficie de la rickettsia tanto como al nivel de los genes codificantes de estas

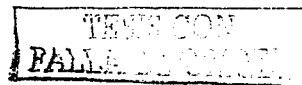


proteínas. Bear y Philpot (1987) estimaron el tamaño cromosomal de la *A. marginale* a los 340 kilobases de pares (kbp) y un poco más tarde, Alleman y col., (1991) establecieron que el tamaño de todo el genoma de *A. marginale* era de 1,025 al 1,250 kbp. Existe polimorfismo en algunas de las proteínas de la superficie de *A. marginale* y ésto ha sido mostrado en varios estudios dirigidos a la caracterización de estas proteínas utilizando anticuerpos monoclonales (mAb). Hasta este momento, se han identificado y caracterizado seis proteínas de superficie de la *Anaplasma* entre las cuales la MSP-1a, MSP-4 y MSP-5 pertenecen a una familia de un solo gene (single family gene) y MSP-4 y MSP-5 no muestran variación en aislados diferentes de *A. marginale* mientras que la MSP-1b, MSP-2 y MSP-3 pertenecen a familias multi-génicas y muestran una variación antigénica en cepas diferentes tanto como en casos de infección persistente en casos crónicamente infectado con *A. marginale*. Una característica muy típica de la MSP-1a es que muestra diferencia en el PM en aislados diferentes y ésto está dado por la diferencia en el número de secuencias repetidas en tandem de 28-29 aminoácidos en dicho péptido (Allred y col., 1990). Ésta característica ha sido utilizada para tipificar cepas diferentes de *A. marginale* basándose en el análisis de productos del gen *mSP-1a* en un PCR específico (De la Fuente y col., 2001; Lew y col., 2002; Shkap y col., 2002). Se ha establecido homología significativa en MSP-1 de cepas diferentes y la presencia en el MSP-1a (PM=105 kDa) de un epítipo común en aislados de *A. marginale* de origen de EE.UU., Israel, Kenia, Zimbabwe y este epítipo hace que muchos de los aislados diferentes se pueden localizar con un anticuerpo monoclonal específico a pesar de que esta proteína puede variar en su PM en los diferentes aislados. Oberle y col., (1988) han mostrado esta observación cuando analizaron seis aislados norteamericanos de *A.*



*marginale* (Florida-105kDa, South Idaho-97kDa, North Texas-89kDa, Virginia-70kDa y Washington-86kDa).

El polimorfismo de las proteínas; MSP-1b, MSP-2 y MSP-3 se sabe que está relacionada al polimorfismo de los genes responsables de la codificación de estas proteínas, las cuales se encuentran ubicadas en el superficie de la membrana plasmática. Uno de los primeros métodos para fenotipificar los aislados de regiones geográficas diferentes se basó en el uso de anticuerpos monoclonales específicos para las proteínas de la superficie (McGuire y col., 1984). En otros estudios se ha establecido la existencia de antígenos conservados entre aislados de *A. marginale* de países diferentes y más aún la existencia de dos epitopos comunes entre *A. marginale* y *A. centrale* (Palmer y col., 1988; Shkap y col., 1991). Al respecto de MSP-1 y MSP-2, los mismos autores mencionan que estos determinantes antigénicos se ubican en los MSP-1b de PM de 105kDa y MSP-2 de PM de 36kDa. Estas proteínas sólo varían en el número o en el tipo de aminoácidos que forman la cadena polipeptídica. Este mecanismo es también responsable para los variantes de *A. marginale* que se ven en rickettsemia cíclica característica a los casos crónicos de la anaplasmosis. Se sabe que este fenómeno puede ser por eliminación, sustitución, adición de aminoácidos al tiempo de transcripción y transducción y este fenómeno es muy característico en estos genes (Oberle y col. 1988; Barbet y col., 2000). Estudios concluyentes para investigar el polimorfismo de antígenos de *Anaplasma spp* se han hecho con la digestión de DNA con enzimas de restricción seguidos por el uso de sondas de DNA como pSt. Croix A1 (Krueger, 1989) para localizar los fragmentos de DNA. La variación en el tamaño de fragmentos ha sido reportado por varios investigadores (Krueger y col., 1989; Krueger, 1989).

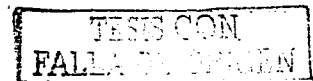


## **2.9 Antígenos inmunoprotectores:**

Las vacunas basadas en inmunógenos derivados de sangre bovina infectada con *A. marginale* no han logrado los requisitos de una vacuna altamente eficaz por la protección parcial asociada con desafíos heterólogos y los problemas asociados con la seguridad del producto (Ristic y Carson, 1977; Kuttler y col., 1984) como la isoeritrólisis neonatal en becerros de vacas vacunadas y el riesgo de transmitir otras enfermedades como leucosis bovina (Rogers y col., 1988). Esto ha justificado que la investigación se dirija hacia la caracterización de antígenos de la superficie del CI de *A. marginale* especialmente esos que son capaces de inducir protección cruzada entre las cepas de esta rickettsia provenientes de diferentes zonas geográficas con el fin de incluirlas en vacunas recombinantes. Hasta el momento, la búsqueda de este tipo de antígenos ha dado cinco proteínas inmunogénicas de la superficie del *Anaplasma spp* llamadas "Proteínas del complejo de la superficie mayor" ó en ingles Major Surface Proteins (MSP) de peso molecular (PM) diferentes; MSP-1a(100kDa), MSP-1b (105kDa), MSP-2(36kDa), MSP-3(86kDa), MSP-4(31kDa) y MSP-5(19kDa) (Palmer y McGuire, 1984) como se mostraron en la cepa Florida de *A. marginale*. A lo largo del tiempo, las características inmunológicas, biológicas y moleculares de estas proteínas han sido estudiadas con resultados variables y las de MSP-1 y MSP-2 son notablemente capaces de inducir protección homóloga en animales vacunados.

### **2.9.1 MSP-1:**

Esta proteína está compuesta por un heterómero de dos proteínas de las cuales en la cepa Florida de *A. marginale* mostraron PM de 100kDa (MSP-1a) y 105kDa (MSP-1b) no estructuralmente relacionadas pero ligadas de manera no-covalente y que se encuentran ubicadas en la superficie de la membrana de *A. marginale* (Barbet y



col.1987). MSP-1a está codificada por un solo gene *mSPA* mientras que el MSP-1b está codificada por lo menos por dos genes *mSP1β1* y *mSP1β2* (Barbet y col., 1987). El MSP-1a muestra diferencias de PM en aislados de origen geográfico diferente y se sabe que esta diferencia está dada por la repetición de tandems de péptidos de 28 a 29 aminoácidos (Allred y col., 1990). Se ha mostrado una variación de hasta 3kDa en PM del MSP-1a en cinco aislados norteamericanos de *A. marginale* (Oberle y col., 1988). El MSP-1b varía en diferentes aislados de *A. marginale* pero tiene por lo menos dos epítomos muy conservados. En estudios realizados en los EE.UU. por McGuire y col., (1984) y por Oberle y col., (1988) se mostraron que los epítomos conservados en esta proteína son sensibles a la neutralización. El grupo de Palmer y col., (1988) al comparar cepas provenientes de diferentes países del mundo como EE.UU., Israel, Kenia y Zimbabue mostraron una conservación de epítomos en esta proteína. Utilizando proteínas recombinantes de MSP-1a y MSP-1b expresadas en *Escherichia coli* se han estudiado el MSP-1 al respecto de su papel en la patogenicidad de *A. marginale* y en varios estudios se han confirmado que esta proteína tiene propiedades adhesivas hacia los eritrocitos bovinos (McGarey y col., 1994; McGarey y Allred, 1994) y para células en cultivo de origen de dos especies de garrapatas: *Dermacentor variabilis* e *Ixodes scapularis* (De la Fuente, 2000). Además McGarey y col., (1994) y McGarey y Allred (1994) demostraron que los anticuerpos anti-MSP-1a y anti-MSP-1b son capaces de inhibir la adherencia a los eritrocitos bovinos de cepas recombinantes de *E. coli* expresando MSP-1a y MSP-1b. Muy recientemente, Blouin y col., (2003) mostraron la inhibición por anticuerpos anti-MSP-1a/b de la infectividad de *A. marginale* para líneas de células en cultivo de la garrapata *I. scapularis*. Estos dos resultados indican muy lógicamente el papel importantísimo que



juegan estas proteínas en la invasión de eritrocitos tanto como en las etapas del desarrollo de *A. marginale* y transmisión por las garrapatas. Esto a su vez hace al complejo MSP-1 un antígeno potencial para incluirse en vacunas debido a su papel en el patogénesis de la anaplasmosis. Después de la observación de que esta proteína tenía epítopes conservados y sensibles a los anticuerpos neutralizantes el grupo de Palmer y col., (1986) probaron la MSP-1 de origen de una cepa de *A. marginale* Florida como un agente vacunal y mostraron que esta proteína induce una protección contra desafíos homólogos (Palmer y col., 1986) y protección parcial contra desafíos heterólogos. En el último caso usaron la cepa Washington-O para desafiar bovinos experimentalmente (Palmer y col., 1989). El grupo de Cantor y col., (1993) en Australia mostraron que anticuerpos anti-MSP-1a a partir de bovinos inoculados con un inmunógeno de la proteína MSP-1 aumentaron el número de CI de *A. marginale* fagocitados *in vitro* mientras que los anticuerpos de los testigos en este experimento no tuvieron efecto alguno lo que implicó que esos anticuerpos anti-MSP1 tenían propiedades opsonizantes. El grupo de Brown y col., (2001) en los EE.UU. ha confirmado la protección que induce la vacunación con un inmunógeno del MSP-1 y además de esto han mostrado que esta proteína está asociada con la producción de IgG2 y una respuesta celular de linfocitos de tipo Th1 cooperadora ó (CD4+) un mecanismo ya descrito como modelo de protección contra la anaplasmosis y actualmente aceptado ampliamente. En un estudio reciente, Brown y col., (2001) mostraron que la respuesta en bovinos inoculados con esta proteína está dirigida a la terminal carboxílica de MSP-1a que induce la producción de cantidades grandes de IFN- $\gamma$  por parte de células CD4+ y esta citocina es central para activar macrófagos para expresar los complejo de histocompatibilidad tipo II y la producción del óxido nítrico (ON) el que es altamente tóxico a la *A. marginale*.

TRABAJOS CON  
FALLA DE CARGEN



### 2.9.2 MSP-2:

Esta es una proteína inmunodominante de la superficie de la membrana de PM promedio de 36kDa e igual al MSP-1 ha mostrado protección contra desafíos homólogos y heterólogos (Palmer y col., 1988). El MSP-2 está codificada por una familia multigénica y por eso se expresa en forma de copias polimórficas (Palmer y col., 1994). Varios estudios han mostrado conservación de algunos epítomos en diferentes cepas de *A. marginale* de origen EE.UU, Israel y Kenia (McGuire y col., 1984, Palmer y col., 1988). La MSP-2 está asociada con infecciones persistentes de anaplasmosis en las cuales se transcriben sucesivamente variantes de *mSP2* en cada uno de los ciclos subclínicos de rickettsemia (French y col., 1998). El análisis de los productos de transcripción de estas variantes ha señalado regiones conservadas en los extremos 5' y 3' de los péptidos y una parte central hiper-variable (French y col., 1998, Eid y col., 1996). La región hipervariable se encuentra en la parte hidrofílica de la proteína y contiene muchos epítomos expuestos a las células inmunoefectoras muchas de ellas, células B (French y col., 1998; Eid y col., 1996). Estas últimas células son responsables de producir anticuerpos hacia estos epítomos en una manera cíclica correspondiendo a los ciclos de rickettsemia (French y col., 1998, Palmer y col., 1994). La capacidad inmunoprotectora de MSP-2 ha sido estudiada por varios investigadores y se basa en el modelo de protección de células Th1 con la producción de IFN- $\gamma$  y relacionado a su vez con la activación de los macrófagos y linfocitos B dando lugar a la producción de NO e IgG2 respectivamente. Paradójicamente aunque el MSP-2 induce protección contra desafíos homólogos y heterólogos (Palmer y col., 1988) y se sabe que la infección persistente en bovinos inducen protección contra infecciones agudas de anaplasmosis se cree que la infección persistente de anaplasmosis puede producir variantes

capaces de evadir la respuesta inmunoprotectora establecida por vacunación con el MSP-2. En un estudio por Palmer y col., (1999) se concluye que es necesario que se investiguen todos los epitopos de esta proteína para ubicar bien los puntos de variación y los que son conservados antes de que se entiendan bien las implicaciones de protección cruzada de los diferentes variantes y la infección persistente.

Tras una infección aguda de anaplasmosis, la rickettsia ha sido detectada por la técnica de PCR a niveles subclínicos en la sangre periférica de bovinos sobrevivientes (Eriks y col., 1989, Kieser y col., 1990) y ha sido detectada también por ensayos de subinoculación de sangre proveniente de estos animales en bovinos esplenectomizados. Basándose en estas observaciones, se cree que la infección persistente dura por toda la vida en estos animales. Muy interesantemente, los niveles subclínicos de la infección les da a esos bovinos protección contra desafíos homólogos y eso implica que la infección persistente es un mecanismo de evasión para escapar la respuesta inmune por parte de la rickettsia. Más interesante aún, estos niveles sub-clínicos de rickettsemia aumentan y disminuyen de manera cíclica (French y col., 1998) con picos de rickettsemia de  $10^6$  a  $10^7$  GRi por un microlitro de la sangre periférica y una mínima de  $10^2$  GRi/ $\mu$ l de sangre. Se ha demostrado que estos ciclos de rickettsemia ocurren cada 6-8 semanas (French y col., 1998) y están dados por la aparición de variantes de la proteína MSP-2 codificados por el gen *msp2*. Estas variantes estimulan una respuesta inmune específica que no logra controlar la infección por la recombinación de genes que de inmediato hace que se codifiquen nuevas variantes de la misma proteína. Tomando en cuenta este número posible de variantes, se estima que para generar variantes por una vida natural entera de un bovino, (Palmer, 2002) se requería que el gen *msp2* del 25 al 50% de todo el genoma de *A. marginale*. Barbet y col., (2000) han mostrado

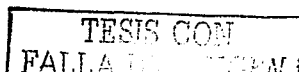
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

que el gen codificante de MSP-2 esta hecho por un operon de cuatro "open reading frames" (ORF= *orf2*, *orf3*, *orf4* *mSP2*) dentro de un solo sitio de expresión. En el trabajo de Brayton y col., (2001) realizado en la Universidad del estado Washington (EE.UU.) acerca de la secuenciación del genoma de *A. marginale*, se ha mosntrado que las copias adicionales de *mSP2* son pseudogenes y que éstos se pueden recombinar con la parte conservada del sitio de expresión. Se reporta que además de las proteínas multi-fórmicas de MPS-2 es posible que haya recombinación entre los genes *mSP-2* y *mSP-3* (Alleman y col., 1997) haciendo que este mecanismo de evasión de la respuesta inmune sea muy complejo.

### 2.9.3 MSP-3:

Es una proteína inmunodominante (de PM 86kDa en la cepa Florida de *A. marginale*) de la superficie de la membrana y uno de los antígenos más inmunodominantes en *Anaplasma spp* (McGuire y col., 1991). El MSP-3 muestra una identidad de 55% con MSP-2 en los aminoácidos del amino terminal (Alleman y col., 1997). El grupo de Brown y col., (1998) mostró que existen epítomos conservados entre el MSP-2 y MSP-3 que fueron reconocidos *in vitro* por clones de células CD4+ provenientes de bovinos vacunados. En este trabajo, los autores concluyen que hay muchos antígenos con epítomos cruzados y que algunos de éstos todavía no se han caracterizado. Hay posibilidad de recombinación de los genes *mSP2* y *mSP3*, una característica que produce variantes de antígenos todavía más complejas durante infecciones persistentes de anaplasmosis cuyas implicaciones a la inmunoprotección pueden ser negativas.

Los experimentos de vacunación con la MSP-3 muestran una protección parcial (Palmer y McElwain, 1995) y han mostrado que la proteína es capaz de inducir la producción de cantidades grandes de anticuerpos (McGuire y col., 1991; Palmer y col., 1986). Alleman y



Barbet, (1996) han investigado el uso de MSP-3 como antígeno para sero-diagnóstico y reportan la ausencia de especificidad en el diagnóstico de *A. marginale* por epítomos cruzados con otras rickettsias como *A. ovis*, *Ehrlichia risticii*, *E. wengii*, *E. equi* y *C. rumanantium*.

Al igual que la MSP-2, la MSP-3 está codificada por una familia multigénica denominada *mSP3*, responsable de la expresión de copias polimórficas de la misma proteína (Alleman y col., 1997). El mismo autor menciona que la MSP-3 tiene epítomos cruzados con *A. ovis* y otras rickettsias del grupo *Ehrlichia spp* y además los genes de *mSP2* y *mSP3* son adyacentes y es posible la recombinación entre ellos (Palmer y col., 1998).

#### 2.9.4 MSP-4:

Esta es una proteína de la superficie de *A. marginale* de PM de 31kDa. La proteína es codificada por un gen denominado *mSP-4* conservado en todas las cepas de *A. marginale*. Aunque se reportó que la inmunización con dos fracciones de membrana de superficie de *A. marginale* con la presencia común de solo la proteína MSP-4 estaba asociada con una protección homóloga (Tebele y col., 1991; Oberle y col., 1993), no se ha investigado extensivamente esta proteína. Además los componentes de estas fracciones inmunoprotectoras solo fueron probadas en geles de poliacrilamida teñidos sólo por Azul de Coomassie R-250 (Tebele y col., 1991) lo que deja la posibilidad de haber existido otras proteínas adicionales en esas fracciones. En un experimento de vacunación, sueros de 20 de los 26 bovinos vacunados mostraron títulos muy bajos contra el MSP-4 indicando que esta proteína no es inmunodominante. Los datos hoy en día sugieren que la proteína carece de propiedades inmunoprotectoras. Oberle y col., (1993) clonaron el gen *mSP-4* y reportaron que es muy conservado a nivel del gen tanto como a nivel de la proteína MSP-4.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **2.9.5 MSP-5:**

La MSP-5 es una proteína de la membrana de PM de 19 kDa. Esta proteína está muy conservada en todas de la cepas de *A. marginale* pero es difícil de detectar en inmunoblots por que su inmunogenicidad depende de su conformación nativa que es difícil de mantener en sistemas disociativos de electroforesis (Munodzana y col., 1998). Experimentos de inmunización basados en el uso de esta proteína no han mostrado protección alguna en bovinos (Palmer y McElwain, 1995) pero se reconoce que la proteína induce producción de grandes cantidades de anticuerpos por su riqueza en epítomos de linfocitos B. Basándose en esta última característica, se ha desarrollado un ensayo diagnóstico de ELISA-competitivo basado en el MSP-5 recombinante (Visser y col., 1992; Knowles y col., 1996) aunque algunos investigadores cuestionan la especificidad y la sensibilidad de este ensayo. En Sudáfrica, De Waal (2000) reporta una reacción cruzada entre infecciones por las dos especies *A. marginale* y *A. centrale* cuando se probaron sueros con la proteína recombinante de MSP-5 por ELISA, lo que hace que esta prueba sea inútil en diferenciar infecciones por diferente especies de anaplasma.

### **2.10 Otros antígenos de *A. marginale*:**

En el trabajo de Brown y col., (1998) se concluye que además de los antígenos de superficie de la membrana ya conocidos y caracterizados debe de haber antígenos todavía no estudiados que pueden tener epítomos relevantes a la estimulación del sistema inmune en los bovinos. Esta creencia se fortalece por observaciones de varios investigadores los cuales han reportado la presencia de varias proteínas en "inmunoblots" de extractos de *A. marginale* son reconocidas por sueros anti-anaplasma y son de PM diferentes a los de antígenos ya caracterizados. Aunque algunas de estas proteínas

pueden ser variantes de los antígenos ya estudiados, existe una alta posibilidad de la existencia de otras proteínas inmunoprotectoras. Montenegro-James y col., (1991) reportan un perfil de doce antígenos en un inmunoblot de proteína de *A. marginale* cepa Florida de PM 81, 74, 65, 58, 44, 38, 33, 29, 27, 24, y 16 kDa mientras que Patarroyo y col., (1994) reportan en una cepa brasileña de *A. marginale* antígenos de PM; 105, 100, 87, 38, y 25kDa. Adams y col., (1986) utilizaron la técnica de inmunoelectrotransferencia para estudiar y comparar antígenos de dos cepas norteamericanas de *A. marginale* (cepa Illinois y cepa Florida) y reportan presencia de antígenos de PM 100, 96, 47, 38-43 y 27kDa en la cepa Illinois y de 108, 91, 47, 38-43 y 27 kDa en la cepa Florida.

Muy recientemente, el grupo australiano de Riding y col., (2002) reportaron la presencia de antígenos con propiedades inmunoprotectores en el rango de PM de 17-43kDa. En el mismo estudio se reporta que la proteína de PM de 27kDa fue probado y indujo protección en bovinos inmunizado y esta protección fue asociada con la producción de IgG2.

### **2.11 Antígenos de las etapas de *A. marginale* en la garrapata:**

Dentro de la garrapata, la rickettsia *A. marginale* se desarrolla en varios tejidos como las glándulas salivares, células de la parte media del estómago en donde este desarrollo está programado en una manera coordinada con el ciclo biológico del vector. Mucha de la información acerca de los antígenos expresados por esta rickettsia dentro de la garrapata se ha obtenido en sistemas *in vitro* de células en cultivo de la garrapata *Ixodes scapularis* en donde se ha mostrado que *A. marginale* de este origen es infectiva para infectar tanto los bovinos como a las garrapatas (Blouin y col., 2000). La caracterización de antígenos de la etapa de la garrapata de *A. marginale* ha mostrado que los antígenos importantes como algunos de las MSP son conservados



después de varios pases en cultivo *in vitro* (Barbet y col., 1999). Considerando en particular la proteína MSP-1a, la secuenciación y el análisis de los pesos moleculares han señalado que la identidad antigénica es mantenida después de un par de pasos en cultivo *in vitro* en células de garrapata (Barbet y col., 1999; Bowie y col., 2002; Munderloh y col., 1996). Antígeno preparado de esta manera ha mostrado protección comparable en bovinos al que da el antígeno proveniente de sangre infectada y las implicaciones de todo esto es la posibilidad de utilizar dichos sistemas de cultivo para desarrollar una vacuna basada en inmunógeno producido en cultivo celular, lo cual sería importante ya que las vacunas provenientes de sangre infectada conllevan el riesgo de inducir isoceritrosis neonatal (Dennis y col., 1970).

## **2.12 Mecanismos inmunológicos:**

### **2.12.1 La respuesta humoral:**

A pesar de las observaciones clínicas válidas sobre la inmunoprotección de bovinos vacunados y resistencia a la anaplasmosis por animales que se han recuperado de una infección clínica, todavía no se han llegado a entender todos los mecanismos de la respuesta inmunológica protectora involucrados en la resolución de esta enfermedad. La falta de esta información científica también ha retrasado el diseño de tratamientos de la anaplasmosis, tomando en cuenta que además de la inmunoprotección, algunos de estos mecanismos involucrados en la resolución de la infección se caracterizan por participar en procesos patológicos autoinmunes. Más aún, tampoco se han diseñado técnicas de alta eficacia para aislar y estudiar todos los antígenos inmunoprotectores que existen en esta rickettsia. Desde hace casi tres décadas se ha sabido que la respuesta humoral en esta enfermedad involucra la producción de anticuerpos fijadores del complemento (Murphy y col., 1966; USDA, 1958),

aglutinantes (Amerault y Toby, 1968), precipitantes (Ristic y Mann, 1963) y opsonizantes (Cox y Dimopoulos, 1972). Algunos investigadores responsabilizan a los anticuerpos opsonizantes en la patogénesis autoinmune de la anemia que caracteriza la anaplasmosis (Cox y Dimopoulos, 1972; Mann y Ristic, 1963). La paradoja es que a pesar de ésto, los anticuerpos opsonizantes aumentan la destrucción de *Anaplasma spp* por parte de los macrófagos (Cantor y col., 1993) y de esta manera juegan un papel inmunológico importante en la inmunoprotección de animales infectados o vacunados. Murphy y col., (1966) estudiaron la cinética de anticuerpos en animales con una infección de *A. marginale* y observaron que la producción de anticuerpos empezaba con la aparición de inmunoglobulina-M (IgM) durante los primeros 4-5 días pos-infección seguida por la producción del isotipo de inmunoglobulina G1 (IgG1). Según sus observaciones y confirmadas al día de hoy, en los siguientes 30 días pos infección, decaían los niveles de IgM mientras que aumentaban considerablemente los de IgG. El mismo grupo (Murphy y col., 1966) estableció que los anticuerpos que fijan el complemento, la mayoría del tipo IgM, aparecían en los primeros 4-5 días de la infección seguidos por IgG de las mismas propiedades a partir del día 4 en adelante. Además, Murphy y col., (1966) mostraron que anticuerpos de tipo IgG se transfieren mayormente de la madre al becerro a través del calostro. En conclusión, se menciona que la IgM es complementada por la producción de IgG la que aparece al mismo tiempo que los CI de *A. marginale* en glóbulos rojos de la sangre periférica.

La controversia alrededor del papel de los anticuerpos en la inmunoprotección ha sido reportada por varios investigadores. Gale y col., (1992) y Palmer y McElwain (1995) reportan que la transfusión pasiva de anticuerpos hiperinmunes anti-Anaplasma de origen bovino no protege contra la anaplasmosis clínica. Según Gale y col., (1996)

TESIS CON  
FALLA DE TITULO



esto se puede atribuir a la evolución de *A. marginale* para evadir la respuesta bovina humoral. Otras observaciones acerca del papel reducido que juegan los anticuerpos en la inmunidad contra la anaplasmosis es que bovinos con niveles altos de anticuerpos contra *Anaplasma* caen con enfermedad al esplenectomizarlos antes de que disminuyan los niveles de anticuerpos (Ristic y col., 1958). Todas estas observaciones implican un papel menor de la respuesta humoral y un papel más importante por parte de la respuesta celular. Palmer y McGuire, (1984) mencionan que la incubación de CI de *A. marginale* con anticuerpos contra *Anaplasma* neutraliza su capacidad infectiva aunque la inoculación pasiva de estos anticuerpos no protegen animales contra la infección. La esplenectomía de bovinos seguido por infección experimental ó natural con *Anaplasma* es asociada con infecciones más graves (Jones y col., 1968) mientras que la esplenomegalia ocurre en casos agudos de anaplasmosis (Schmidt, 1937; Trueman y Wilson, 1979). Todas estas observaciones hicieron pensar a estos investigadores que la inmunidad contra la anaplasmosis está más relacionada con una respuesta celular.

### **2.12.2 La respuesta celular:**

Buening (1973) estudió la respuesta inmunitaria en bovinos vacunados y protegidos contra la anaplasmosis y propuso en aquel entonces que la protección muy probablemente era mediada por células inmunoefectoras. Diez años después del estudio de Murphy y col., (1966), los investigadores Buening (1976) y Carson y col., (1977) establecieron la correlación entre la repuesta celular e inmunoprotección en varios ensayos dirigidos para medir la respuesta celular *in vitro* utilizando leucocitos de bovinos vacunados y midiendo la respuesta celular *in vivo* en los mismos bovinos. En estos estudios, los autores midieron *in vitro* el parámetro de La Inhibición de Migración de Leucocitos (LMIT) y mostraron que en los animales

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

protegidos, los valores de LMIT eran más altos que en los animales en los que la protección era parcial. Según estos resultados, el valor de LMIT estaba relacionado con la inmunoprotección y la sobrevivencia de bovinos vacunados y desafiados. Además, Carson y col., (1977) reportan que había menos probabilidades de sobrevivencia en los animales cuyas respuestas celulares tardaban en desarrollarse, y estas observaciones juntas implicaron que la respuesta celular era importante en inmunoprotección contra anaplasmosis. En un estudio que confirmó estas observaciones Buening (1976) mostró que en bovinos esplenectomizados, las infecciones experimentales se caracterizaban por rickettsias más altas que en bovinos no esplenectomizado. El mismo autor reporta que la respuesta celular *in vitro* medida como ensayo citotóxico mediado por células era mínima y tardaba más que en animales no esplenectomizados bajo las mismas condiciones. En estudios más recientes, varios investigadores han diseñado técnicas para evaluar el papel de la respuesta celular en la inmunidad contra anaplasmosis. Gale y col., (1996) reportan un ensayo de linfoproliferación *in vitro* en el cual se midió la respuesta celular de linfocitos provenientes de bovinos vacunados. En el mismo estudio Gale y col., 1996 midieron las cantidades de IFN- $\gamma$  en sobrenadantes de células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) cultivadas *in vitro* en presencia de extractos de antígenos de *A. marginale* y informaron valores más altos de esta citocina en sobrenadantes de células provenientes de bovinos vacunados y protegidos en comparación con sobrenadantes de células provenientes de los testigos. El IFN- $\gamma$  juega un papel muy importante en coordinar respuestas celulares como la activación de macrófagos aumentando su capacidad fagocítica pero también activa los linfocitos B dando células plasmáticas que elaboran IgG2. En estudios más recientes, se ha mostrado que la inmunoprotección en animales vacunados está directamente relacionada no solo con una respuesta celular de tipo

RECEIVED  
MAY 19 1996  
LIBRARY OF THE  
INSTITUTION FOR  
ANIMAL HEALTH

Th1 sino también con el desarrollo simultáneo de altos niveles de IgG2 (Brown y col., 1998). Este isotipo de IgG hasta entonces se sabía que tenía propiedades opsonizantes contra CI de *A. marginale* (Cantor y col., 1993) y que era capaz de aumentar el número de CI ingeridos por macrófagos cultivados *in vitro*. En un estudio muy específico, la incubación de CI de *A. marginale* con anticuerpos de bovinos vacunados con un inmunógeno de MSP-1 ha mostrado, *in vitro*, un aumento en el número de CI de *A. marginale* ingeridos por macrófagos (Cantor y col., 1993). Esta observación confirma la participación de las dos respuestas, humoral y celular, en el mecanismo de inmunoprotección.

Después de muchas investigaciones, se ha establecido un modelo ampliamente aceptable acerca de la inmunoprotección contra la anaplasmosis. Según este modelo, los macrófagos y células dendríticas reconocen eritrocitos infectados quizás a través de un factor expresado en la superficie del eritrocito infectado. Esto es seguido por la destrucción del eritrocito y la fagocitosis de los CI de *A. marginale* cuyos antígenos son procesados reduciéndolos a fragmentos pequeños, los cuales son presentados a través de las moléculas del complejo de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) a los linfocitos T cooperadores CD4+ las cuales responden con producción de varias citocinas como IFN- $\gamma$  (Brown y col., 1998). Esta citocina estimula a los linfocitos B, los cuales a su vez empiezan a diferenciarse dando células plasmáticas. Estas últimas células producen anticuerpos específicos de tipo IgG2 contra *A. marginale* (Estes y col., 1994) dirigidos a los epitopos de células B en los antígenos de superficie de *A. marginale* (Tebele y col., 1991). Aunque los anticuerpos por sí mismos no protegen contra anaplasma, se piensa que se requieren para proveer la especificidad requerida para la fagocitosis eficiente por parte de los macrófagos como se señaló en el trabajo de Cantor y col., (1993). El IFN- $\gamma$  activa los macrófagos para

expresar receptores Fc aumentando la capacidad fagocítica de los mismos (Palmer y McElwain, 1995) y la producción de NO (Adler y col., 1994, Stich y col., 1998, Brown y col., 1998). El NO es muy potente en la destrucción de bacterias incluso las rickettsias. En el trabajo de Brown y col., (1998) se reporta que líneas de células CD4+ a partir de animales vacunados y protegidos con un inmunógeno de *A. marginale* produjeron cantidades grandes de IFN- $\gamma$  y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en comparación a los controles. Hay más evidencia de una cooperación entre los macrófagos y las células CD4+ en la cual los macrófagos producen IL-12 que estimula la expresión de receptores de IL-2 en los CD4+ y estas células producen IL-2 que tiene un efecto mitogénico en los mismos CD4+ y además estimula los macrófagos para aumentar la producción de IL-1 que estimula los propios macrófagos para expresar los receptores de MHC-II los cuales son importantes para la presentación de antígenos.

### **2.12.3 Protección cruzada e inmunidad específica de cepa:**

Varios investigadores han demostrado que la vacunación de bovinos con *A. marginale* induce una protección sólida contra desafíos homólogos (Palmer, 1989). Esta observación se ha corroborado con tres cepas mexicanas de *A. marginale* en varios estudios hechos por el grupo de Rodríguez y col., (1999). En estos y otros estudios, la protección ha sido parcial y variable contra desafíos heterólogos (Tebele y col., 1991). En México Rodríguez y col., (1999) reportan una protección parcial de 60% contra desafío heterólogo en bovinos vacunados. Esto puede explicarse por la variación antigénica que existe entre diferentes cepas pero también dentro de una misma cepa (Palmer y McElwain, 1995). Esta característica de las rickettsias tiene como base genética los multigenes; *mSP1 $\beta$ 1* (y *mSP1 $\beta$ 2*), *mSP2* y *mSP3* que respectivamente codifican para las proteínas de la membrana del superficie; MSP-1b, MSP-2 y MSP-3 (Palmer y col.,



1994; Alleman y col., 1997) Por todas estas características de *A. marginale* la elaboración de vacunas de eficacia universal todavía no se ha logrado.

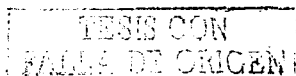
TESIS CON  
FALLA

## CAPITULO III

## (EXPERIMENTO I)

**3.0 PRODUCCIÓN DEL INMUNÓGENO EXPERIMENTAL DE *A. marginale* (Méx-15, Méx-17 y Méx-30) Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA DE ERITROCITOS BOVINOS NO INFECTADOS:****RESUMEN:**

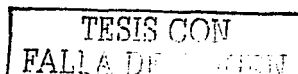
Para obtener antígenos de las tres cepas mexicanas de *A. marginale* estudiadas, se inocularon bovinos esplenectomizados vía intramuscular con sangre infectada equivalente a  $1 \times 10^8$  GRi de cada uno de los tres aislados estudiados. Esta sangre se mantuvo en criopreservación y fue pasada en una serie de tres vaquillas esplenectomizadas para reactivar los aislados de *A. marginale*. Los datos obtenidos indican que en el tercer bovino las cepas Méx-15, Méx-17 y Méx-30, alcanzaron rickettsemias de 94%, 76% y 67% respectivamente. Los inmunógenos preparados a partir de la sangre infectada fueron estudiados por SDS-PAGE e inmunoblot para evaluar el estado de las proteínas. Para la cepa vacunal Méx-17, se demostró un total de hasta 17 bandas de proteínas en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% teñidos con Azul de Coomassie R-250 y 12 antígenos inmunoreactivos en un inmunoblot. Para la preparación del inmunógeno de *A. marginale* para los varios experimentos en este estudio, se modificó la técnica usual de ultracentrifugación de tal manera que se disminuyó considerablemente la cantidad de membranas eritrocíticas por la purificación en solución isoosmótica de Percoll al 30%. Se concluye que, la inoculación de bovinos esplenectomizados sigue siendo un método práctico para producir antígeno de *A. marginale* hasta que el cultivo celular para *A. marginale* sea aplicado ampliamente. Los componentes proteicos de



los extractos de *A. marginale* purificado de esta manera mostró proteínas inmunogénicas por lo que se concluye que este esquema sigue siendo útil para producir inmunógenos de *A. marginale* para varios estudios.

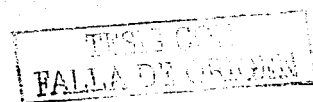
### **3.1 INTRODUCCIÓN:**

Desde los tiempos de Theiler (1912), en casi todas las investigaciones acerca de *A. marginale* se ha utilizado la inoculación de bovinos esplenectomizados para producir inmunógenos experimentales y la sangre obtenida de esta manera se utiliza para purificar antígenos, para preparar inmunógeno, para inmunización u otros estudios relacionados con esta rickettsia. Durante las últimas décadas, se ha reconocido el papel importante que juega el bazo en la inmunidad contra la anaplasmosis. Mientras se estudiaba la respuesta celular *in vivo* en dos grupos de bovinos; uno de animales esplenectomizado y el otro no esplenectomizados, Buening (1973) se dio cuenta de que cuando se inocularon con una cepa viva y virulenta de *A. marginale* el grupo esplenectomizado alcanzaba porcentajes de eritrocitos infectados (PEI) significativamente más altos que el grupo de bovinos no esplenectomizados. Por ausencia de un sistema de cultivo *in vitro* de *A. marginale*, la esplenectomía se ha usado para obtener sangre infectada, la cual se utiliza como fuente de material infectivo e inmunogénico en varios tipos de estudios acerca de esta rickettsiosis. Siendo un órgano linfático secundario, se sabe hoy que el control de la infección de anaplasmosis es mayormente por macrófagos activados en el bazo y la esplenectomía afecta la respuesta celular de estos bovinos, lo que permite que las rickettsias alcancen valores muy altos; algo muy importante en la producción de antígeno para preparar inmunógenos experimentales de *A. marginale*. En México, González y col. (1983) utilizaron la inoculación de *A. marginale* en bovinos esplenectomizados para producir sangre infectada, la cual utilizaron



como fuente de antígeno de la rickettsia para desarrollar las técnicas diagnósticas de aglutinación en tarjeta y fijación de complemento. En este mismo estudio, los autores (González y col., 1983) reportan un caso en donde lograron una impresionante rickettsemia de 97%. Ha habido varios esfuerzos exitosos por parte de diferentes científicos en la investigación de sistemas de cultivo *in vitro* para *A. marginale* como el uso de cultivo *in vitro* de células embrionales de la garrapata *Ixodes scapularis* (Munderloh y col., 1996; Blouin y Kocan, 1998) y cultivo de la rickettsia en eritrocitos bovinos en presencia de células endoteliales (Waghela y col., 1997). Aunque el antígeno obtenido de esta manera ha mostrado resultados confiables, cuando se utilizó como inmunógeno para la inmunización de bovinos (Blouin y col., 1998; Kocan y col., 2001; de la Fuente y col., 2002), las técnicas de cultivo *in vitro* todavía no están ampliamente aplicadas.

La purificación del antígeno de *A. marginale* se lleva a cabo utilizando técnicas ya establecidas y modificadas a lo largo del tiempo por varios investigadores. Estas técnicas incluyen: la sonicación de la sangre infectada utilizando sondas ultrasónicas o el uso de soluciones líticas como el cloruro de amonio o la saponina seguida por la centrifugación diferencial en soluciones iso-osmóticas en amortiguadores sea de fosfatos o de otros sistemas como solución salina de Puck pH 7.4 (Puck y col., 1958). Estas técnicas han sido utilizadas por varios investigadores y se basan en la eliminación del plasma, la hemoglobina y de los glóbulos blancos. El antígeno purificado de esta manera está todavía contaminado por membranas eritrocíticas lo que puede ocasionar eritrolisis neonatal en becerros de vacas vacunadas cuando se utiliza este tipo de material como un agente vacunal o choque anafiláctico en revacunaciones. Tomando en cuenta esta posibilidad se ha justificado la modificación de estas técnicas de tal manera que se eliminen las membranas de eritrocitos durante el proceso de la purificación.



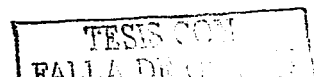


Rodríguez y col., (1986) reportaron el uso de gradientes de densidad de Percoll; un compuesto de polivinilpirrolidona y silica, para purificar merozoitos de *Babesia bovis* de tal manera que se eliminaban gran cantidad de membranas eritrocíticas contaminantes. En un estudio hecho por Gale y col., (1996) en Australia, se reportó la purificación del antígeno de *A. marginale* en gradientes de Percoll al 70%. Previamente, Hart y col. (1991) en los EE.UU. habían logrado eliminar la contaminación del antígeno de *A. marginale* por membranas eritrocíticas por centrifugación diferencial en gradientes de otro compuesto de yodo, renografin al 40%. Todas estas técnicas alcanzan grados variables de eliminación de membranas de eritrocitos y dan un grado variable de la pureza del antígeno preparado. A pesar de que existen todas estas técnicas dirigidas a eliminar las membranas eritrocíticas, se cree que queda una cantidad pequeña de residuos de membranas de eritrocitos contaminantes por lo que se están investigando otros métodos para la producción de inmunógenos de *A. marginale* como el de cultivo de *A. marginale* en células de la garrapata *I. scapularis*. El presente experimento fue diseñado para producir cuerpos iniciales que pudieran ser usados en la inmunización de bovinos y para los experimentos de linfoproliferación *in vitro*.

### **3.2 MATERIALES Y MÉTODOS:**

#### **3.2.1 Aislados de *A. marginale*:**

Se seleccionaron tres aislados mexicanos de *A. marginale* (Méx-15, Méx-17 y Méx-30). Los que actualmente se mantienen en criopreservación en las instalaciones del laboratorio de Anaplasma del CENID-PAVET del INIFAP fueron reactivados en bovinos esplenectomizados para producir sangre infectada. La cepa Méx-31, proveniente del estado de Yucatán, se utilizó como fuente de antígeno para el ensayo de ELISA y en los experimentos de linfoproliferación *in vitro* para corroborar la protección cruzada con la misma cepa.



Tres de estos cuatro aislados han sido caracterizados biológicamente en cuanto a su virulencia y su capacidad inmunoprotectora (García-Ortiz y col; 1998, Rodríguez y col., 1999; Rodríguez y col., 2000). Recientemente, los mismos cuatro aislados estudiados fueron caracterizados genéticamente (de la Fuente et al. 2001) y actualmente representan parte de una colección nacional de referencia de cepas mexicanas de *A. marginale*.

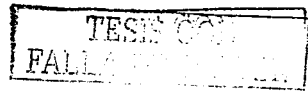
El aislado *A. marginale* (Méx-15-099-01) fue recuperado de un brote en un centro de acopio en el municipio de Texcoco, Estado de México, y el Méx-17-029-01 fue recuperado de un brote en el municipio de Yautepec, en el estado de Morelos, mientras que el aislado Méx-30-193-01 fue recuperado en un brote natural en la localidad de paso del Toro en el municipio Veracruz en el estado de Veracruz.

### **3.2.2 Animales experimentales:**

Para el estudio se utilizaron nueve bovinos hembras de raza Angus (*Bos taurus*), de edad promedio 1.5 años y libres de anticuerpos contra *A. marginale* y *Babesia spp* por ELISA y provenientes de hatos libres de brucelosis y de tuberculosis en el estado de Coahuila, México. Los nueve bovinos fueron alojados en las instalaciones del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología-Veterinaria (CENID-PAVET) del INIFAP y se les proporcionó dieta de sostenimiento y agua *ad libitum* y todos animales fueron esplenectomizados e inmunodeprimidos con dexametasona (Aziium®) a la dosis de 5mg/animal/día vía intramuscular y usados en grupos de tres para la producción de sangre infectada de cada aislado.

#### **3.2.2.1 Inoculación y Monitoreo de bovinos esplenectomizados:**

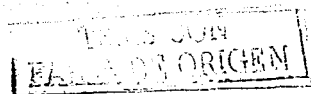
Una vez recuperados los bovinos de la cirugía se les tomaron datos básicos de hematocrito, temperatura rectales (Tr), peso corporal y



sangre para frotis teñido con el colorante de Giemsa para destacar la presencia de hemoparásitos. La sangre para hacer frotis y para medir el volumen celular aglomerado (VCA) se colectó en tubos al vacío con sal dipotásica del ácido etilendiaminotetraacético (K<sub>2</sub>-EDTA) como anticoagulante. Los frotis se tiñeron durante 5 minutos con colorante de Giemsa diluido 1:3 en agua destilada y las laminillas se examinaron en un microscopio compuesto con aceite a  $\times 100$ . Para determinar el VCA se utilizaron tubos microcapilares y se centrifugó la sangre a 11,000 RPM durante cinco minutos en una microcentrifuga (SOLBAT 258) y se determinó el valor de VCA por un lector de micro-hematocrito.

Después de la toma de los datos básicos, se dividieron los bovinos en tres grupos, cada uno de los cuales fueron inyectados a través de la yugular con sangre infectada a una dosis de  $1 \times 10^{10}$  GR infectados. Para la inoculación, la sangre infectada con cada uno de los tres aislados de *A. marginale*, previamente criopreservados, se descongeló en baño María a 37°C e inmediatamente se inoculó a los primeros tres bovinos. Cada dos días, en el periodo pos-inoculación, se les tomaron a los bovinos muestras de sangre con tubos al vacío con K<sub>2</sub>-EDTA para frotis delgados para seguir el desarrollo de la rickettsemia y para medir la cinética del hematocrito. Se tomaron también las Tr para vigilar el desarrollo de fiebre.

Cuando se determinó que la rickettsemia estaba en la fase de multiplicación logarítmica, se colectó una unidad (Unidad Bolsang® CPAD-1) de sangre infectada (450ml) del primer bovino y se le inoculó al segundo bovino. El procedimiento se repitió para los terceros bovinos de cada serie y estos últimos animales fueron exsanguinados cuando el porcentaje de eritrocitos infectados (PEI) fue superior a 50% en un periodo menor de 10 días. La sangre colectada de ésta manera se centrifugó tres veces por 15 min en



solución salina de Puck pH: 7.4 (Puck y col., 1958) a 4°C, 1500×g en una centrifuga cada vez retirando el sobrenadante y la capa flogística de glóbulos blancos. La sangre para experimentos de infección se guardó en criopreservación a -196°C en nitrógeno líquido utilizando PVP 40 al 10% en solución salina de Puck pH 7.4 y la sangre para el aislamiento de antígeno para los experimentos de este estudio se conservó a -70°C en DMSO al 10% en solución salina de Puck hasta su uso.

### **3.2.3 Purificación del antígeno de *A. marginale*:**

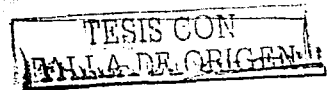
La sangre infectada se obtuvo del congelador a -70°C y se descongeló rápidamente en baño María a 37°C. La sangre descongelada se centrifugó en solución salina de Puck pH 7.4 [con gentamicina a 50µg/ml, y el inhibidor de proteasas fenilmetilsufonil fluoruro (PMSF) 1mM] una vez por 10 minutos a 1,000×g, 4°C para sedimentar glóbulos blancos y sus núcleos. Se descartó el sedimento y se recuperó el sobrenadante. El sobrenadante se lavó en tres ocasiones en una centrifuga a 23,000×g 4°C cada lavado de 30 minutos; cada vez retirando el sobrenadante y recuperando el sedimento. Después del tercer lavado se diluyó el antígeno 1:3 en solución de Puck pH 7.4, se colocó en tubos de 50ml y se sometió a ondas de ultrasonido de un sonicador (Fisher sonic Dis-membrator® Model 300) a 50% de potencia en un baño de hielo por dos minutos con un minuto de descanso. Para eliminar la mayoría de las membranas de eritrocitos se centrifugó el sonicado en solución iso-osmótica de Percoll al 30% en solución de Puck según la técnica descrita por McCorkle-Shirley y col., (1985) con algunas modificaciones. La densidad de los cuerpos iniciales de *A. marginale* como se informó estos autores es de 1.19g/ml. El sonicado se mezcló con tres volúmenes de solución salina de Puck y a siete volúmenes de esta mezcla se le agregaron 3

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

volúmenes de una solución estéril iso-osmótica de Percoll/0.15M cloruro de sodio (1 parte de 1.5M NaCl + 9 partes de Percoll al 100% Percoll iso-osmótico), y se centrifugó por 35 minutos a 23,000×g, 4°C. Las aparentes dos capas de las membranas eritrocíticas y de los CI de *A. marginale* se separaron cuidadosamente con una pipeta Pasteur estéril y se probaron en frotis teñidos con el colorante Giemsa para evaluar el contenido de las dos capas. Los cuerpos iniciales se lavaron una vez en solución salina de Puck pH 7.4 con PMSF a 1mM y gentamicina a 50µg/ml. El sedimento del antígeno se transfirió a un tubo limpio y estéril dejando atrás el sedimento transparente del Percoll. El antígeno se lavó dos veces más en las mismas condiciones, se repartió en viales de 1ml y se guardó a -70°C hasta su uso. De este antígeno se utilizó una cantidad pequeña para probar la calidad del antígeno por PAGE-SDS y por inmunoblot. Otra pequeña cantidad de éste antígeno se utilizó para determinar la concentración de proteínas por la técnica de Bradford.

#### **3.2.4 Purificación de proteínas de las membranas de eritrocitos bovinos no infectados:**

El estroma de eritrocitos bovinos no infectados se utilizó como control en los ensayos de electroforesis, inmunoblot, linfoproliferación *in vitro* y en cultivo celular para los experimentos de estimulación de linfocitos T CD4+ con fracciones de antígeno de la cepa Méx-17 obtenida por electroforesis de flujo continuo. Para la preparación del estroma de eritrocitos no infectados, se muestrearon los bovinos libres de la anaplasmosis antes de la inoculación y la sangre se colectó en heparina. La sangre obtenida de esta manera se centrifugó en tres ocasiones en solución salina de Puck estéril a 1500×g, 4°C en una centrifuga (Centrifuga IEC Centra MP4R) cada vez retirando el sobrenadante y la capa flogística y recuperando el



sedimento de membranas eritrocíticas. Los eritrocitos se lisaron con una solución de cloruro de amonio al 0.83%; Tris-HCl, 0.01M pH 7.5 incubando 15 minutos en baño de hielo, y posteriormente se centrifugaron a  $10,000 \times g$  por 15 minutos a  $4^{\circ}C$ . Posteriormente la preparación se lavó en tres ocasiones en solución salina de Puck pH 7.4 a las mismas condiciones hasta que adquirió un color rosa claro. El estroma purificado se guardó a  $-70^{\circ}C$  hasta su uso y una cantidad pequeña se utilizó para la determinación de concentración de proteínas por la técnica de Bradford.

**3.2.5 Determinación de concentración de proteínas en el extracto de *A. marginale* y de eritrocitos bovinos no infectados por la técnica de Bradford:**

Se utilizó una solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA) en agua destilada a 0.1mg/ml para preparar en duplicado soluciones de concentración de 1.0, 2.5, 5.0 y 10.0  $\mu g/ml$  en un volumen final de 2ml en el cual 400 $\mu l$  era del reactivo de Bradford [Azul Brillante de Coomassie-G250 a 0.01% p/v en Etanol a 4.7% v/v y ácido fosfórico a 8.5% v/v (BIORAD Cat. No.500.0006)] y 1,600 $\mu l$  de agua destilada. Estas soluciones de concentración serial de albúmina se utilizaron para preparar la curva estándar que se usó para estimar las concentraciones problemas del antígeno.

El extracto crudo purificado se mezcló en una proporción 1:8 en una solución de hidróxido de sodio a 0.1N (0.1N NaOH) en un volumen final de 400 $\mu l$  y se hirvió sobre un baño de agua a  $100^{\circ}C$  durante cinco minutos. Se centrifugó durante dos minutos la muestra a 10,000 RPM a  $4^{\circ}C$  en un micro-centrifuga para sedimentar cualquier sólido y de este antígeno se prepararon dos muestras problemas en duplicados tomando 50 $\mu l$  y 100 $\mu l$  de cada extracto a los cuales se le agregó 400 $\mu l$  del reactivo de Bradford y el resto de agua destilada en un volumen

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

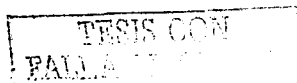
final de 2ml. En menos de una hora después de agregar el reactivo de Bradford se leyeron las densidades ópticas (DO) de las soluciones problemas tanto como la solución estándar de concentraciones diferentes en un espectrofotómetro (CAMSPEC® M350 uv visible light scanning Spectrophotometer) a 595nm. Los valores de DO obtenidos por duplicado se utilizaron para calcular el promedio de la DO y se preparó la curva estándar la cual se utilizó para determinar la concentración de la muestra tomando en cuenta todos los factores de dilución que se hicieron en todos los pasos. Las concentraciones del antígeno de *A. marginale* y del estroma de glóbulos rojos no infectados se tomaron en cuenta en todos los ensayos realizado después.

### **3.2.6 Electroforesis e Inmunoblot del extracto de *A. marginale* y del estroma de eritrocitos no infectados:**

El antígeno purificado se probó por su calidad, integridad y perfil de componentes por electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato (PAGE-SDS) utilizando el estroma de eritrocitos bovinos sanos como control de comparación. El procedimiento se repitió para otro gel, se llevó a cabo la electrotransferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa para reaccionar con sueros hiperinmunes específicos para *A. marginale*.

#### **3.2.6.1 Electroforesis:**

La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 10% en la fase de resolución con fase pre-separadora de 4% de monómero de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli (1970). Las muestras del extracto de *A. marginale* tanto como el estroma de eritrocitos bovinos sanos previamente obtenidos se mezclaron con un volumen igual de un amortiguador de muestra (Amortiguador de muestra =Tris-HCl 625mM; SDS al 5% p/v; glicerina al 10% v/v, Azul de bromofenol al



TESIS NO SALE

0.002% p/v, 2-mercaptoctanol al 10% v/v). Las mezclas se hirvieron en Baño María en ebullición durante cinco minutos y se centrifugaron las muestras hervidas a 10,000 RPM durante cinco minutos y el sobrenadante se utilizó para cargar los geles.

Utilizando una jeringa de Hamilton, se cargaron por carril un volumen de muestra equivalente a 10µg de proteína del extracto y se corrieron dos geles mediante un sistema disociativo a voltaje constante de 110V sumergidos en buffer de corrimiento (Tris-HCl 25mM, glicina 192mM y SDS al 0.1%) durante dos horas. Después de la corrida se realizó la electrotransferencia de uno de los dos geles y el otro se tiñó con Azul de Coomassie R-250 (Azul de Coomassie R-250 al 0.4% p/v, ácido acético glacial al 12% v/v y metanol al 20% v/v en agua destilada) durante 15 minutos en baño María a 56°C y se destiñeron con una solución reveladora (metanol al 30% v/v, ácido acético glacial al 10% v/v en agua destilada) bajo las mismas condiciones, 5-8 veces hasta verse las bandas. El gel revelado se escaneo utilizando el software de *Corel Photo House versión 1.1* y la imagen se guardó en un diskette y se analizó para sacar el perfil de proteínas separadas y para estimar los pesos moleculares de las bandas separadas.

### **3.2.6.2 Electrotransferencia:**

Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de PVDF, Immobilon P7 (Millipore®). Antes de utilizar la membrana, ésta se humedeció en metanol absoluto ya que la membrana es altamente hidrofóbica y finalmente se sumergió en amortiguador de transferencia (regulador de corrida 10x al 10% v/v; Tris-HCl 25mM, glicina 192mM, metanol al 20% v/v en agua destilada) durante diez minutos antes de utilizar para preparar el "sandwich". Después de la electroforesis, el gel se equilibró en amortiguador de transferencia durante 20 minutos y posteriormente se sobre-puso el gel en la



membrana ya descrita cuidando de no dejar burbujas. Ambos se cubrieron con papel *Whatman No. 3* formando un "sándwich" el que se sumergió en amortiguador de transferencia antes de llevar a cabo la transferencia a una corriente constante de 200mA por tres horas empleando un sistema de enfriamiento.

### **3.2.6.3 Inmunoblot:**

Una vez transferidas las proteínas, la membrana se incubó a 4°C en una solución de albúmina sérica bovina (ASB) al 10% en solución salina de fosfatos-Tween 20 al 0.05% pH 7.4 (SSAF-Tween 20) toda la noche para bloquear los sitios reactivos vacíos. Al día siguiente la membrana fue lavada a temperatura ambiente (TA) en tres ocasiones con agitación continua en SSAF 1x con Tween-20 al 0.05% y ASB al 1% pH 7.4 (T-SSAF/ASB-1%) incubando durante 5 minutos entre cada lavado. La membrana se incubó en agitación con un suero bovino hiperinmune a la anaplasmosis diluido 1:200 en T-SSAF/ASB-1% durante 1 hora a TA y se repitió el paso de lavados como antes, y después se incubó la membrana con agitación continua durante 1 hora con el conjugado anti-IgG bovino fosfatasa alcalina de origen de cabra diluido a 1:1,000 en T-SSAF/ASB-1%. La membrana se lavó tres veces en solución de ASB al 1% en Tris-Tween 20 al 0.05% pH 7.5 por 15 minutos entre cada lavado, y se aplicó el sustrato premezclado de BCIP/NBT; fosfato de azul nitro tetrazolio-5-bromuro-4-cloruro-3-indolil; (SIGMA No. de Cat. B6404) con agitación continua hasta que se revelaron las bandas y se detuvo la reacción con etanol al 70% seguido por agua destilada y se depositó la membrana en oscuridad para secarse.

### **3.3 RESULTADOS:**

La reactivación de las tres cepas mexicanas de *A. marginale* fue la esperada y alcanzó en la tercera vaquilla de cada de las series

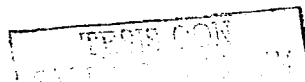


rickettsemias de 94%, 76% y 67% para las cepas Méx-15, Méx-30 y Méx-17 en 8, 10 y 7 días pos-infección respectivamente (Cuadro I). Estas rickettsemias representan el máximo porcentaje de eritrocitos infectados (PEI) que fue registrado al día de ex-sanguinación. Las tres vaquillas sacrificadas para la colección de sangre infectada mostraron fiebre que coincidió con un aumento drástico en el número de GRi un día antes de la exsanguinación (Cuadro I).

En la Fig. 1 se muestran glóbulos rojos del bovino No. 06 altamente infectado con *A. marginale* con rickettsemia de 94% (Cuadro I, Fig. 1) mientras que en la Fig. 2 se muestra CI extraeritrocíticos después de la purificación en Percoll. Tipicamente los cuerpos de inclusión muestran su ubicación muy característica de *A. marginale* en la parte periférica del eritrocito (Fig. 1). Notablemente, se muestra un promedio de hasta cuatro cuerpos iniciales por cada glóbulo rojo infectado.

Pequeñas cantidades del extracto de cada una de las cepas estudiadas de *A. marginale*, purificado a partir de sangre infectada por una combinación de técnicas de sonicación y ultra-centrifugación, fueron probadas por su calidad en laminillas teñidas con el colorante Giemsa (Fig. 2). Además se probaron los extractos de *A. marginale* utilizando proteína de eritrocitos no infectados, como control, en geles de poliacrilamida al 10% (Fig. 3) y por inmunoblot utilizando sueros bovinos hiperinmunes (Fig. 4 y 5). Para el inmunoblot se utilizó un anticuerpo de cabra anti-IgG bovino conjugado a fosfatasa alcalina después de la incubación de la membrana con el suero inmune a Anaplasma.

El análisis del gel teñido con el colorante Azul de Coomassie R-250 (Fig. 3) mostró la presencia de 17 proteínas claramente teñidas de PM; 21, 26, 31, 32, 33, 35, 38, 40, 46, 49.1, 62, 80, 90, 105, 120, 150, y 209 kDa.



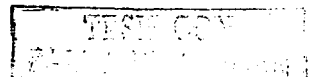
Utilizando sueros hiperinmunes bovinos contra *Anaplasma marginale*, se llevó a cabo inmunoblot del inmunógeno y se mostraron hasta 14 proteínas inmunoreactivas (Figura 4 y 5). En la Fig. 5 se muestra el perfil de proteínas inmunoreactivas en extractos de las tres cepas mexicanas de *A. marginale* purificados sin Percoll.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Cuadro I: Los datos clínicos de los terceros bovinos de la serie para la producción de los inmunógenos de *A. marginale*.**

Bovino	Cepa de <i>A. marginale</i>	Días antes de exang	TR un día antes de exang/°C	VCA un día antes de exang (%)	PEI (%)	Sangre congelada (litros)
No. 06	Méx-15	8	41.0	14	94	1.490
No. 09	Méx-17	7	40.8	21	67	1.745
No 11	Méx-30	10	39.9	16	76	1.604

**LEYENDA:** Los datos del tercer bovino de cada una de las tres series utilizado para producir sangre infectada. Bovino: el número del bovino de cada serie; Cepa de *A. marginale*: la cepa mexicana utilizada para producir sangre infectada; TR un día antes de exang/°C: temperatura rectal un día antes de exanguinar el bovino; VCA un día antes de exang (%): el volumen celular aglomerado en porcentaje un día antes de exanguinar; PEI (%): el máximo porcentaje de eritrocitos infectados al día de exanguinación; y sangre congelada (litros): la cantidad en litros de sangre procesada y congelada para usar en los estudios subsecuentes.

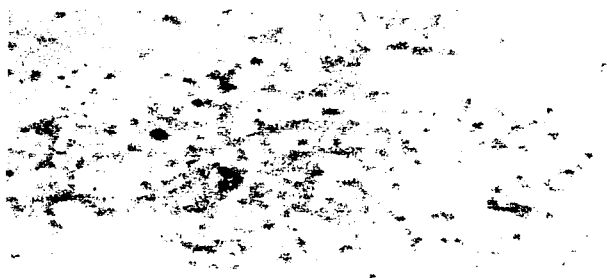


**Figura 1: Glóbulos rojos del bovino No. 06 infectado con *A. marginale* (Méx-15):**



**LEYENDA:** GRI del tercer bovino en la serie de las tres vaquillas (animal No. 06) utilizado para reactivar la cepa Méx-15. Se alcanzó en este bovino una rickettsemia impresionante de 94% al día 8 después de inoculación con 450ml de sangre a partir del bovino No. 08 infectada con la misma cepa. Los CI con su ubicación característica en la periferia del glóbulo rojo se muestran con una flecha blanca.

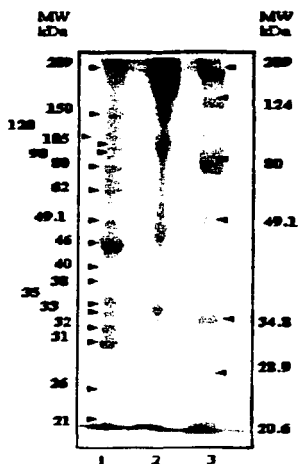
**Figura 2: Cuerpos Iniciales extra-eritrocíticos de la cepa Méx-17:**



***LEYENDA: Cuerpos iniciales de la cepa A. marginale (Méx-17) purificados como está descrito en materiales y métodos. Los CI aparecen como puntos redondos teñidos fuertemente en morado con el colorante Giemsa mientras que los residuos de las membranas eritrocíticas se ven aun como un fondo morado de menos intensidad.***

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

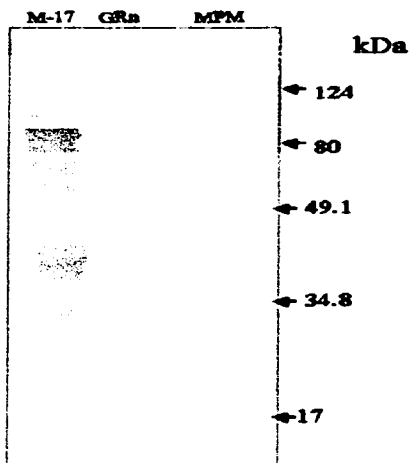
**Figura 3: Electroforesis de la proteína de la cepa Méx-17 en un gel a 10% de poliacrilamida.**



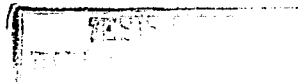
*LEYENDA: Para evaluar la calidad del extracto después de su purificación se probó en un gel proteína de la cepa Méx-17 de A. marginale (carril 1), proteína de GR no infectados (carril 2) y marcadores de PM (Bio-Rad).*

TESIS CON  
FALLA DE CENSUR

**Figura 4: Inmunoblot de la proteína de la cepa Méx-17 después de separación en un gel de poliacrilamida al 10%.**

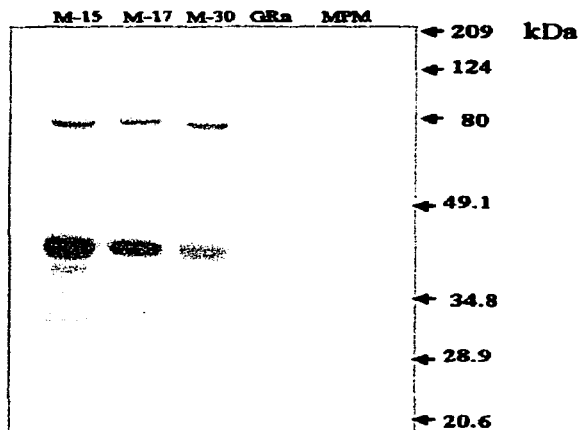


***LEYENDA: Después de purificación en Percoll al 30%, los extractos de la cepa Méx-17 de *A. marginale* (carril M-17), utilizando proteína de glóbulos rojos no infectados como control (carril GRn) se probó por su calidad en un inmunoblot con suero inmune a anaplasma para evaluar la conservación de los antígenos durante el largo proceso de la purificación. La imagen muestra 12 proteínas inmunoreactivas.***





**Figura 5: Inmunoblot de la proteína de las cepas Méx-15, Méx-17 y Méx-30 después de separación en un gel de polisacrilamida al 10%.**

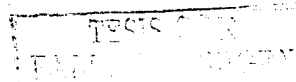


**LEYENDA:** Los carriles: M-15: extractos de la cepa *A. marginale* (Méx-15); M-17: extractos de la cepa Méx-17; M-30: extractos de la cepa Méx-30; GRn: proteína de glóbulos rojos no infectados y MPM: Marcadores de peso molecular (Broad Range, Bio-Rad).

### 3.4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:

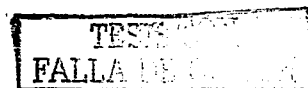
Hasta que sea ampliamente utilizado el cultivo celular para *A. marginale* la inoculación de bovinos esplenectomizados aunque es costosa y está asociada con numerosas desventajas sigue siendo la manera mas práctica para obtener inmunógenos de *A. marginale*. Notablemente en este estudio, se mostró que se puede alcanzar en el tercer bovino rickettsemias muy altas (94%, 76% y 67% para las cepas Méx-15, Méx-30 y Méx-17 respectivamente) cuando se inoculan bovinos esplenectomizados en serie de tres (Cuadro I). El tiempo para alcanzar estas rickettsemias para los tres bovinos fue: 7, 8 y 10 días respectivamente para los bovinos No. 9, 6 y 11 utilizados para reactivar las cepas Méx-17, Méx-15 y Méx-30 (Cuadro I). Estos resultados, particularmente los del bovino No 6, son muy comparables con los de González y col., (1983) en los cuales se reporta una rickettsemia de 97% en un bovino esplenectomizado e infectado con un aislado veracruzano de *A. marginale*. Sin embargo, en el estudio actual se alcanzaron estas altas rickettsemias con menos pases de sangre y en menos tiempo en comparación con el estudio de González y col., (1983). En éste último estudio se alcanzó la rickettsemia de 97% después de siete pases de sangre en bovinos esplenectomizados tardando hasta 15 días para exanguinar el séptimo bovino.

En cada uno de los terceros bovinos de la serie de tres utilizada para reactivar cada una de las tres cepas de *A. marginale*, hubo fiebre (Cuadro I) un poco antes del aumento logaritmico de la rickettsemia. Los ensayos de PAGE-SDS y de inmunoblot como pruebas de calidad (Fig. 3, 4 y 5), mostraron presencia en los extractos de *A. marginale* de proteínas, algunas altamente inmunogénicas. El reconocimiento de las proteínas inmunogénicas por sueros anti-Anaplasma en inmunolot implicó la conservación de los epitopos de células B por lo que se concluye que los antígenos, componentes del extracto de *A. marginale*, eran adecuadamente conservados. El uso de inhibidores de



proteasas como el PMSF y el EDTA a una concentración de 1mM ha sido utilizada por un sin número de investigadores para evitar la degradación de los antígenos durante el proceso de la purificación y parecería que parcialmente contribuyó en la conservación de los epítomos de los antígenos como se muestra en reconocimiento significativo en los inmunoblot en éstos estudios. El análisis del patrón de antígenos de las tres cepas resultó muy similar (Fig. 5) y esto está de acuerdo con lo que el grupo de de la Fuente publicó (2000) recientemente en donde se mencionan similitudes a nivel de DNA en las tres cepas.

A pesar de las cualidades positivas del inmunógeno utilizado en estos estudios, se recomienda que la investigación considere el desarrollo de otros métodos menos costosos y que sean aceptables en cuanto a la ética del uso de animales vivos para este tipo de estudios y en cuanto a la contaminación del antígeno con membranas de GR.



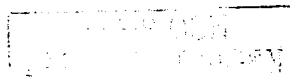
## CAPITULO IV

## (EXPERIMENTO II)

**ESTUDIOS DE LA INMUNIZACIÓN Y LA IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS ESPECÍFICOS RECONOCIDOS POR IgG2 EN TRES AISLADOS MEXICANOS DE *A. marginale*:**

**RESUMEN:**

Se ha propuesto que la protección contra la anaplasmosis se basa en una respuesta de linfocitos Th1 en asociación con la producción del isotipo del anticuerpos opsonizantes IgG2 (Brown y col., 1998). Con base en la capacidad para estimular este tipo de respuesta inmune, se han reportado hasta ahora sólo tres proteínas de la membrana denominadas MSP-1, MSP-2 y MSP-3 pero altamente variables. Para investigar la existencia de otros antígenos específicos reconocidos por IgG2 y capaces de estimular una respuesta celular *in vitro* en tres aislados mexicanos de *A. marginale* (Méx-15, Méx-17 y Méx-30), se estudiaron las respuestas humoral y celular en bovinos inmunizados con un inmunógeno derivado de eritrocitos infectados con la cepa Méx-17 y desafiados con la cepa Méx-30. El análisis de los sueros en ELISA y de los índices de estimulación *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en presencia de extractos de cada uno de los tres aislados, mostraron valores positivos en el periodo posinmunización sólo en los bovinos inmunizados. Los valores de hematocrito, rickettsemia y temperatura rectal durante el desafío fueron diferentes ( $p < 0.05$ ) entre los bovinos inmunizados y los testigos. En inmunoblots, los sueros pos-inmunización de bovinos inoculados reconocieron intensamente hasta 14 proteínas de las cuales 12 fueron específicamente reconocidas por IgG2 en extractos de las tres cepas estudiadas. Estas proteínas fueron reconocidas solo por



animales inmunizados e incluyen las MSP-1a, MSP-2 y MSP-5 ya reportadas pero además incluyen siete proteínas (PM 28, 33, 37, 50, 52, 56, 170 kDa) nunca antes reportadas en la literatura que inducen IgG2. La electroforesis en dos dimensiones (2-D), mostró proteínas novedosas ya demostradas en inmunoblot de una dimensión excepto las de 52, 56 y la de 170kDa. La proteína de "28 kDa" se resolvió en dos proteínas con distintos puntos isoeléctricos y distintos PM (27 kDa y 28 kDa) de las cuales sólo la última proteína fue reconocida por IgG2. En este mismo sistema, se observó una proteína adicional de 37 kDa que migraba junto con el MSP-2 pero que era una proteína distinta como lo sugirió su punto isoeléctrico. Se concluye que las nuevas proteínas reconocidas por IgG2 están asociadas a la protección de bovinos inmunizados y siendo proteínas de *A. marginale* se nombran desde aquí en adelante: **Am28, Am33, Am37, Am50, Am52, Am56 y Am170** respectivamente. Las letras "Am" corresponden a *A. marginale* y el número el aparente PM de la proteína.

#### 4.1 INTRODUCCIÓN:

La caracterización de antígenos inmunoprotectores de *A. marginale* derivados de glóbulos rojos infectados de bovinos, se ha intentado por varios investigadores y se puede llevar a cabo mediante el uso de una combinación de sistemas *in vivo* (en bovinos) e *in vitro* como el cultivo de PBMC provenientes de bovinos inmunizados. A lo largo del tiempo, se han utilizado varias técnicas para ensayar la respuesta que estimula una combinación de antígenos crudos de *A. marginale* y desde luego la que estimulan antígenos más puros basados en fracciones de proteínas de la membrana de esta rickettsia tanto como las proteínas de *A. marginale* expresada por colonias recombinantes de *E. coli*.

En un estudio por Carson y col., (1977) se comparó la respuesta celular en tres grupos de bovinos uno inmunizado con un inmunógeno vivo de una cepa virulenta, el segundo con inmunógeno atenuado y el tercero con uno inactivado de *A. marginale* mezclado con un adyuvante oleoso. Después de este estudio, otros científicos llegaron a establecer que la respuesta inmunoprotectoras en la anaplasmosis se asociaba con los macrófagos no sólo como células presentadora de antígeno (Cantor y col., 1993) sino también como células fagocíticas. En el modelo de inmunidad contra *A. marginale* postulado, se ha mostrado que los linfocitos T de tipo CD4+ juegan un papel central para dirigir la respuesta inmunoprotectora (Brown y col., 1998) a través la elaboración de un patrón de citocinas tipo Th1 (como: IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ ) las que modulan la respuesta inmune hacia la rama celular pero asociada con la producción del anticuerpo IgG2.

Un sin número de investigadores, en diferentes partes del mundo, han mostrado los perfiles de proteínas inmunogénicas en diferentes aislados de *A. marginale* por Western blot. Esta técnica, se basa principalmente en el uso de sueros de bovinos hiperinmunes anti-anaplasma para mostrar en membranas de nitrocelulosa antígenos



representativos de proteínas inmunogénicas de esta rickettsia. Después de establecer el modelo ampliamente aceptable del mecanismo de inmunoprotección contra la anaplasmosis, se puede ahora caracterizar más puntualmente los antígenos responsables para la protección utilizando como sondas, células del sistema inmune provenientes de animales vacunados y protegidos. Brown y col., (1998) han desarrollado el sistema en el cual se utilizan clones de células CD4+ para la identificación *in vitro* de antígenos responsables para la inmunoprotección. Estos métodos cuando se usan en combinación con anticuerpos monoclonales, cromatografía de afinidad, la del Western blot e inmunoprecipitación se pueden utilizar como herramientas indispensables para lograr resolver la tarea, antes muy compleja, de aislar antígenos involucrados en la inmunoprotección de la Anaplasmosis.

El propósito del presente estudio fue el de investigar la existencia de proteínas novedosas, diferentes de las MSP's ya conocidas, que posean cualidades inmunoprotectoras en tres cepas mexicanas de *A. marginale* para lo que sueros de animales vacunados y protegidos se usaron para el reconocimiento de dichas proteínas en western blots de una y dos dimensiones. Además, células mononucleares de sangre periférica de los animales vacunados y testigos se probaron en ensayos de linfoproliferación *in vitro* en presencia de extractos de las cepas de *A. marginale* antes mencionadas para determinar la capacidad de éstos extractos para inducir la mitosis, signo de estimulación inmune.

## **4.2 MATERIALES Y MÉTODOS:**

### **4.2.1 Animales Experimentales:**

Para los experimentos de inmunización y linfoproliferación *in vitro*, se compraron en el estado de Coahuila, zona libre de anaplasmosis y babesiosis, diez vaquillas de raza criolla/Hereford de 1.5 años

TESIS CON  
FALLA DE CUBRIR

promedio de edad. La selección de bovinos para los experimentos se hizo después de probar por ELISA sueros de los mismos a la Anaplasmosis. Al llegar a las instalaciones del CENID-PAVET, se los tomaron datos básicos; del hematocrito, peso corporal, temperaturas rectales (Tr) y se hicieron frotis delgados para destacar la presencia de hemoparásitos.

#### **4.2.2 Experimentos de Inmunización:**

##### **4.2.2.1 Preparación del inmunógeno experimental:**

El extracto de *A. marginale* purificado como está escrito en el Capítulo III se utilizó como inmunógeno experimental para la inmunización a una concentración de proteínas de 50µg/ml y por separado en dos adyuvantes, uno en el adyuvante Saponina Quila-A® a una concentración de 3mg/ml en PBS y el otro en el adyuvante IMS-1313 (SEPPIC) a la concentración recomendada por el fabricante. El antígeno se fijó durante 72 horas a 37°C en glutaraldehído diluido a 1:100 en solución salina de Puck y luego se realizaron dos lavados con la misma solución a 23,000×g, 4°C. El antígeno así fijado se mezcló con el adyuvante correspondiente y se utilizó en la inmunización de bovinos experimentales.

##### **4.2.2.2 Inmunización de bovinos:**

Los bovinos fueron divididos en cuatro grupos con los números correspondientes de identificación;

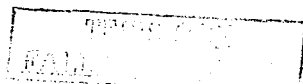
**Grupo Saponina (Bovinos No. 2411, 2417 y 2420):**

**Primera y Segunda inmunizaciones:**

- ❖ Extracto de *A. marginale*(fijación) + Saponina

**Tercera inmunización:**

- ❖ Extracto de *A. marginale* + Saponina





**Grupo IMS (Bovinos No. 2413, 2419 y 2624):**

Primera y Segunda inmunizaciones:

- ❖ Extracto de *A. marginale* (fijación) + IMS 1313:

Tercera inmunización:

- ❖ Extracto de *A. marginale* + IMS 1313:

**Grupo 3 (Bovinos No. 2414 y 2608):**

- ❖ Un placebo de IMS 1313 (en las tres inoculaciones)

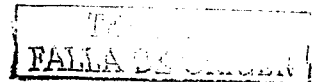
**Grupo 4 (Bovinos No. 2609 y 2612):**

- ❖ Un placebo de Saponina (en las tres inoculaciones)

Durante el periodo pre-inmunización y pos-inmunización, se tomaron, semanalmente muestras de sangre sin anticoagulante para obtener sueros para el ensayo inmunoenzimático (ELISA) específico y cada dos días otras muestras con el anticoagulante heparina para determinar el volumen celular aglomerado (VCA) por el método de micro-hematocrito y para hacer frotis delgados los cuales se tiñeron durante 5 minutos con el colorante de Giemsa diluido 1:3 en agua destilada. Los frotis se examinaron con el objetivo de inmersión  $\times 100$  bajo aceite. La sangre colectada con heparina se utilizó también para el aislamiento de PBMC para el ensayo de linfoproliferación *in vitro*. Después de tomar datos básicos se administró a los bovinos el inóculo correspondiente vía subcutánea a los días de 0, 21 y 93; al día 164 se llevó a cabo el desafío vía intramuscular de los bovinos inmunizados y los testigos con un  $1 \times 10^8$  GRi con la cepa Méx-30 altamente virulenta.

**4.2.3 Ensayo inmunoenzimático de ELISA indirecta:**

Durante los periodos de pre-inmunización, pos-inmunización y pos-desafío, semanalmente se tomaron muestras de sueros los cuales



fueron probados por ELISA indirecta para determinar la cinética de IgG. Para esto, se fijaron placas de 96 pozos (Corning) a 4°C durante una noche con el antígeno de la cepa Méx-31 solubilizado en 0.1% sulfato dodecil de sodio y diluido 1:200 en amortiguador de carbonatos a pH 9.6 según el protocolo descrito por Rodríguez y col., (1999). Después de la incubación las placas se lavaron a temperatura ambiente (TA) tres veces con amortiguador de fosfatos/Tween 20 al 0.05% a pH 7.4 (SSAF-T) y seguido por el bloqueo de las placas con una solución de leche descremada al 5% p/v en SSAF-T por 30 minutos a 37°C. Después de tres lavados como antes, se colocaron por duplicado, 200µl de una dilución 1:200 en SSAF-T de los sueros problemas; las placas se incubaron por 60 min a 37°C. Después de tres lavados como se describieron, se agregaron 200µl/pozo el conjugado anti-IgG bovino fosfatasa alcalina de origen de cabra diluido 1:10,000 en SSAF-T seguido por una incubación de 60 min a 37°C. Las placas se lavaron tres veces nuevamente y la reacción final se realizó con el sustrato p-nitrofenil fosfato a 0.075% en amortiguador de Tris pH 7.5 como está descrito (Rodríguez y col., 1999). Las placas se incubaron a 37°C por 30 min y se leyeron en un espectrómetro de placas a 405nm y los datos de densidades ópticas se analizaron para determinar la cinética de IgG.

#### **4.2.4 Estudios de linfoproliferación *in vitro*:**

##### **4.2.4.1 Preparación de reactivos:**

El medio RPMI-1640 (GIBCO Num. De Cat. 31800-014) que se utilizó para el cultivo celular se preparó utilizando agua deionizada (grado MilliQ) y estéril como solvente; se preparó 1 litro del medio RPMI-1640 como sigue: al agua se le agregaron los siguientes reactivos: 10.4g del medio RPMI-1640, 2g de bicarbonato de sodio, 6.5075g (25mM) de HEPES (ácido sulfónico de N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etano), 0.29222g (2mM) del aminoácido L-glutamina, 10,000U de



penicilina, estreptomocina a 10mg/ml (SIGMA), 50 $\mu$ M de 2-mercaptoetanol y suero fetal bovino (GIBCO BRL<sup>®</sup> No. 10437-010) al 10% v/v y el pH se ajustó a 7.4 y se esterilizó la solución por filtración a través de una membrana de 0.22 $\mu$ m y se almacenó a 4°C hasta su uso.

La solución balanceada de sales de Hanks (HYBRI-MAX<sup>®</sup> SIGMA No. H-6393) pH 7.4 (HBSS) se preparó disolviendo 9.8g de HBSS en polvo y 2g de bicarbonato de sodio en un volumen final de un litro de agua deionizada, se agregó gentamicina a 50 $\mu$ g/ml, se ajustó el pH a 7.4 y se filtró a través un filtro de 0.22 $\mu$ m y se almacenó a 4°C hasta su uso.

**4.2.4.2 Muestreo y aislamiento de células mononucleares:** Durante los periodos pre-inmunización, pos-inmunización y pos-desafío, a los bovinos se les tomaron muestras de sangre periférica con heparina como anticoagulante para el aislamiento de PBMC en gradientes de densidad de Histopaque (Ficoll-Paque<sup>™</sup> PLUS<sup>®</sup>; Amersham Pharmacia Biotech AB SE-751 84 Sweden) según el protocolo descrito por el productor (Amersham) y el de Brown y col., (1998) con algunas modificaciones. Para el aislamiento de PBMC, la sangre colectada se diluyó 1:3 en solución estéril balanceada de sales de Hank (HBSS), pH 7.4 con gentamicina a 50 $\mu$ g/ml y se centrifugó a 1500 $\times$ g a 4°C durante 15 minutos. La capa flogística se colectó en un tubo estéril y se diluyó volumen a volumen (v/v) con la HBSS. Utilizando una pipeta Pasteur, 4 partes de esta mezcla de glóbulos blancos (con GR contaminantes) en HBSS, se depositaron sobre 3 partes de la solución de Histopaque en un tubo estéril y se centrifugó a 1000 $\times$ g, 18°C durante 40 minutos para alcanzar la sedimentación diferencial de células componentes de la sangre. Después se transfirió con una pipeta estéril la fase flotante conteniendo las PBMC a un tubo estéril

THIS DON  
FALLA DE INGEN

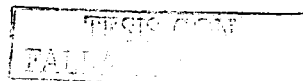
y se lavó por centrifugación en dos ocasiones en HBSS a  $400\times g$ ,  $4^{\circ}C$  por 10 minutos cada lavado. El sedimento se suspendió en 5ml de HBSS y se tomó una muestra para cuantificación de células.

Las células se diluyeron 1:5 en volumen final de  $500\mu l$ , tomando  $100\mu l$  de la suspensión celular,  $250\mu l$  de azul de Tripano 0.4% y  $150\mu l$  de HBSS. Las células se contaron en cuatro cuadrantes de un hemocitómetro (SIGMA; Bright-line hemacytometer) bajo un microscopio compuesto a  $40\times$ . Se calculó el promedio del número de células en los cuatro cuadros y, tomando en cuenta los factores de diluciones se hizo el conteo real que se utilizó para ajustar el número de PBMC en el medio RPMI-1640 para sembrar placas a  $5\times 10^5$  células/ $100\mu l$  y este número de PBMC se colocó por pozo.

#### **4.2.4.3 Ensayo de Linfoproliferación in vitro:**

Las PBMC se cultivaron *in vitro* en presencia de extractos de las proteínas de *A. marginale* (de todas las cepas; Méx-15, Méx-17, Méx-30 y Méx-31), proteína de glóbulos rojos no infectados (como un control negativo) y el mitógeno concanavalina-A (Con-A) como el control positivo a concentraciones de 2.5, 5.0,  $10.0\mu g/ml$ .

Trabajando en una campana de flujo laminar bajo condiciones estrictamente de esterilidad, las PBMC de cada animal se suspendió en RPMI-1640 a una concentración de  $5\times 10^5$  células por pozo en volúmenes de  $100\mu l$  y en triplicado en la placa. Se prepararon con el medio RPMI como vehículo de los tratamientos: extractos de *A. marginale*, de glóbulos rojos sanos (GRn) y el mitógeno Con-A. Se agregaron, a los  $100\mu l$  de suspensión celular depositados previamente en cada pozo, los  $100\mu l$  de las preparaciones con cada tratamiento dando la concentración final deseada. El esquema de la siembra de la placa fue de esta manera:



Blanco = células + medio RPMI-1640

Con-A = 2.5 µg/ml en el medio RPMI-1640 + células

Con-A = 5.0 µg/ml en el medio RPMI-1640 + células

Con-A = 10.0 µg/ml en el medio RPMI-1640 + células

Blanco = células + medio RPMI-1640

*A. marginale* = 2.5 µg/ml en el medio RPMI-1640 + células

*A. marginale* = 5.0 µg/ml en el medio RPMI-1640 + células

*A. marginale* = 10.0 µg/ml en el medio RPM-1640+ células

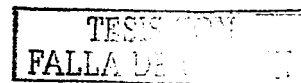
Blanco = células + medio RPMI-1640

GRn = 2.5 µg/ml en el medio RPMI-1640 + células

GRn = 5.0 µg/ml en el medio RPMI-1640 + células

GRn = 10.0 µg/ml en el medio RPMI-1640 + células

Las placas sembradas se incubaron durante cinco días a 37°C, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> a 5% en aire y humedad en una incubadora (Lab-line). El cuarto día de incubación cada pozo recibió 20 µl del reactivo 5-bromo-2-dioxiuridina (BrDU) diluida 1:100 en medio RPMI-1640, de acuerdo al manual de uso del kit comercial de proliferación celular (Amersham; Cell proliferation ELISA, Versión 2 Code RPN 250). Al quinto día de incubación se quitaron las placas de la incubadora y cuidadosamente se retiró el sobrenadante del medio y los pozos se secaron con un flujo de aire caliente a 60°C. Utilizando una pipeta multicanal se agregaron a todos los pozos 200 µl de la solución fijadora del kit (etanol) y se incubó la placa a temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos. Se retiró la solución fijadora y por pozo se agregó 200 µl de la solución de bloqueadora del kit diluida 1:10 en agua MilliQ (dando una solución del trabajo de 1% w/v de la proteína en 50mM Tris-HCl; 150mM NaCl, pH 7.4). Se retiró la solución bloqueadora después de una incubación de 30 minutos a TA y se agregaron 100 µl por pozo del conjugado anti-BrDU peroxidasa



diluido a 1:100 en la solución para dilución de anticuerpos del kit y se incubó a TA por 90 minutos. Después de este paso se llevaron a cabo tres lavados de 15 minutos cada uno con solución lavadora del kit (PBS 1x pH 7.4) a TA e inmediatamente se agregó 100µl por pozo del sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina en 15% v/v de dimetilsulfoxido (DMSO) una vez que se desarrolló suficientemente la reacción, ésta se detuvo con 25µl de ácido sulfúrico 1M. La placa se leyó a 450nm en un espectrofotómetro para placas en menos de 5 minutos de detener la reacción. El índice de estimulación se calculó dividiendo el promedio de los valores de densidad óptica (DO) a 450nm del contenido en los pozos con tratamiento entre el valor de DO del blanco para obtener valores de los índices de estimulación (IE) los cuales se graficó.

Índice de estimulación = DO de pozo con tratamiento/DO de pozo sin tratamiento.

Las graficas se utilizaron para la comparación de los IE de los diversos tratamientos. Se consideró positivo valores de  $IE \geq 2.0$ .

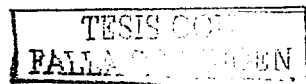
#### **4.2.5 Identificación de antígenos IgG1 e IgG2 específicos:**

##### **4.2.5.1 Inmunoblot en una dimensión:**

Para la identificación de antígenos reconocidos en una dimensión por IgG1 e IgG2, se modificó el protocolo de Western blot descrito en capítulo III para incluir pasos de incubación con los anticuerpos monoclonales de ratón anti-bovino IgG1 e IgG2 (Serotec Ltd., Oxford, Reino Unido). Utilizando geles preparativos de poliacrilamida SDS al 10%, se llevó a cabo la electroforesis de proteína de cada uno de los tres aislados de Méx-15, Méx-17 y Méx-30 en un sistema disociativo discontinuo de acuerdo a la técnica de Laemli (1970) como está descrita en el capítulo III. Se llevó a cabo



la transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Immobilon<sup>R</sup> Millipore) de  $0.45\mu\text{m}$  durante 3 horas a 200mA, las membranas se bloquearon durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  en solución de ASB al 5% en SSAF-Tween-20 al 0.05%. Al día siguiente se lavó en tres ocasiones por incubación a TA con agitación continua en SSAF-Tween-20/ASB al 1% pH; 7.4 (SSAF-T-ASB). Las membranas se secaron y guardaron hasta su uso. Para el ensayo final la membrana se lavó en dos ocasiones a TA con agitación continua en SSAF-T-ASB y se incubó con agitación continua a TA durante 2 horas con suero inmune contra *A. marginale* diluido 1:200 en SSAF-T-ASB. La membrana se lavó en tres ocasiones a TA en SSAF-T-ASB y se dejó en incubación con agitación continua a  $4^{\circ}\text{C}$  durante una noche con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG1 ó anti-IgG2 de bovino (Serotec Ltd., Oxford) diluido 1:100 en SSAF-T-ASB. Al día siguiente se siguió la incubación a TA durante 90 minutos más. Después se lavó en dos ocasiones como antes en SSAF-T-ASB y dos lavados más en amortiguador de Tris-Tween 20 al 0.05%/ASB al 1% pH 7.5 (T-T-ASB). Para la reacción enzimática, se incubó durante 1 hora a TA la membrana con el antisuero de cabra anti-IgG de ratón, conjugado a fosfatasa alcalina diluido a 1:5000 en T-T-ASB, seguido por 3 lavados de 5 minutos cada uno en T-T-ASB y se aplicó durante 5 min el sustrato pre-mezclado de BCIP/NBT [ $0.48\text{mM}$  NBT (azul de tetrazolio),  $0.56\text{mM}$  (fosfato de 5-bromuro-cloruro-3-indolil), Tris  $10\text{mM}$  y cloruro de magnesio  $59.3\text{mM}$  ( $\text{MgCl}_2$  SIGMA; No. B6404)]. La reacción enzimática se detuvo en un periodo promedio de 10 min con etanol al 70% seguido por agua destilada y se dejó la membrana para secarse en oscuridad. Las membranas se examinaron visualmente para evaluar la intensidad de bandas y una reacción positiva se tomó como una banda claramente revelada.



#### **4.2.5.2 Electroforesis en 2 dimensiones e inmunoblot para proteínas IgG1 e IgG2 específicas:**

##### **4.2.5.2.1 Electroforesis de doble dimensión:**

###### **a) Reactivos:**

i) Amortiguador de muestra:

Se prepararon 5ml amortiguador de solubilización de muestra de esta manera: Urea a 9M, 200µl de NP-40 (4% v/v), 500µl de glicerol (10%v/v), 100µl de 2-ME (2%v/v) y de 100µl de anfolitos de rango de pH 3-10 (2%v/v), con agua deionizada se ajustó el volumen final a 5ml. Un miligramo de proteína del antígeno de *A. marginale* (Méx-17) se sedimentó por centrifugación a 10.000×g, 4°C y el sedimento se suspendió en 250µl del amortiguador de solubilización durante 2 horas a TA, después se centrifugó a 10.000×g, 4°C durante 2 horas y el sobrenadante se repartió en alícuotas de 30µl, de los cuales se utilizaron 5µg de proteína por carril en geles de la primera dimensión.

ii) Preparación del amortiguador de pre-corrida

El amortiguador de pre-corrida: urea a 8M, 250µl de NP-40 (5% v/v), 250µl de 2-ME (5% v/v) 50µl de anfolitos (1% v/v) de rango de pH 3-10 y todo disuelto en agua deionizada y se ajustó el volumen final a 5ml. La solución se filtró a través un filtro de 0.22µm

iii) Amortiguador para la cámara superior: Hidróxido de sodio a 20mM en agua deionizada.

iv) Amortiguador de la cámara inferior: Ácido fosfórico a 10mM en agua destilada.

###### **b) Preparación del gel de la primera dimensión y el enfoque iso-eléctrico:**





La electroforesis de doble dimensión Se llevó a acabo según el método de O'Farrel (1975). Las proteínas se separaron en la primera dimensión por enfoque isoeléctrico en un gradiente de pH de 3-10 en geles cilindricos de poliacrilamida al 4% preparados en tubos capilares. Para el gel de electroenfoco se mezclaron los siguientes reactivos; urea 9.5M, agua destilada 3ml, solución monómero (acrilamida, 30%; bisacrilamida, 0.8%) 1ml, 150 $\mu$ l de NP-40 (2% v/v) y 375 $\mu$ l de anfólitos (2% v/v) rango de pH 3-10 y se agitó para disolver la urea, la solución se filtró a por una membrana de 0.22 $\mu$ m. A esta solución, se agregaron 35 $\mu$ l de persulfato de amonio al 10% y 8 $\mu$ l del reactivo de TEMED y de inmediato se vació en los tubos capilares dejando dos cm en la parte superior del gel en el cual se agregó 2mm<sup>3</sup> de agua destilada y se dejó polimerizar durante una hora.

Los tubos se ensamblaron en una cámara de electroforesis (Hoefer Scientific Inst) y cada uno de ellos se cargó con 10 $\mu$ l de amortiguador de muestra seguido por 10 $\mu$ l de amortiguador de pre-corrida, la cámara superior se llenó con 20mM de NaOH y la cámara inferior con 10mM de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Para crear el gradiente de pH los geles se enfocaron a 200V durante 2 horas. Se apagó la fuente de electricidad y por cada gel, se cargó un volumen de muestra equivalente a 5 $\mu$ g de proteína de *A. marginale* en amortiguador de solubilización de muestra; con una jeringa de Hamilton, la muestra se cubrió con 10 $\mu$ l de amortiguador pre-corrida seguido por 20mM NaOH. Con el sistema de enfriamiento conectado al aparato Los geles se corrieron a voltaje constante de 700V durante 16 horas y 800 V en la última hora bajo condiciones de refrigeración, los geles se extrajeron se dejaron a -70°C hasta la electroforesis en la segunda dimensión.

**c) Electroforesis en la segunda dimensión:**

Siguiendo el sistema de PAGE-SDS (Laemmli, 1970) se preparó un gel de separación de 12.5% con un gel de preseparación de 4%. El gel de la primera separación se colocó sobre el gel preseparación y se agregaron 500µl de agarosa tibia al 1% en amortiguador de muestra de SDS (Tris a 0.25M, glicina a 0.192M, SDS al 0.1%p/v y agarosa al 1%p/v) y se dejó durante 5 para solidificar. En un pozo del gel de preseparación se agregaron marcadores de PM (BioRad; marcadores preteñidos, No. de Cat. 161-0318, Bio-Rad), y en otro 5µg de proteína de *A. marginale* (Méx-17) en buffer de muestra de SDS. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante de 110V durante 2 horas.

**i) Tinción del gel con la técnica de plata:**

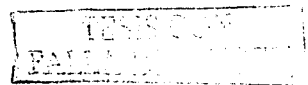
Un gel paralelo, se tiñó con tinción de plata (No de Catalogo 161-0443) para revelar las proteínas separadas como está descrito en este capítulo y de acuerdo al productor

**ii) Inmunoblot para proteínas IgG e IgG2 específicas:**

Geles de segunda dimensión transferidos de acuerdo a lo descrito anteriormente se usaron para la identificación de proteínas reconocidas por IgG's, IgG1 e IgG2, utilizando suero post-inmunización de un bovino protegido y un antisuero de cabra anti-IgG de bovino conjugado con fosfatasa alcalina y el sustrato BCIP/NBT, para demostrar antígenos reconocidos por IgG1 e IgG2 el inmunoblot se hizo según el protocolo estándar para antígenos IgG2 específicos como se describió anteriormente.

**4.2.6 Identificación de MSP con anticuerpos específicos:**

Para la identificación de las MSP-1a, MSP-1b, MSP-2 y MSP-5 ya conocidas, membranas con los extractos de Méx-17 se incubaron con



los siguientes reactivos a concentración recomendada de  $2\mu\text{g/ml}$  (Guy Palmer, comunicación personal): anticuerpo monoclonal (AbM) Ana22B1 específico para MSP-1a, anti-suero de conejo (donado por Dr. De la Fuente, Universidad de Oklahoma) específico para la MSP-1b y suero murino mono específico policlonal MSP-2/3 específico para MSP-2 y MSP-3, AbM-AnaF16C1 específico para MSP-5 y un AbM no específico (anti-*Trypanosoma brucei*) Tryp1E1 como control negativo (amablemente donados por Guy Palmer, *Washington State University*). Después de una incubación a  $4^{\circ}\text{C}$  con agitación continua toda la noche con el AbM (o el anticuerpo específico policlonal) las membranas se lavaron tres veces con SSAF-T por 5 min, y se probaron durante dos horas con el antisuero de cabra anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina diluida a 1:5000 en SSAF-T seguido por tres lavados como antes y se revelaron las membranas con el sustrato BCIT/NTB como se describió anteriormente.

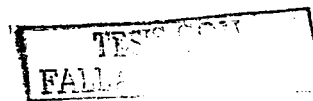
#### **4.2.7 Toma y evaluación de datos clínicos en el periodo posdesafío:**

Para evaluar la protección durante el periodo del desafío de los bovinos inmunizados y los testigos se registraron datos clínicos incluyendo rickettsemia, expresada como el porcentaje de eritrocitos infectados (PEI), volumen celular aglomerado (VCA) y la temperatura rectal (Tr), estos valores se evaluaron como está descrito en el capítulo III. Los resultados se analizaron con la prueba T de student a un valor de p de 0.05 en el caso de promedios de los datos clínicos de los grupos de bovinos vacunados.

### **4.3 RESULTADOS:**

#### **4.3.1 Respuestas humoral y celular:**

##### **4.3.1.1 ELISA indirecta:**



Al inicio del experimento, los sueros de todos los animales fueron negativos en ELISA a anticuerpos contra *A. marginale*. Solo los animales inmunizados mostraron una respuesta de IgG detectada en una semana después de la tercera inmunización (Gráfica 1) mientras que no hubo ninguna respuesta en los testigos. Esta respuesta de IgG mostrada como valores de densidad óptica (DO), fue posterior al inicio de la respuesta celular observada en la misma semana de la tercera inmunización. El análisis de los promedios de los valores de DO para los grupos vacunados mostró que fueron similares estadísticamente ( $p > 0.05$ ).

#### **4.3.1.2 Linfoproliferación in vitro:**

Al inicio del experimento, todos los animales fueron negativos al ensayo de linfoproliferación *in vitro* ( $IE < 2.0$ ), en presencia de extractos de la cepa Méx-17 de *A. marginale* y GR no infectados. Al igual que la respuesta humoral, la respuesta al ensayo de LP empezó a ser detectada a partir de la semana siguiente a la tercera inmunización y se mantuvo durante las siguientes cinco semanas hasta que se suspendió temporalmente el ensayo de LP. Durante este periodo los índices de estimulación (IE) en los dos grupos fueron muy semejantes ( $p > 0.05$ ) [Gráfica 2]. En la cuarta semana después de la tercera inmunización, se realizó el ensayo de LP en presencia de 2.5 µg de proteína de extractos de las cuatro cepas mexicanas de *A. marginale* (Méx-15, Méx-17, Méx-30 y Méx-31) y de proteína de GR no infectados. En este momento, se registraron valores de IE superiores a 7.0 para las primeras tres cepas y un IE de 4.47 para la cepa Méx-31 (Gráfica 3) en los animales inmunizados pero los IE se mantuvieron a un valor negativo ( $< 2.0$ ) en los dos testigos. Al ensayar la respuesta de LP en la semana 12 después de la tercera inmunización, se mostró que los IE habían disminuido a valores menores a índices de 2 (datos no mostrados). En este periodo, los dos testigos (No. 2612 y No.

2608), inoculados con placebo del adyuvante saponina o del IMS fueron negativos a ambos ensayos LP y ELISA (Gráficas 1 y 2). En la Fig. 6, se muestra en forma representativa, una placa del ensayo de ELISA para proliferación celular en la cual el bovino inmunizado (No. 2420) muestra una respuesta positiva de LP contra extractos de la cepa Méx-17 mientras que no hubo respuesta en el bovino testigo (No. 2612). Los dos bovinos muestran una LP positiva contra el mitógeno concanavalina A, mientras que no hubo respuesta detectable contra proteína de GR no infectados.

Para la semana 2 pos-desafío (Cuadro V), se observa ya una respuesta de IE >2.0 en los dos grupos inmunizados y en el testigo del grupo saponina (no se pudo obtener los datos de LP una semana después de la tercera inmunización por condiciones inevitables). Aún cuando la respuesta de LP contra los extractos de las dos cepas, Méx-17 (cepa inmunizante) y Méx-30 que se utilizó para el desafío fue semejante, por lo general resultó un poco más alto en la cepa inmunizante Méx-17 (Cuadro V). Solo en la segunda semana pos-desafío, los IE en el grupo saponina de bovinos inmunizados fueron comparativamente más altos contra el antígeno de Méx-30 que contra el antígeno de Méx-17. El animal testigo No. 2612 mostró una respuesta positiva para la segunda semana pero ésta descendió para la tercera semana. El testigo del grupo IMS (No. 2608) empezó a mostrar una respuesta positiva para la semana 3 pos-desafío, antes de morir en la semana 4 posdesafío (Cuadro V). En todos de los casos, el ensayo de LP mostró que para la semana 7 posdesafío, los IE habían caído por debajo del valor 2.0.

Tres semanas después del desafío, cuatro de los seis bovinos inmunizados de los dos grupos (Bovinos no. 2411, 2413, 2419 y 2420) desarrollaron una rickettsemia que era estadísticamente menor ( $p < 0.05$ ) que la que desarrollaron los testigos (Cuadro II, III y IV;

TESIS CON  
FALLA DE CALIFICACION

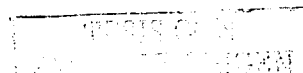
Gráfica 9). Sin embargo, una de los animales inmunizados (No. 2624, grupo IMS), desarrolló una rickettsemia máxima de 17.6% con un VCA mínimo de 8% antes de morir (Cuadro II, III y IV). La segunda vaquilla (No. 2417) de los bovinos inmunizados estaba gestante y parió a un becerro alrededor del día en que se presentó el pico de la infección experimental, mostró un cuadro grave de la Anaplasmosis acompañada por una rickettsemia de 7.5% y un VCA de 6% antes de morir. Los otros animales inmunizados mostraron muy bajas rickettsemias máximas de; 2.4% (No. 2411), 2.3% (No. 2420), 4.1% (No. 2413) y 4.5% (No. 2419) que fueron significativamente ( $p < 0.05$ ) menores que las de los testigos.

Los dos testigos desarrollaron rickettsemias de 30.4% (No. 2612 testigo/saponina) y 12.6% (No. 2608 testigo/IMS) con VCA mínimo de 6% y 8% respectivamente (Cuadros II, III y IV). El testigo No. 2608 murió a pesar de haber sido tratado con oxitetraciclina mientras que el testigo No. 2612 sobrevivió pero mostró una infección grave caracterizada por fiebre, anorexia y palidez de mucosas.

Considerando los promedios de los grupos (Cuadro II, III y IV; Gráfica 9), el periodo de prepatencia de los dos grupos inmunizados fue de 22 días (Cuadro IV) mientras que fue 18 y 20 días para los dos testigos No. 2608 y 2612 respectivamente.

Los promedios por grupos de las Tr (Gráfica 8) mostraron una fiebre difásica de 40°C y 40.1°C para los animales inmunizados del grupo IMS a los días 22 y 28 pos-desafío respectivamente (Cuadro III). Los animales que mostraron signos clínicos del grupo saponina no mostraron fiebre, en contraste, se registró una fiebre difásica de 40.6°C el día 22 y de 41.3°C los días 26 hasta el día 28 (41.6°C) pos-desafío en el testigo saponina y una de 41.5 y 41.6°C a los días 22 y 30 respectivamente en el testigo IMS.

Como se muestra en el Cuadro IV, el porcentaje de la disminución del VCA en los diferentes grupos de bovinos fue:  $62.2 \pm 18.3$  (grupo



saponina),  $71 \pm 5.8$  (grupo IMS) en comparación con los dos testigos: 83.3% (Bovino No. 2612) y 77.1% en el caso del bovino No. 2608. Considerando todos los bovinos inmunizados, el animal No. 2420 mostró la menor disminución de VCA de 46.6% mientras que el bovino que estaba gestante (No. 2417) mostró una alta disminución de VCA de 82.3% tanto como el bovino No. 2624 con una disminución de VCA de 77.7% (Cuadro IV).

#### **4.3.2 Antígenos inductores de IgG, IgG1 e IgG2:**

El análisis por inmunoblot de una dimensión mostró (Fig. 8) hasta 14 proteínas reconocidas por el suero de los animales inmunizados. Las 14 proteínas observadas caen en el rango de PM entre 15 y 209kDa y mostraron un perfil muy parecido en las tres cepas. El inmunoblot para proteínas IgG1 y IgG2 específicas mostró 10 proteínas IgG2 específicas de 19, 28, 33, 37, 50, 56, 75, 84, 100, 170 kDa de PM, en las cepas Méx-17 y Méx-30 (Fig. 9) mientras que en la cepa Méx-15 se demostró una proteína adicional de 52kDa. Estas mismas proteínas fueron observadas cuando se probaron contra IgG1 pero el suero del bovino que mostró una completa falta de protección (No. 2426) las reconoció con mínima intensidad cuando fueron probadas para especificidad de IgG2 aun cuando fueron fuertemente reconocidas por IgG1 (Fig. 14). En geles de separación por peso molecular, los antígenos de PM de 37 y 75 kDa parecieron como bandas dobles (Fig. 10) lo que fue comprobado cuando las proteínas se separaron en dos dimensiones (Fig. 16). Las proteínas IgG2 específicas solo fueron reconocidas por suero de un animal inmunizado y protegido (No. 2420) sin ningún reconocimiento por suero de un testigo (No. 2612). Un resultado espectacular de este estudio, los sueros de un bovino inmunizado (No.2624) con índices mínimos de protección mostraron carencia relativa de la respuesta de IgG2 al inmunoblot (Figura 14) pero una respuesta inmunodominante de IgG1.

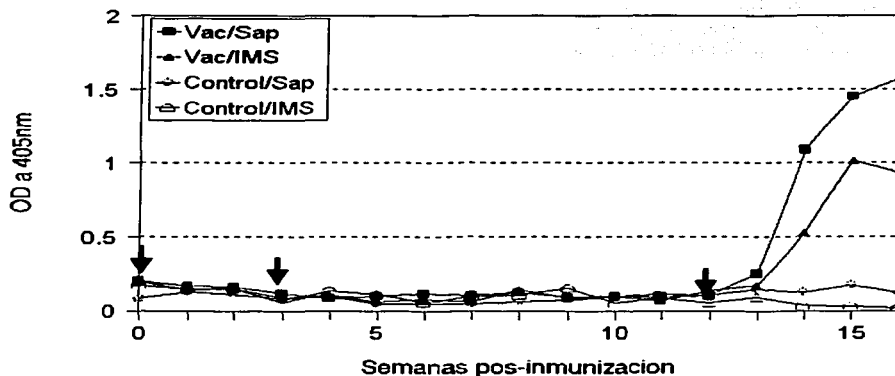
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### **4.3.3 Inmunoblot para las MSP:**

El uso de anticuerpos específicos en inmunoblots lineales confirmó la presencia de las proteínas: MSP-1a, MSP-2 y MSP-5 en la cepa Méx-17 con PM de 75, 37 y 19 kDa respectivamente (Fig. 11). El anticuerpo monoclonal específico para MSP-1b confirmó presencia de esta proteína en todas de las tres cepas estudiadas. Interesantemente este anticuerpo reconoció dos proteínas una de 84kDa y la otra de 100kDa. Basado en los PM y las características de migración en geles de poliacrilamida y inmunoblot, se consideran que la segunda proteína mostrada en inmunoblot de dos dimensiones con PM de 75kDa sea la MSP-3 (Fig. 14) aunque todavía no esta confirmada con anticuerpos específicos.

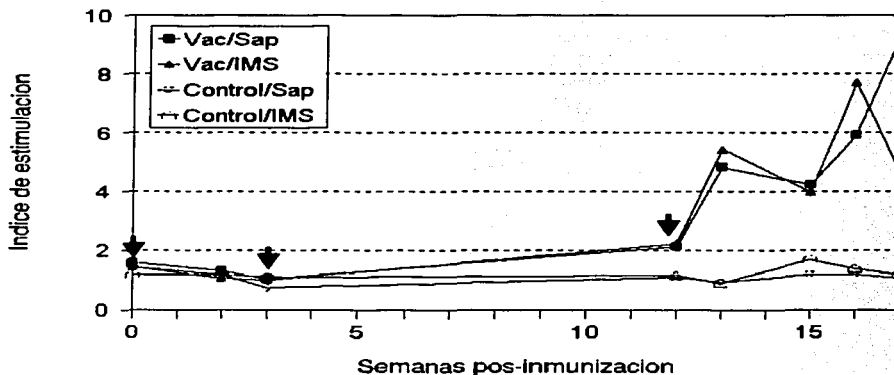


**Gráfica 1: Cinética de IgG en bovinos experimentales durante el periodo posinmunización:**



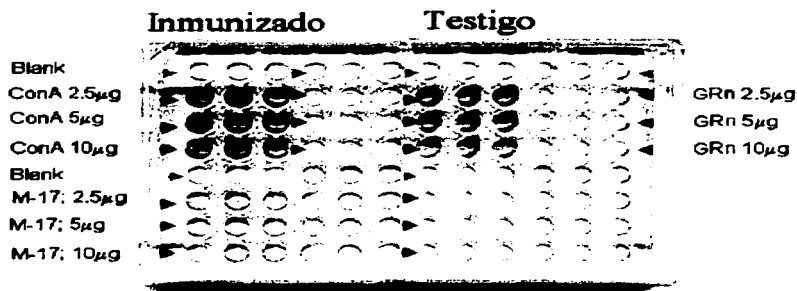
**LEYENDA:** Dos grupos inmunizados: i) Vac/Sap: inmunizado con inmunógeno de *A. marginale* (Méx-17) en el adyuvante saponina ii) Vac/IMS: inmunizado con inmunógeno en el adyuvante IMS 1313. iii) Control/saponina: El testigo que recibió un placebo de saponina y iv) Control/IMS: el otro testigo que recibió un placebo de IMS 1313. Los tres bovinos de cada uno de los dos grupos inmunizados recibieron vía subcutánea 100µg de proteína de *A. marginale* (Méx-17) en el adyuvante correspondiente a los días 0, 21 y 93 (flechas) mientras que uno de los testigos recibió el placebo de 6mg de saponina en 2ml de solución salina de Puck pH 7.4 y el otro de 1ml del adyuvante IMS.

**Gráfica 2: Cinética de la respuesta celular de PBMC en bovinos experimentales durante el periodo posinmunización:**



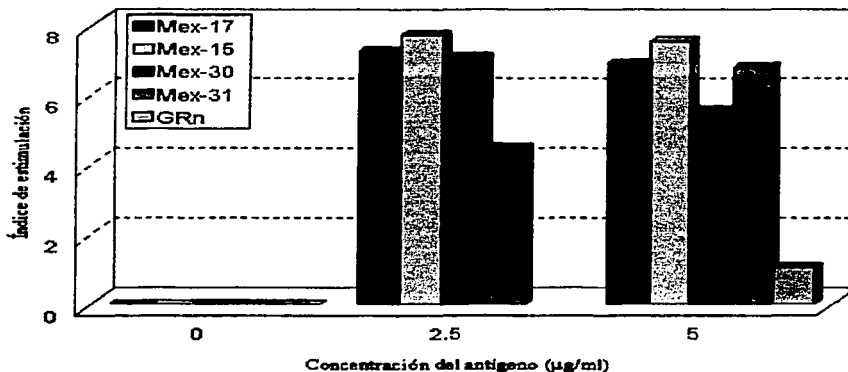
**LEYENDA:** Dos grupos inmunizados: i) *Vac/Sap*: inmunizado con inmunógeno de *A. marginale* (Méx-17) en el adyuvante saponina ii) *Vac/IMS*: inmunizado con inmunógeno en el adyuvante IMS 1313. iii) *Control/saponina*: El testigo que recibió un placebo de saponina y iv) *Control/IMS*: el otro testigo que recibió un placebo de IMS 1313. Los tres bovinos de cada uno de los dos grupos inmunizados recibieron vía subcutánea 100µg de proteína de *A. marginale* (Méx-17) en el adyuvante correspondiente a los días 0, 21 y 93 (flechas) mientras que uno de los testigos recibió el placebo de 6mg de saponina en 2ml de solución salina de Puck pH 7.4 y el otro de 1ml del adyuvante IMS.

**Figura 6: Proliferación celular de un bovino inmunizado y un testigo una semana después de la tercera inmunización:**



**LEYENDA:** El ensayo de linfoproliferación in vitro después de cultivar linfocitos de sangre periférica a 37°C y CO<sub>2</sub> a 5% en presencia del inmunógeno de *A. marginale* (M $\acute{e}$ x-17), y como controles antígeno de GR bovinos sanos y el mitógeno Con-A a concentraciones diferentes.

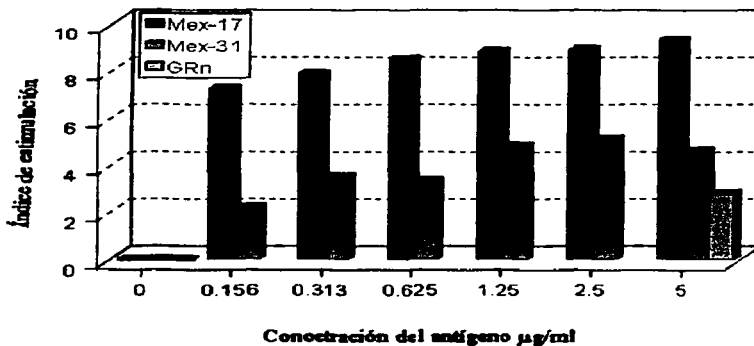
**Gráfica 3: Índices de estimulación de PBMC provenientes de un bovino inmunizado con Méx-17 y cultivados *in vitro* en presencia de extractos de cuatro cepas mexicanas de *A. marginale*.**



**LEYENDA:** Los IE representan la respuesta de linfoproliferación del bovino inmunizado No. 2417 cuatro semanas después de la tercera inmunización.

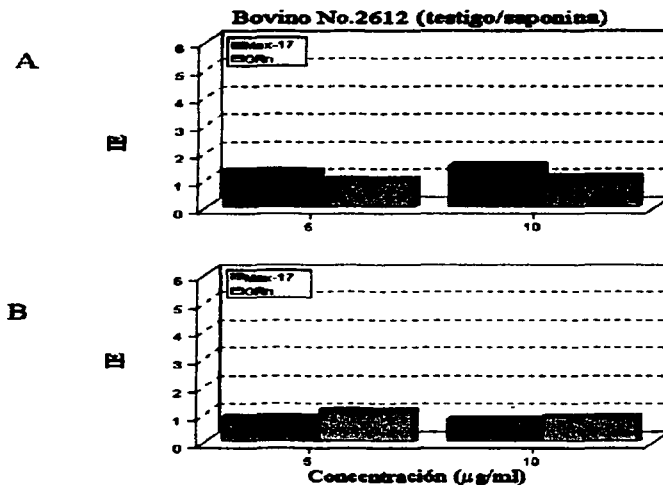
ESTADO DE GUERRERO  
SECRETARÍA DE SALUD  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE GUERRERO

**Gráfica 4: Índices de estimulación de PBMC provenientes de un bovino inmunizado y cultivados en presencia de extractos de las cepas Méx-17 y Méx-31 de *A. marginale* 17 semanas pos inmunización**



**LEYENDA:** Las IE representan la respuesta del bovino No. 2420 inmunizado cuatro semanas después de la tercera inmunización.

**Gráfica 5: IE de un bovino testigo en los periodos pre-inmunización y pos-inmunización:**

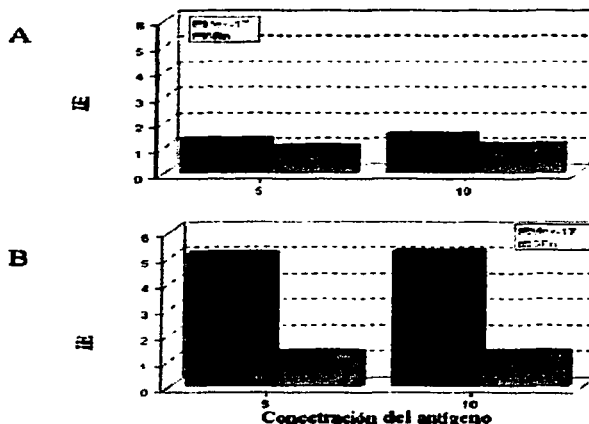


**LEYENDA:** Índices de estimulación en PBMC provenientes del testigo No. 2612 y cultivados en presencia de extractos de la cepa MEX-17 de *A. marginale* (MEX-17) y de proteína de GR no infectados (GRn) a dos concentraciones diferentes, en los periodos: pre-inmunización A) y periodo pos-inmunización B).

TESIS  
FALLA

**Gráfica 6: IE de un bovino inmunizado en el periodo pre-inmunización y una semana después de la tercera inmunización:**

**Bovino No. 2420 (inmunizado/grupo saponina)**



**LEYENDA:** Índices de estimulación en PBMC provenientes del bovino inmunizado No. 2420 y cultivados en presencia de extractos de la cepa Méx-17 de *A. marginale* (Méx-17) y de proteína de GR no infectados (GRn) a dos concentraciones diferentes, en los periodos: pre-inmunización A) y periodo pos-inmunización B).

Cuadro II : Datos clínicos de los bovinos del grupo saponina durante el periodo del desafío:

Días postdesafío	0	2	6	9	13	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	
<b>2411</b>	VCA(%)	38	22	23	23	22	16	21	19	16	18	20	19	20	22	21	20	20	20	22	25	
	RT	<b>38.7</b>	<b>39.7</b>	<b>39</b>	<b>39.8</b>	<b>39.2</b>	<b>39.2</b>	<b>38.9</b>	<b>39</b>	<b>38.9</b>	<b>39</b>	<b>39.2</b>	<b>39.5</b>	<b>39.3</b>	<b>39.4</b>	<b>39.7</b>	<b>38.9</b>	<b>38.9</b>	<b>38.9</b>	<b>38.8</b>	<b>39.1</b>	<b>38.8</b>
	PEI (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.9	2.4	0	0	0.9		2	0	0	0	0	0
<b>2420</b>	VCA(%)	30	22	25	30	30	23	25	23	25	22	27	19	20	21	20	18	20	16	19	24	20
	RT	<b>39.1</b>	<b>39.8</b>	<b>39.8</b>	<b>39.4</b>	<b>38.8</b>	<b>38.8</b>	<b>39</b>	<b>39</b>	<b>38</b>	<b>39.1</b>	<b>39.5</b>	<b>39.5</b>	<b>39.3</b>	<b>39</b>	<b>39.2</b>	<b>38.7</b>	<b>38.7</b>	<b>38.8</b>	<b>39</b>	<b>39.8</b>	<b>39</b>
	PEI (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.6	0	2.3	1.6	2	0	0	0	0	0	0	0
<b>2417</b>	VCA(%)	34	28	25	27	30	25	27	26	25	20	20	10	6	8							
	RT	<b>39</b>	<b>40.3</b>	<b>40</b>	<b>40.2</b>	<b>39.8</b>	<b>39.4</b>	<b>39.3</b>	<b>39.5</b>	<b>40</b>	<b>40.4</b>	<b>40.2</b>	<b>39.9</b>	<b>39.5</b>								
	PEI (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	1.1	7.5	5.6	8.1	4.5								
<b>Medios de grupo</b>	VCA(%)	34	24	24	26.7	27.3	21.3	24.3	22.7	22	20	22.3	16	15.3	17	20.5	19	20	18	20	23	23
	RT	<b>38.9</b>	<b>39.9</b>	<b>39.5</b>	<b>39.8</b>	<b>39.3</b>	<b>39.1</b>	<b>39.2</b>	<b>39</b>	<b>39.5</b>	<b>39.8</b>	<b>39.6</b>	<b>39.4</b>	<b>39.2</b>	<b>39.5</b>	<b>38.8</b>	<b>38.8</b>	<b>38.8</b>				
	PEI (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0.4	3.3	2.7	3.5	2	1		1	0	0	0	0	0
<b>2612 (Testigo)</b>	VCA(%)	30	27	32	34	36	24	21	25	25	19	9	7	6	6	13	16	18	18	24	25	
	RT	<b>38.9</b>	<b>40.1</b>	<b>39.5</b>	<b>39.8</b>	<b>39</b>	<b>39.3</b>	<b>38.5</b>	<b>39.2</b>	<b>40.6</b>	<b>39</b>	<b>41.3</b>	<b>41.6</b>	<b>39.7</b>	<b>39.5</b>	<b>39.8</b>	<b>39.5</b>	<b>39.7</b>	<b>39.1</b>	<b>39</b>	<b>39.1</b>	<b>39</b>
	PEI (%)	0	0	0	0	0	0	0	1	7	17	30.4	23.3	5.2	0	0	0	0	0	0	0	0

**Leyenda:** VCA(%) = Volumen celular aglomerado expresado en porcentaje

RT = Temperatura rectal en grados centígrados

PEI (%) = Porcentaje de eritrocitos infectados



Cuadro III: Datos clínicos para los bovinos durante el periodo del desafío (Grupo IMS 1313):

Días postdesafío		0	2	6	9	13	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46
2413	VCA(%)	34	26	27	28	26	21	23	21	19	16	11	14	19	19	20	19	22	20	20	22	29
	RT	38.7	39.8	39	39.4	39.6	39.2	39.6	39.8	40.5	40.3	40	39.5	39.3	39.2	39.9	39.1	38.4	38.6	38.6	39.2	39
	PEI (%)	0	0	0	0	0	0	1	3	4.1	1.8		1.6	0.9		1.7	0	0	0	0	0	0
2419	VCA(%)	31	34	34	28	27	25	29	32	23	22	19	16	16	18	16	12	15	18	20	21	23
	RT	38	38.9	39.2	39.3	39.2	39.3	38.9	39	39.7	39.3	39.2	40.4	39.3	39.8	39.9	40.2	39.6	39.6	39.2	39.8	39.2
	PEI (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.9	1	4.3	4.5	2.9		2.8	1	0	0	0	0
2624	VCA(%)	36	28	29	30	33	25	29	30	27	21	22	20	14	8	9	10					
	RT		39.5	39.6	39.6	39.2	39.2	39.3	39.3	39.7	39.5	39	40.5	40.5	39.5	39.6						
	PEI (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.1	2.3	6	17.6	7	5.5	4.3					
Medios de grupo	VCA(%)	33.7	29.3	30	28.7	29.5	23.7	27	27.7	23	19.7	17.3	16.7	16.3	15	15	13.7	18.5	19	20	22	26
	RT	38.4	39.4	39.3	39.4	39.3	39.2	39.3	39.4	40	39.7	39.4	40.1	39.7	39.5	39.5	39.7	39	39.2			
	PEI (%)	0	0	0	0	0	0	0.3	1	1.4	1.3	1.7	4	7.7	5	3.6	2.4	0.3	0	0	0	0
2606 (Testigo)	VCA (%)	35	35	31	36	35	29	33		20	20	10	16	12	8							
	RT	38.5	39.4	39.2	39.2	39	39.3	38.3		41.5	39	38.8	39.4	41.6	39.9							
	PEI (%)	0	0	0	0	0	0	1		10	12.6	5.5	10	4.5	5.1							

**Leyenda:** VCA(%) = Volumen celular aglomerado expresado en porcentaje

RT = Temperatura rectal en grados centígrados

PEI (%) = Porcentaje de eritrocitos infectados

**Cuadro IV: Datos clínicos de los bovinos experimentales durante el periodo pos-desafío:**

No de animal	Max PEI <sup>a</sup>	Periodo de prepatencia <sup>b</sup>	VCA inicial <sup>c</sup>	VCA mínimo <sup>d</sup>	% de reducción del VCA <sup>e</sup>
<b>Bovinos inmunizados con <i>A. marginale</i> + saponina</b>					
2411	2.4	24	38	16	57.8
2417*	7.5	22	34	6	82.3
2420	2.3	20	30	16	46.6
Promedio ± de	4.1 ± 3	22 ± 2	34 ± 4	12.7 ± 5.8	62.2 ± 18.3
2612 Testigo	30.4	20	36	6	83.3
<b>Bovinos inmunizados con <i>A. marginale</i> + IMS</b>					
2413	4.1	18	34	11	67.6
2419	4.5	24	34	11	67.6
2624	17.6	24	36	8	77.7
Promedio ± de	8.7 ± 7.7	22 ± 3.5	34.7 ± 1.2	10 ± 1.7	71 ± 5.8
2608 Testigo	12.6	18	35	8	77.1

**LEYENDA:**

<sup>a</sup> Porcentaje máximo de eritrocitos infectados (PEI) durante la infección experimental posdesafío.

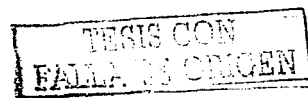
<sup>b</sup> Periodo de prepatencia tomado como el periodo desde la inoculación con la cepa heteróloga hasta el momento en que se detectó una rickettsemia por microscopia.

<sup>c</sup> VCA se obtuvo promediando los dos valores registrados al inicio del experimento

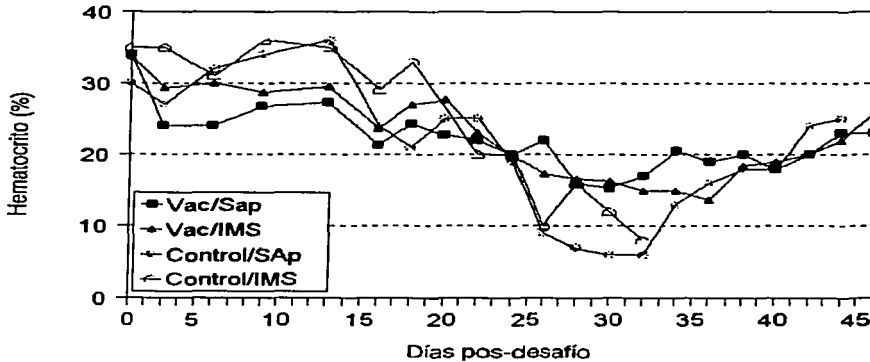
<sup>d</sup> Valor de VCA más bajo observado posterior al desafío.

<sup>e</sup> La reducción en el VCA se determinó promediando los primeros dos valores de VCA al inicio del experimento de cada bovino y tomando el valor de VCA más bajo observado después de la inoculación con la cepa de desafío.

\* Este bovino dio luz a un becerro al tiempo del desafío y murió a pesar de ser tratado.

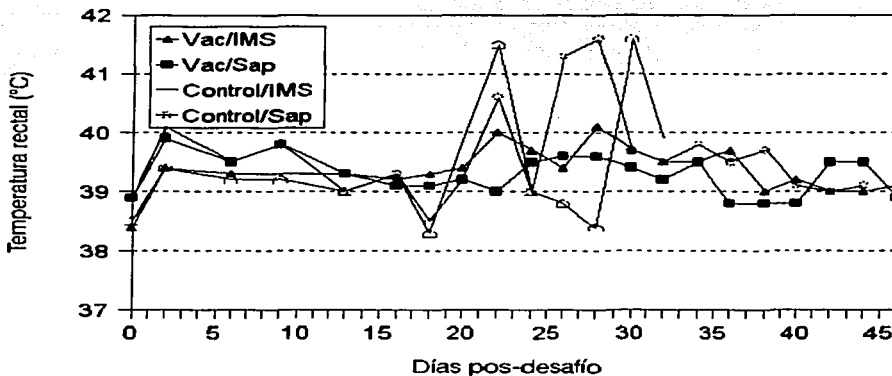


**Gráfica 7: Medias de valores de Volumen Celular Aglomerado de dos grupos de bovinos experimentales inmunizados con el inmunógeno de *A. marginale* (Méx-17) y dos testigos durante el periodo pos-desafío:**



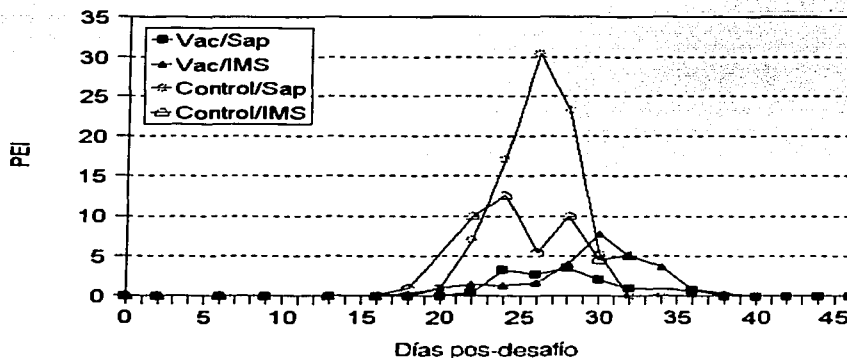
**LEYENDA:** Los tres bovinos de cada uno de los dos grupos inmunizados recibieron vía subcutánea 100µg de proteína de *A. marginale* (Méx-17) suspendida en 2ml del adyuvante correspondiente a los días 0, 21 y 93 mientras que uno de los testigos recibió un placebo de 6mg de saponina en 2ml de PBS y el otro 2ml del adyuvante IMS. Dos grupos inmunizados; i) inmunógeno en el adyuvante saponina (Vac/Sap), ii) inmunógeno en el adyuvante IMS (Vac/IMS) y los testigos: uno recibió un placebo de saponina (Control/Sap) y el otro un placebo de IMS (Control/IMS).

**Gráfica 8: Temperaturas rectales de animales experimentales.**



**LEYENDA:** Los tres bovinos de cada uno de los dos grupos inmunizados recibieron vía subcutánea 100µg de proteína de *A. marginale* (Méz-17) en el adyuvante correspondiente a los días 0, 21 y 93 mientras que uno de los testigos recibió el placebo de 6mg de saponina en 2ml de PBS y el otro 2ml del adyuvante IMS 1313. Dos grupos inmunizados; i) inmunizado con inmunógeno en el adyuvante saponina (Vac/Sap), ii) inmunizado con inmunógeno en el adyuvante IMS (Vac/IMS) y los testigos: uno recibió un placebo de saponina (Control/Sap) y el otro un placebo de IMS (Control/IMS).

**Gráfica 9: Rickettsias en animales experimentales al desafío:**



**LEYENDA:** Los tres bovinos de cada uno de los dos grupos inmunizados recibieron vía subcutánea 100µg de proteína de *A. marginale* (Méx-17) en el adyuvante correspondiente a los días 0, 21 y 93 mientras que uno de los testigos recibió el placebo de 6mg de saponina en 2ml de PBS y el otro 2ml del adyuvante IMS 1313. Dos grupos inmunizados: i) inmunizado con inmunógeno en el adyuvante saponina (Vac/Sap); ii) inmunizado con inmunógeno en el adyuvante IMS (Vac/IMS) y los testigos: uno recibió un placebo de saponina (Control/Sap) y el otro un placebo de IMS (Control/IMS).

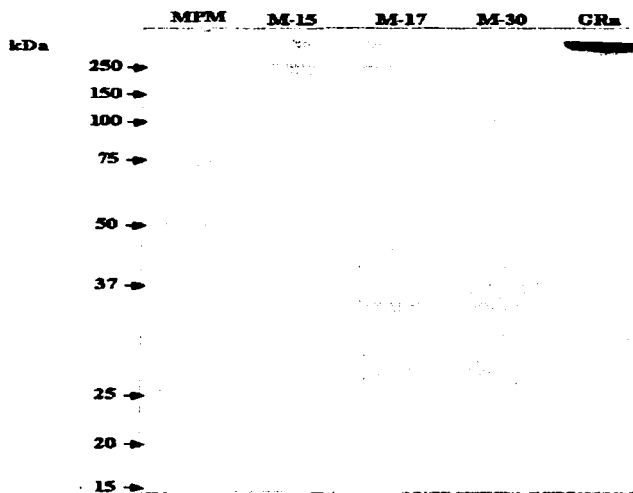
**Cuadro V: Índices de estimulación de linfoproliferación *in vitro* contra las cepas Méx-17 y la de Méx-30 en los bovinos inmunizados y testigos (periodo pos-desafío):**

Grupo	Semanas posdesafío									
	2		3		4		5		7	
	M-17	M-30	M-17	M-30	M-17	M-30	M-17	M-30	M-17	M-30
<b>Grupo Saponina</b>										
2411	2.7	3.3	1.6	1.3	1.3	1.2	1.3	1	1.2	1.2
2417	5.1	5.1	3.6	1.5	5.3	2.1				
2420	7.2	7.4	2.3	0.8	1.9	1.5	2.3	1.4		
2612										
(control)	3.7	5.5	2.2	1	1.3	1.4	2.4	1.2	1.1	1.1
<b>Grupo IMS</b>										
2413	1.5	1.9	4.5	3	3.3	3.1	2.1	1.6	1.3	1.3
2419	3.6	3.5	3	3.7	3.3	1.3	1.8	1.2	1.4	1.2
2624	1.8	1.4	4	3	2.6	1.1				
2608										
(control)	0.9	1	2.6	0.9	6.6	1.7				

**LEYENDA:** *Índices de estimulación de linfoproliferación *in vitro* de BMC de bovinos inmunizados con inmunógeno de A. marginale (Méx-17) y testigos desafiados con la cepa A. marginale (Méx-30).*

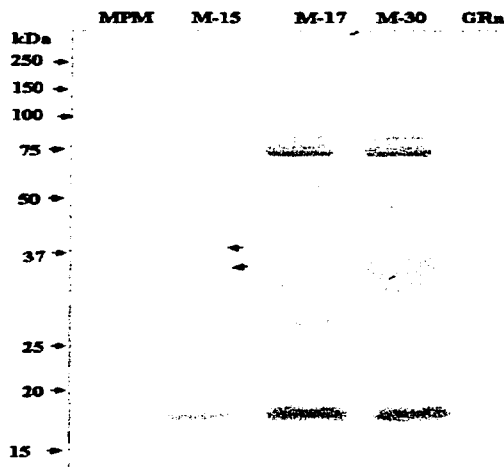
IMPRESO CON  
MATERIAL DE ORIGEN

**Figura 7: Perfil de proteínas en tres cepas mexicanas de *A. marginale* en un gel de poliacrilamida teñido por Azul de Coomassie-R250:**



**LEYENDA:** Las proteínas de las tres cepas estudiadas de *A. marginale* fueron separadas en un gel de separación de poliacrilamida al 10% y teñido con Azul de Coomassie. Carril M-15 (proteína de la cepa Méx-15), carril M-17 (proteína de la cepa Méx-17), carril M-30 (proteína de la cepa Méx-30) carril GRn (proteína de glóbulos rojos no infectados) y carril MPM (Marcadores de pesos molecular; Bio-Rad).

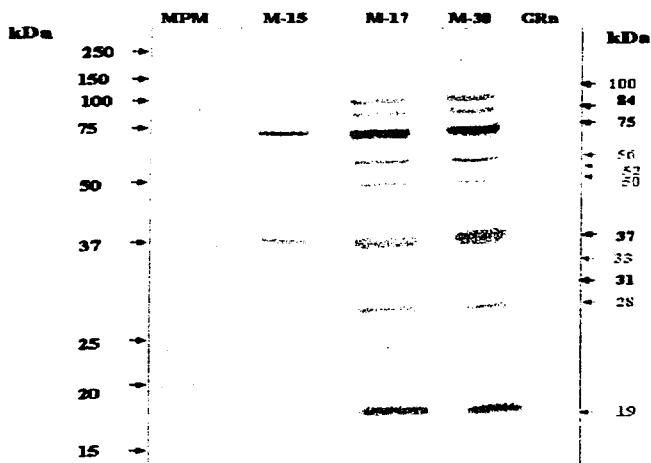
**Figura 8: Perfil de antígenos IgG-específicos en las tres cepas mexicanas de *A. marginale*:**



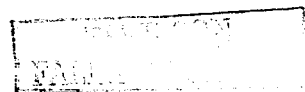
**LEYENDA:** Las proteínas de las tres cepas estudiadas de *A. marginale* fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 12.5% y transferidas a una membrana PVDF y después ensayadas por inmunoiblot con suero posdesafío del bovino No. 2420. Carril M-15 (proteína de la cepa Méx-15), carril M-17 (proteína de la cepa Méx-17), carril M-30 proteína de la cepa (Méx-30) carril GRn (glóbulos rojos no infectados) y carril MPM (Marcadores de pesos molecular; Bio-Rad).



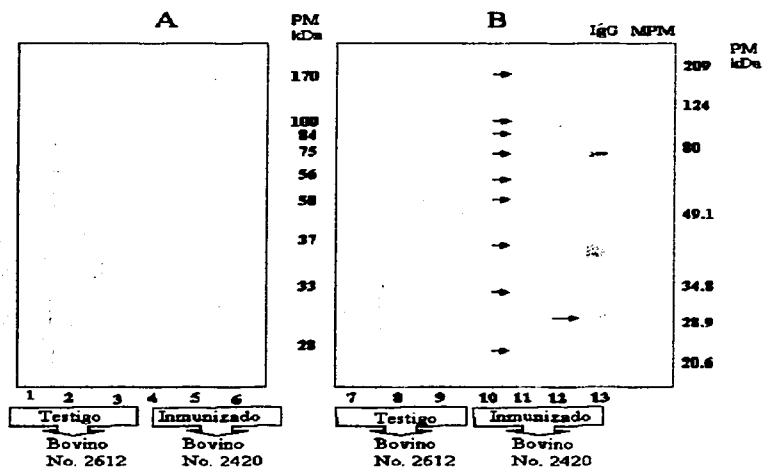
**Figura 9: Perfil de antígenos IgG2-específicos reconocidos por en las tres cepas mexicanas de *A. marginale*.**



**LEYENDA:** Las proteínas de las tres cepas estudiadas de *A. marginale* fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 12.5% y transferidas a una membrana PVDF y después ensayadas para antígenos IgG2 específicos por inmunoblot con suero posdesafío del bovino No. 2420. Carril M-15 (proteína de la cepa Méx-15), carril M-17 (proteína de la cepa Méx-17), carril M-30 (proteína de la cepa Méx-30) carril GRn (glóbulos rojos no infectados) y carril MPM (Marcadores de pesos molecular; Bio-Rad).

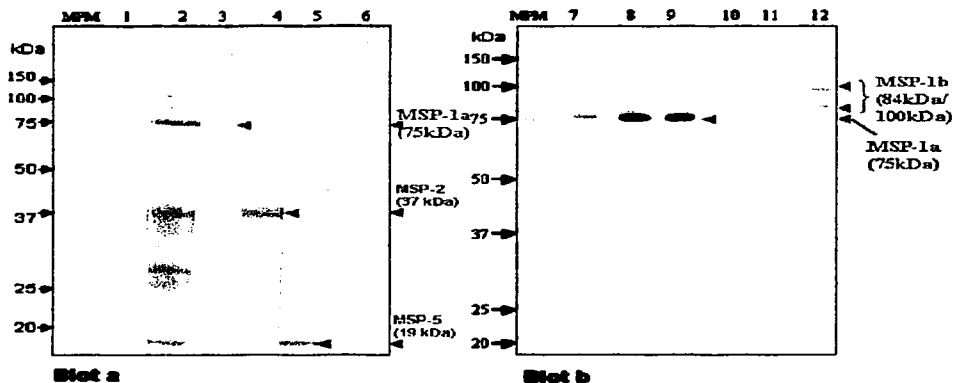


**Figura 10: Dicotomía de antígenos IgG1 e IgG2 específicos en la cepa Méx-17:**



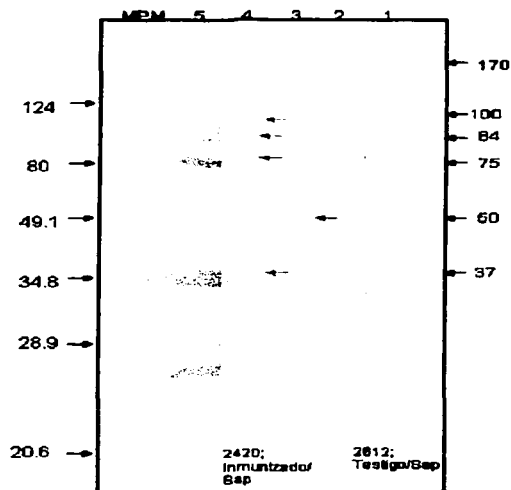
**LEYENDA:** Inmunoblot para antígenos IgG1 (A) e IgG2 (B) específicos en la cepa Méx-17 de *A. marginale*. Extracto de la cepa Mex-17 se corrió en un gel preparativo de 10% de monómero. Los carriles 1 y 7, 2 y 8 y, 3 y 9 se probaron con los sueros preinmunización, posinmunización y posdesafío respectivamente del animal testigo 2612 mientras que los carriles 4 y 10, 5 y 11 y 6 y 12 con sueros de las mismas fechas del animal vacunado 2420. El carril 13 en panel B se probó contra suero del animal 2420 para IgG's, mientras que el carril MPM representa marcadores de peso molecular (Bio-Rad).

**Figura 11: Inmunoblot para las MSP en la cepas estudiadas de *A. marginale*.**



**LEYENDA:** **Blot a:** Extracto de la cepa Méx-17 se corrió como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Carril 1, perfil de antígenos reconocidos por IgG's en suero total de bovino positivo a *Anaplasma* mientras, los carriles 2, 3, 4 y 5 respectivamente fueron probados con anticuerpos específicos para las: MSP-1a (Ana22B1), MSP-2 (suero murino específico policlonal anti-MSP-2/3) y MSP-5 (AnaF16C1) y anticuerpo policlonal específico Tryp1E1 (anti-*Trypanosoma brucei*) como control negativo. El carril MPM representa marcadores de peso molecular de amplio rango (Precision Markers Dual color: Bio-Rad). **Blot b:** Los carriles 7, 8 y 9 son respectivamente antígenos de Méx-15, Méx-17 y Méx-30 y fueron probados con anticuerpo monoclonal AFOR2.2F1 específico para la terminal C de MSP-1a, y los carriles 9, 10 y 11 son respectivamente antígenos de Méx-15, Méx-17 y Méx-30 probados con antisuero de conejo específico para MSP-1b.

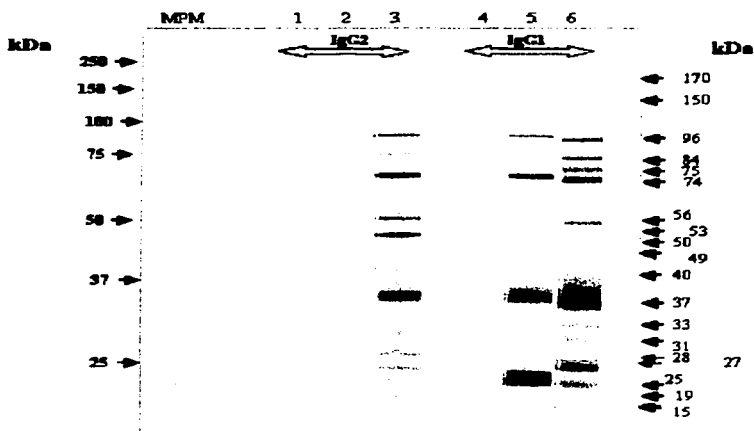
**Figura 12: Antígenos específicos reconocidos por IgG2 en la cepa Méx-15:**



**LEYENDA:** Extracto de la cepa Méx 15 se separó en gel de poliácridamida al 10% de acuerdo a lo descrito en Materiales y métodos. Carriles 1 (pre-inmunización) y 2 (pos-inmunización) se probaron para IgG2 con con suero de un testigo mientras las de 3 (pre-inmunización) y 4 (pos-inmunización) con suero de un bovino inmunizado. Carril 5, perfil de antígenos IgG específicos en un Western blot normal y MPM representan marcadores de PM (Bio-Rad).

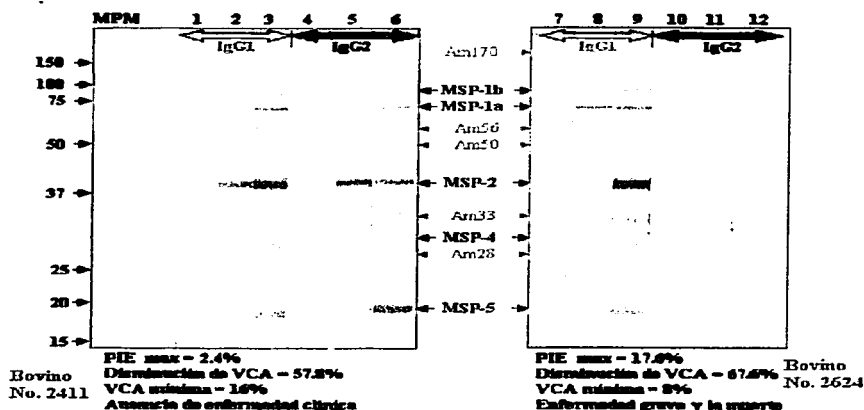
HECHO CON  
MATERIALES BIOLÓGICOS

**Figura 13: Antígenos específicos reconocidos por IgG1 e IgG2 en la cepa Méx-30:**

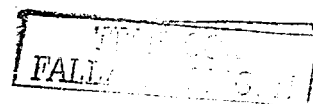


**LEYENDA:** Extracto de la cepa Méx 15 se separó en gel de poliacrilamida al 12.5% de acuerdo a lo descrito en Materiales y métodos: Las carriles 1, 2 y 3 fueron respectivamente, incubados con sueros preinmunización, posinmunización y posdesafío de un bovino inmunizado y protegido (No.2420) antes de probar para antígenos IgG2 específicos mientras que las carriles 4, 5 y 6 fueron respectivamente probadas con sueros preinmunización, posinmunización y posdesafío del mismo bovino (No.2420) antes de probar para antígenos IgG1 específicos. La carril MPM representa marcadores de peso molecular de amplio espectro (Dual Color; Bio-Rad).

**Figura 14: Reconocimiento diferencial de antígenos IgG1 e IgG2 específicos en la cepa Méx-30 por sueros inmunes de dos bovinos inmunizados:**



**LEYENDA:** Panel A. La membrana con proteína de la cepa Méx-30 fue probada para antígenos IgG1 e IgG2 específicos con suero de un bovino inmunizado y protegido (No.2411). Panel B: la membrana fue probada con suero de otro bovino inmunizado y no protegido (No.2624). Los carriles 1 y 4, 2 y 5 y 3 y 6 fueron probados con sueros pre-, pos-inmunización y pos-desafío respectivamente contra IgG1 e IgG2. Carriles 7 y 10, 8 y 11 y, 9 y 12 con las mismas fechas de sueros del animal 2624 también contra IgG1 e IgG2. El carril MPM representa marcadores de PM (Bio-Rad).



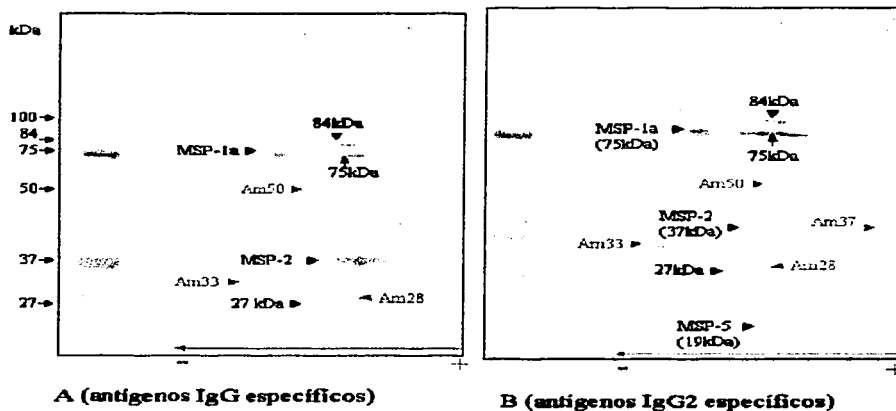
**Figura 15: Separación de proteínas en dos dimensiones en gel de poliacrilamida a 10% teñido con plata de antígenos de *A. marginale* (Méx-17):**



***LEYENDA: Las proteínas de la cepa Méx-17 se separaron en un gradiente de pH de 3 a 10 en la primera dimensión y un gel de 10% de poliacrilamida en la segunda dimensión. Las proteínas señaladas en verde corresponden a las MSP ya documentados mientras que las que están señaladas en amarillo son antígenos novedosos nunca antes reportados por su posible propiedades inmunoprotectores.***

RECIBIDO CON  
ANTIGEN

**Figura 16: Enfoque isoeléctrico de antígenos de *A. marginale* (Méx-17):**



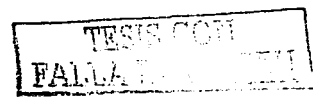
**LEYENDA:** Se fraccionó la mezcla de proteínas de la cepa Méx-17 de *A. marginale*, por enfoque isoeléctrico y se llevó a cabo la separación en la segunda dimensión. Después de hacer la electrotransferencia, se probaron las membranas una para antígenos IgG específicos (Panel A) y la otra para antígenos IgG2 específicos (Panel B). Las proteínas novedosas (Am28, Am33, Am37 y Am50) están marcadas en rojo.



#### 4.4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:

La vacunación con cuerpos iniciales de la cepa Mex-17 indujo protección en los animales que varió de completa a aparentemente nula en los animales experimentales. La protección entre los grupos de animales vacunados no fue estadísticamente diferente ( $p > 0.05$ ) pero se observó que los tres bovinos inoculados con el inmunógeno en saponina mostraron índices de protección superiores a los tres del grupo inmunizado con el inmunógeno en IMS 1313. Interesantemente, uno de los seis bovinos inmunizado (No. 2624) murió después del desafío a pesar de tener una respuesta humoral de IgG positiva al ELISA y una respuesta celular detectada por el ensayo de LP. Considerando la respuesta al desafío, el bovino No. 2420 como se muestran los datos clínicos (Cuadro II, III y IV) y los de LP (Cuadro V) respondió mejor que los otros animales inmunizado por lo que se utilizó en la mayoría de los casos para los estudios específicos para identificar y caracterizar antígenos con potencial de inmunoprotección.

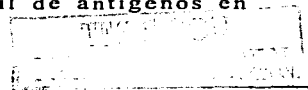
Las diferencias observadas en la protección respecto de los adyuvantes usados se pueden atribuir a las características peculiares de cada uno. En estudios hechos en Cuba con una proteína recombinante (BM86) de la garrapata *B. microplus*, Rodríguez y col., (2001) compararon la respuesta humoral en dos grupos de bovinos y reportan que los animales que recibieron el inmunógeno en saponina como adyuvante mostraron mayor título de IgG2 en comparación con el grupo que recibió el inmunógeno en adyuvante IMS 888. Aunque el inmunógeno basado en proteínas de la garrapata *B. microplus* puede tener características distintas al inmunógeno de *A. marginale* utilizado en este estudio, los resultados de estos dos trabajos indicarían que la saponina es superior al IMS como adyuvante en cuanto a su capacidad de dirigir la respuesta humoral hacia la producción del isotipo IgG2. Brown y col., (1998) reportaron la



asociación de niveles de IgG2 y la protección de animales inmunizados por lo que se puede concluir que el adyuvante tiene un efecto en las diferencias de niveles de protección detectados entre los dos grupos inmunizados como se mostró en los índices de protección como el porcentaje de GRi y reducción del VCA. Estudios más detallados del efecto del adyuvante se tienen que realizar para comparar la superioridad de estos dos adyuvantes en una población más grande de bovinos preferiblemente genéticamente homogéneos a nivel los alelos de receptores de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (CPH).

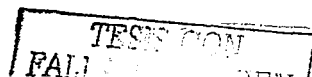
Al inmunoblot se notaron algunas diferencias en el reconocimiento de los antígenos IgG2 específicos de *A. marginale* por diferentes animales inmunizados pero en todos los casos de bovinos protegidos la señal de IgG2 fue acompañada por una respuesta positiva celular medida mediante la técnica de linfoproliferación *in vitro*.

La técnica de linfoproliferación *in vitro* se evaluó en ELISA para proliferación celular basado en ensayar la incorporación de la deoxiuridina en el DNA de las células en proceso de replicación. La respuesta celular expresada como índice de estimulación (IE) en los PBMC fue detectada una semana después de la tercera inmunización en los bovinos inmunizados pero no se detectó ninguna respuesta en los testigos. La respuesta de linfoproliferación *in vitro* de las PBMC de los bovinos inmunizados y su ausencia en los testigos como está señalada en la (Gráfica 2), sugiere en estas circunstancias que la cepa inmunizante Méx-17 indujo una respuesta celular de memoria en linfocitos de la sangre periférica. En el periodo posdesafío, como se hubiera esperado, la respuesta de LP expresada como IE fue en la mayoría de los casos más alta para la cepa inmunizante (Méx-17) que para la cepa heteróloga Méx-30 utilizada para el desafío (Cuadro V). Este resultado no sorprendente se puede interpretar como que existen diferencias antigénicas entre ellas, aunque el perfil de antígenos en



Western blot no muestra diferencias aparentes y la clasificación a nivel genética por De la Fuente (2001) las coloca en la misma tribu genética. Los pocos casos en cuales hubo una mayor respuesta contra el antígeno heterólogo, se pudiera deber a los epitopos conservados entre las dos cepas de *A. marginale*.

El perfil de antígenos en los tres aislados mexicanos de *A. marginale* (Méx-15, Méx-17 y Méx-30) cuando fue analizado en Western blots de proteínas IgG positivas, mostró similitudes impresionantes ya que todas las proteínas reconocidas por sueros hiperinmunes fueron del mismo perfil sin mayor diferencias evidentes en el PM. Sin embargo, al hacer inmunoblot para antígenos IgG2 específicos, la proteína de 52 kDa sólo se mostró en la cepa Méx-15. Esto puede explicarse por lo reportado recientemente por De la Fuente, (2001) sobre las similitudes que existen a nivel genético entre las cepas Méx-15, Méx-17 y Méx-30, en donde las tres cepas de *A. marginale* fueron clasificadas en el mismo grupo con base en las similitudes de los genes *mspl4* y *msp4*, por lo que se concluye que las similitudes en el perfil de antígenos de las cepas estudiadas, hubiera sido esperado. A pesar de estas similitudes, es lógico pensar que pueden existir algunas diferencias pequeñas pero significativas y solo detectadas por pruebas mas finas en cuanto a las características inmunoquímicas de los antígenos de las tres cepas estudiadas, tomando en cuenta que varios investigadores han reportados la existencia de diferencias en los antígenos incluso dentro de una misma cepa de *A. marginale*. Estas diferencias pudieran explicar parcialmente la protección incompleta de sólo 60% en un grupo de bovinos inmunizados con un inmunógeno polivalente preparado a partir de CI de las cepas Méx-15, Méx-17 y Méx-31 y desafiados con la cepa Méx-15 (Rodríguez y col., 1999). Sin embargo éste mismo grupo de investigadores reportaron protección hasta de 100% en el otro grupo que recibió el mismo inmunógeno pero que fue desafiado con la cepa Méx-17. Al



inmunoblot con sueros pos-inmunización y pos-desafío contra extractos de la cepa Méx-17, el bovino No. 2624 mostró reconocimiento por IgG1 pero una carencia de IgG2 (Figura 14). Éste resultado confirma lo reportado por el grupo de Brown y col., (1998) sobre la asociación de protección con los niveles de IgG2 en bovinos inmunizados. Los datos del estudio actual basados en el uso de bovinos adultos y susceptibles, confirma el importante papel que juega este isotipo en la protección. La producción de IgG2 en bovinos se basa en factores genéticos de alta herabilidad (Titzard, 1996) y es muy probable que este bovino fuera del genotipo carente de la capacidad para desarrollar una respuesta de IgG2; quizás a nivel de los antígenos del linfocito (BoLA por sus siglas en inglés). Es recomendable que en el futuro se lleven a cabo estudios para definir la distribución de los diferentes haplotipos de BoLA en la población bovina a nivel nacional.

Más importante aún, se reporta por primera vez la identificación de 12 antígenos específicos reconocido por IgG2 en tres cepas mexicanas de *A. marginale* de PM de; 170, 100, 84, 75 (dos proteínas), 56, 52, 50, 37 (dos proteínas distintas), 33, 28 y 19 kDa. El inmunoblot de los extractos de proteína cruda de las tres cepas mexicanas de *A. marginale* contra sueros pos-inmunización y pos-desafío de bovinos protegidos por el inmunógeno experimental, confirmó la presencia de las 13 proteínas IgG2 específicas de las cuales 5 [MSP-1a, MSP-1b (dos proteínas), MSP-2 y MSP-5 confirmadas] corresponden a las 6 MSP ya reportadas y 7 son antígenos novedosos. Varios investigadores han reportados proteínas inmunoreactivas coincidentes en su peso molecular con algunas de las que presentamos en este estudio. Montenegro y col., (1990) reportaron presencia en un Western blot de cepa Florida de *A. marginale* proteínas de PM 81, 74, 65, 58, 44, 38, 33, 29, 27, 24, 17, y 16kDa mientras que Patorroyo y col., (1994) reportaron proteínas de PM; 100, 96, 47, 43, 38, y 27

kDa. Aunque algunas de estas proteínas fueron identificadas como las MSP, no se estableció el papel inmunológico que jugaban algunas de estas proteínas como las de PM, 27, 33kDa ni fueron estudiadas por su especificidad hacia IgG2. En un estudio dirigido a identificar proteínas adicionales inmunoprotectoras, Tebele y col., (1991) estudiaron la capacidad inmunoprotectora de dos fracciones de membranas, aisladas por gradientes de densidad en sacarosa de la cepa Norton (Zimbabwe) de *A. marginale* y reportaron que la proteína de 31kDa era la única común entre las dos fracciones. En este estudio (Tebele y col., 1991) las conclusiones sólo se basaron en datos obtenidos de geles de acrilamida teñidos con Azul de Coomassie lo que puede implicar que hubieran existido mas proteínas en esas fracciones que no se lograron a demostrar debido a las limitaciones de esta tinción.

En el estudio actual lo que parece ser la proteína de aproximadamente 27kDa fue resuelta por electroforesis en dos dimensiones (Figura 16) en dos proteínas no solo de distintos puntos isoeléctricos sino también de diferentes pesos moleculares (27 y 28 kDa). De estas dos proteínas, la de 28 kDa fue intensamente reconocida por IgG2 mientras que la de 27 kDa no mostró esta especificidad. Tomando en cuenta los resultados de Tebele y col., (1991), es lógico concluir que la inmunoprotección en las dos fracciones de membranas de *A. marginale* estudiadas fue parcialmente dada por la proteína de 28 kDa o la de 33 kDa o las dos ya que la cercanía de los PM de estas dos al de la proteína de 31 kDa hubiera hecho que se encontraran en la misma fracción. Considerando otras proteínas en este rango de PM, como la de 27 kDa y la de 31 kDa (MSP-4), su falta de especificidad para IgG2 sugiere que no contribuyeron a la inmunoprotección reportada en el estudio de Tebele y col., (1991). En un estudio diseñado para probar la capacidad inmunoprotectora de ésta última proteína se ha confirmado la falta de propiedades inmunoprotectoras

de la MSP-4 como reportaron Oberle y col., (1993). En el estudio de Tebele y col., (1991), se menciona que la proteína de 26.5 kDa fue la más inmunodominante en una de las dos fracciones probada. En el estudio actual se identificó una proteína IgG2 específica de 28 kDa y tomando en cuenta la cercanía en los PM aparentes éstas dos pudieran ser la misma proteína. La especificidad de IgG2 implica su posible papel en la respuesta inmunoprotectora y corrobora precisamente lo que reportaron recientemente el grupo de Riding y col., (2003). En este último reporte, se menciona que una proteína de 27kDa en su forma nativa y recombinante mostró propiedades inmunoprotectoras en bovinos inmunizados y desafiados. Es de notar que, la protección inducida por esta proteína fue asociada con altos títulos de IgG2 y es consistente con lo que publicó Brown y col., (1998) y confirmado en el estudio actual sobre la relación entre este isotipo de IgG y la respuesta inmunoprotectora.

Muy notable en Western blot de proteínas de *A. marginale* (Méx-17) en dos dimensiones, la apariencia como distintas proteínas de los antígenos novedosos de PM, 28, 33, 50 kDa, puede implicar que son codificado por genes únicos en comparación con los MSP-1b y el MSP-2 que son codificados por familias multigénicas, por lo que hiciera que tengan la capacidad de proteger animales contra desafíos heterólogos.

De todos los antígenos específicos reconocidos por IgG2, se confirma por lo menos tres proteínas correspondientes a las MSP-1a, MSP-2, y MSP-5. De las 13 proteínas IgG2 específicas, identificadas en este estudio, 7 de ellas (PM; 28, 33, 37, 50, 52, 56 y 170 kDa y de aquí en adelante nombrada Am28, Am33, Am37, Am50, Am52, Am56 y Am170) se reportan por primera vez como posibles antígenos inmunoprotectores debido a su especificidad para IgG2. Considerando que éstos antígenos fueron reconocidos por sueros provenientes de bovinos adultos, susceptibles, inmunizados y protegidos contra el

TRABAJO CON  
FALLA DE ORIGEN

desafío heterólogo de una cepa altamente virulenta (Méx-30) se afirma con un grado de seguridad que son antígenos candidatos para incluir en vacunas de subunidad y recombinantes.

Basándose en el modelo de la protección contra la Anaplasmosis, la especificidad de IgG2 de estos antígenos implica que son involucrado en la respuesta protectora en bovinos inmunizados. En datos no publicados, Riding y col., (2002) reportaron recientemente la presencia de antígenos en el rango de PM de 17-43 kDa las que en cantidades de microgramos han mostrado protección en bovinos inmunizados. Tres de las siete proteínas reportadas en este estudio están en el rango de PM citado en la publicación del grupo antes citado con excepción de las proteínas con PM, de 50, 52, 56 y 170 kDa. Este grupo específicamente investigó a más profundidad la proteína de 27kDa la cual clonaron y expresaron en forma recombinante y reportan su propiedades inmunoprotectoras asociadas con la producción de IgG2 en bovinos inmunizados. Parecería que la proteína de 28 kDa identificado en el estudio actual coincide bien con la de 27 kDa reportado por el grupo de Riding (2002).

En el estudio de vacunación, la protección de bovinos inmunizados con la cepa Méx-17 y desafiados con la cepa Méx-30 fue variable como se muestran en las diferencias en el porcentaje de GR1 o las rickettsemias, entre otros datos, desarrolladas por los bovinos inmunizados cuando se desafiaron con la cepa heteróloga de Méx-30 (Cuadro II, III, IV y V). Los diferentes grados de protección pueden explicarse no sólo por el polimorfismo a nivel del sistema de antígenos de Leucocito Bovino (o en inglés Bovine Leukocyte Antigen: BoLA) entre los animales experimentales sino también por diferencias entre las cepas; vacunal y la del desafío y quizás por otros factores como el tipo del adyuvante. Para hacer conclusiones más lógicas con este tipo de estudios en el futuro, debe tomarse en cuenta el uso de animales genéticamente idénticos a nivel de BoLA, lo que



permitiría un análisis más confiable en cuanto a la capacidad de protección cruzada entre las diferentes cepas de *A. marginale*.

Se recomienda que se lleven a cabo estudios no solo para determinar la ubicación de estas proteínas en el CI de *A. marginale* sino también para definir el papel biológico que juegan estas proteínas en la fisiología de esta rickettsia. Se pudiera también hacer la caracterización por espectroscopia de masas para determinar los PM puntuales de las proteínas y las estructuras moleculares de las mismas. Esta información junto con la de la secuenciación de aminoácidos de las nuevas proteínas sería la base para considerarlas como verdaderos candidatos para utilizar en el desarrollo de una vacuna.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## CAPITULO V

## (EXPERIMENTO III)

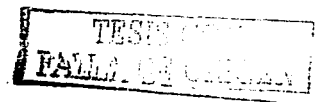
**ESTUDIOS DE LA RESPUESTA DE LINFOCITOS TIPO Th1 ESTIMULADO POR FRACCIONES DE NUEVOS ANTÍGENOS DE *A. marginale* (Méx-17):****RESUMEN:**

La capacidad de antígenos para estimular una respuesta de linfocitos CD4+ tipo Th1 asociada con la producción de IFN- $\gamma$  es una de las características de antígenos inmunoprotectores en *A. marginale*. Para estudiar propiedades estimulantes de la respuesta Th1 por nuevos antígenos IgG2 específicos en la cepa *A. marginale* (Méx-17), se llevaron a cabo el ensayo de linfoproliferación *in vitro* y el análisis citométrico de PBMC cultivado *in vitro* en presencia de fracciones de proteínas de la cepa Méx-17 y se probaron los sobrenadantes de cultivo celular para presencia de IFN- $\gamma$ . Los resultados de LP *in vitro* mostró que solo la nueva proteína de Am28 mostró un índice de estimulación positivo y comparable con el de extractos crudos de la cepa Méx-17. Aunque los resultados de análisis citométrico fueron inconclusivos, se detectaron presencia de IFN- $\gamma$  en sobrenadantes de PBMC cultivado en presencia de las proteínas de las fracciones: Fr-25 (Am28), Fr-30 (Am28'), Fr-50 (proteína de 37 kDa/MSP-2 y Am37) con menores índices pero superiores al control negativo para las fracciones: Fr-125 (75/84 kDa) y Fr-210 (84/100kDa). Basado en estos datos se concluye que las proteínas Am28, Am37 indujeron una respuesta Th1 *in vitro* tanto como las proteínas de 75, 84 y 100 kDa los últimos tres con menor capacidad de inducir una respuesta Th1.

## 5.1 INTRODUCCIÓN:

La identificación de antígenos inmunoprotectores (IP) de *A. marginale* se han investigado mediante el uso de varias técnicas basadas en el fraccionamiento de la mezcla cruda de proteínas de la rickettsia seguido por pruebas *in vitro* o experimentos de vacunación *in vivo* o la combinación de los dos. A lo largo del tiempo se han identificado seis proteínas llamadas proteínas del complejo principal de superficie; MSP-1a, MSP-1b, MSP-2, MSP-3, MSP-4 y MSP-5 de las cuales solo tres (complejo de MSP-1a y b, MSP-2 y MSP-3) han mostradas características IP aunque esta protección es parcial en casos de desafíos heterólogos.

La investigación hacia el descubrimiento de antígenos nuevos para incluir en vacunas de sub-unidad y vacunas recombinantes involucra el uso de un sinnúmero de técnicas que permitan la identificación de esas proteínas que tengan capacidad de inducir una respuesta inmunoprotectora. Esta capacidad se puede ensayar *in vitro* o *in vivo* basándose en los conocimientos de los mecanismos de la protección que inducen antígenos IP. En el caso de anaplasmosis, se ha establecido un modelo de inmunoprotección en el cual se establece que la resolución de la enfermedad involucra la activación de células CD4+ las cuales producen la citocina IFN- $\gamma$  (Brown y col., 1998) y que a su vez promueve la activación de células B para diferenciarse hacia células plasmáticas capaces de elaborar mayormente el isotipo IgG2 (Estes y col., 1994). El IFN- $\gamma$  activa también a los macrófagos para aumentar su capacidad fagocítica (Palmer y McElwain 1995) a través del aumento en la expresión de moléculas del complejo Principal de Histocompatibilidad CPH-II y producción de óxido nítrico (Adler y col., 1994, Stich y col., 1998, Brown y col., 1998) y citocinas como IL-12, TNF $\alpha$ . En este mecanismo de protección, las células CD4+ y el IFN- $\gamma$  que producen una vez activadas son



parámetros centrales en la protección de bovinos inmunizados y pueden servir como indicadores de protección *in vivo*.

Basados en estos mecanismos de inmunoprotección se ha mostrado (Palmer y col., 1989; y Brown y col., 1998) que las proteínas MSP-1a y MSP-2 provenientes de cepas norteamericanas de *A. marginale* eran capaces de inducir este tipo de respuesta medible en parte como niveles *in vitro* de IFN- $\gamma$  en sobrenadantes de líneas de células CD4+ provenientes de bovinos inmunizados y protegidos. Los resultados de éstos investigadores han implicado que se puede utilizar éste esquema de experimentos para demostrar otras proteínas todavía no caracterizadas en varias cepas de *A. marginale*. En México, los estudios para elaborar una vacuna contra la anaplasmosis todavía no han definido que antígenos de cepas nacionales estimulan este tipo de respuesta. Este estudio fue diseñado para demostrar que algunos de los nuevos antígenos específicos reconocidos por IgG2 en la cepa Méx-17 y separados por electroforesis de flujo continuo (EFC) eran capaces de inducir una respuesta protectora ensayada *in vitro* como estimulación de células CD4+ con consecuente producción de IFN- $\gamma$ .

## 5.2 METODOLOGÍA:

### 5.2.1 Electroforesis de Flujo Continuo de proteínas de *A. marginale* Méx-17:

Extractos crudos de proteínas de *A. marginale* (Méx-17) obtenidos por centrifugación diferencial obtenidos como se describió en el capítulo II, se separaron por electroforesis de flujo continuo (ECF) para obtener fracciones de las diferentes proteínas. La separación se llevó a cabo en gel cilíndrico de 10cm de altura con un diámetro de 2.8cm (Prep. Cell, Bio-Rad) de acuerdo a las especificaciones del fabricante, usando una concentración de 10% de monómero en la fase

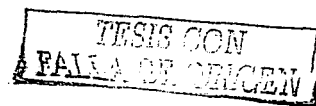


de separación. El gel de separación se preparó de acuerdo a protocolos establecidos y se dejó a polimerizarse un mínimo de 2 horas, cubierto por 50% butanol/H<sub>2</sub>O. Una vez polimerizado, el butanol se descartó y se sustituyó por 6ml de buffer de separación 1x pH; 8.8 (Tris-HCl a 0.375M, SDS al 0.1%) y se dejó para seguir polimerizando a TA durante una noche. Al día siguiente se retiró el buffer de separación y se preparó a 4% el gel de pre-separación pH, 6.8 1x (Tris-HCl a 0.05M) y se dejó a polimerizarse durante 2 horas a TA.

La cámara de elusión se preparó con una membrana de diálisis de 6000 Da y sus dos soportes previamente equilibrados en amortiguador de corrimiento (0.025M Tris, 0.192M glicina, 0.155% SDS, pH 8.3) esterilizado por filtración a través de una membrana de poros de 0.22µm. La electroforesis se llevó a cabo bajo condiciones de refrigeración conectando los tubos del sistema de enfriamiento en serie con un baño de hielo y una bomba peristáltica a un flujo de 100ml/min. El tubo de la elusión de la muestra se conectó a un colector de fracciones (Model 2128 Bio-Rad) en serie con una bomba peristáltica del Biologic LP (Bio-Rad) a un flujo de 1ml/min. Una vez ensamblado el equipo, se cargó un volumen equivalente a 6mg de proteína de la cepa Méx-17 de *A. marginale* previamente hervida a 100°C por 3 min en amortiguador de muestra (Tris-HCl pH 6.8 a 0.06M, SDS al 2%, 2-ME al 5%, glicerol al 10% y azul de bromuro de fenol al 0.025%). La separación se llevó a cabo en la modalidad de poder constante de 12W (40-50mA/240-300V) por aproximadamente 15 horas. Una vez que el frente de la tinción de azul de bromuro de fenol llegó a la parte inferior del gel se empezó a coleccionar fracciones de 2.5ml.

### **5.2.2 Procesamiento de la fracciones:**

#### **a) Precipitación de fracciones:**



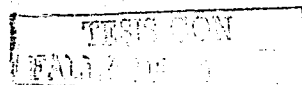
Las 260 fracciones colectadas se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Para recuperar la proteína las fracciones se precipitaron con acetona a  $0^{\circ}\text{C}$  v/v (al 99:9%) y se dejó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para precipitar durante 16 horas. El precipitado se separó en volúmenes de 1ml y se centrifugó a  $10,000\times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. El sedimento se mezcló con 1ml de etanol a 70% a  $4^{\circ}\text{C}$  y se centrifugó a  $10,000\times g$  durante 30 min. El sedimento se mezcló en 100 $\mu\text{l}$  de PBS estéril enriquecido con gentamicina a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se guardó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

**b) Verificación de las fracciones:**

Para verificar el peso molecular de las fracciones colectadas, se tomaron 5 $\mu\text{l}$  de cada décima fracción colectada y estas se separaron por electroforesis durante 2 horas en un gel de separación de poliácridamida a 12.5% (gel de pre-separación a 4%), que se tiñó con una tinción de plata con un kit comercial (Bio-Rad, No. de Cat. 1610443) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

**c) Selección de nuevos antígenos para las pruebas *in vitro* de la respuesta Th1:**

La selección de antígenos novedosos se llevó a cabo mediante el análisis de las fracciones separadas en geles de poliácridamida-SDS e inmunotransferencia de cada 5<sup>a</sup> fracción obtenida por electroforesis de flujo continuo. Un volumen de 5 $\mu\text{l}$  se corrió por electroforesis, se transfirió a una membrana de PVDF (Immobilon P, Millipore, México) como se describió en secciones anteriores y se probaron por su especificidad hacia IgG2 con el suero del bovino No. 2420 y probados con un anticuerpo monoclonal comercial anti IgG2 bovina (Serotec, Inglaterra,) y un anticuerpo comercial cabra anti IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina.



### **5.2.3 Re-estimulación de los bovinos:**

Con objeto de obtener células mononucleares para la caracterización de las fracciones obtenidas en el paso anterior, se desafió a los animales vacunados y protegidos al desafío y un animal testigo no vacunado, vía IM con  $1 \times 10^8$  Gri con la cepa Méx-30 y se vigilaron los cambios de los índices básicos del hematocrito, PEI, temperatura rectal (Tr) y se tomaron muestras de sangre para obtener PBMC y sueros, los cuales fueron probados por ELISA para determinar la cinética de la respuesta humoral de IgG y de LP. Una vez que los animales mostraron un IE positivo, PBMC de los animales se usaron para los ensayos de caracterización de antígenos capaces de inducir una respuesta celular de CD4+ y se tomaron sobrenadantes como está descrito arriba para ensayar IFN- $\gamma$ .

### **5.2.4 Tipificación de células CD4+ por citometría de flujo:**

Células mononucleares de sangre periférica fueron obtenidas de de bovinos inmunizados y protegidos y se cultivaron  $4 \times 10^6$  de ellas por pozo en 1.5ml del medio RPMI-1640 por triplicado durante cuatro días en placas de 24 pozos, en una incubadora a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en presencia de fracciones de *A. marginale* (Méx-17) a 5% v/v. Al cuarto día se obtuvo de cada pozo 50 $\mu$ l del sobrenadante (del medio RPMI) y se guardó a -20°C hasta la determinación de IFN- $\gamma$  mediante un kit comercial basado en un ensayo de ELISA directo (BOVIGAM™ Gamma Interferon Test CSL Australia).

Para el ensayo de citometría de flujo, las células cultivadas se recuperaron de las placas en solución balanceada de Hank pH 7.4 (HBSS) y se lavaron tres veces a 380xg, 4°C cada vez retirando el sobrenadante y recuperando el sedimento. Después del tercer lavado, las células se resuspendieron en una pequeña cantidad de HBSS para

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

facilitar la cuantificación de PBMC y se ajustó la concentración de células a  $2 \times 10^7$ /ml. De esta suspensión,  $50 \mu\text{l}$  (equivalente a  $1 \times 10^6$  PBMC) fueron incubadas en oscuridad a  $4^\circ\text{C}$  durante 30 min con  $10 \mu\text{l}$  de un anticuerpo monoclonal comercial anti-CD4 (bovino) de ratón diluido 1:100 en HBSS. Después de tres lavados de 5 min cada uno, en HBSS a  $380 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$  se recuperó el sedimento de células las cuales se re-suspendieron en  $50 \mu\text{l}$  de HBSS y se incubaron en oscuridad a  $4^\circ\text{C}$  durante 30 min con  $20 \mu\text{l}$  del anticuerpo monoclonal anti-ratón IgG conjugado a isotiocianato de fluoresceína (anti-ratón IgG-FITC) diluido 1:100 en HBSS. Se lavaron las células tres veces a las mismas condiciones como arriba y el sedimento de células se re-suspendieron en  $500 \mu\text{l}$  de paraformaldehído a 0.5% w/v en HBSS y se analizaron las células por citometría de flujo (Flow Activated Cell Sorter; FACS) dentro de un periodo de no más de tres días. Para los controles, se incluyeron células no estimuladas y sólo teñidas con el segundo anticuerpo conjugado al FITC sin reaccionarlas con el anticuerpo primario anti-CD4+, y otro control de células no estimuladas pero teñidos con los dos anticuerpos. Para evaluar la capacidad de estimular una respuesta de CD4+ de las proteínas de interés, los resultados se analizaron utilizando el programa *Cell Quest* (Becton Dickinson) y se graficaron los datos para determinar el porcentaje de aumento de la señal de fluorescencia como un índice de activación de células-T de CD4+.

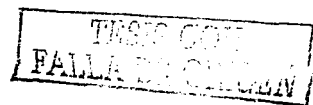
### **5.2.5 Determinación de IFN- $\gamma$ en PBMC cultivadas en presencia de *A. marginale*:**

#### **a) Preparación de reactivos:**

Los reactivos del kit BOVIGAM<sup>TM</sup> (Interferon Gamma Test CSL Australia) se prepararon según las instrucciones del fabricante.



- i) **Las placas:** Las placas se equilibraron a temperatura ambiente (TA) durante 30 min antes de abrir la bolsa plástica.
- ii) **Controles positivos y negativos:** Los controles positivos y negativos del kit se reconstituyeron con 1.0ml de agua deionizada y esterilizada por filtración a través de un filtro de  $0.22\mu\text{m}$  y se guardaron a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.
- iii) **El diluyente verde para muestras:** Este diluyente se utilizó a la concentración del fabricante para diluir las muestras problemas y los controles como está recomendado en el kit.
- iv) **El conjugado anti-IFN- $\gamma$  y peroxidasa:** El conjugado concentrado (100x) se reconstituyó en 1.5ml de agua deionizada y para trabajar se diluyó esta solución del conjugado a 1:100 en el diluyente azul del kit. El último reactivo se diluyó 1:5 en agua destilada antes de utilizar para la dilución del conjugado.
- v) **Solución de amortiguadora lavadora del kit:** Para obtener el amortiguador 1x, se diluyó el amortiguador 20x del kit a 1:20 en agua destilada y se guardó la última solución a TA hasta su uso por lo menos en un periodo menos de dos semanas.
- vi) **El sustrato y el cromógeno:** El cromógeno tetrametil bensidina (TMB) se diluyó a 1:100 en amortiguador del sustrato de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y se utilizó en menos de 5 min de preparación.
- vii) **Solución para detener la reacción enzimática:** El ácido sulfúrico a 2M se utilizó a la concentración del fabricante.
- b) Procedimiento del ensayo inmunoenzimático para IFN- $\gamma$ :** Como se recomiendan en las instrucciones del kit, todos los reactivos, con la excepción del conjugado, se equilibraron a TA ( $22^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) durante 1 hora antes de empezar el ensayo. Se colocaron  $50\mu\text{l}$  del diluyente verde por pozo en placas previamente equilibradas a TA y a ésta se le agregaron  $50\mu\text{l}$  de muestras seguidos por los controles positivos y negativos en pozos correspondientes. Las muestras problemas fueron





sobrenadantes obtenidos del cultivo de PBMC cultivado *in vitro* en presencia de fracciones de proteínas de la cepa *A. marginale* (Méz-17) obtenidas por EFC. Estas fracciones se ensayaron para determinar la presencia de proteínas anteriormente demostradas como nuevos antígenos de *A. marginale* reconocidos por IgG2 tanto como las proteínas conocidas como las MSPs. Las placas con muestras se incubaron a TA durante 60 min seguido por seis lavados con solución de amortiguadora de lavado 1x (con thiomersal al 0.01% p/v) del kit, cada lavado de 5 min. Se colocó 100µl por pozo el conjugado anti-IFN-γ peroxidasa diluido 1:100 en el diluyente azul 1x y se incubaron las placas a TA durante 60 min. Se lavaron las placas seis veces como antes y se agregaron 100µl por pozo del cromógeno TMB diluido 1:100 en el amortiguador del sustrato de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se incubaron las placas a TA durante 30 min y se detuvo la reacción con 50µl/pozo ácido sulfúrico a 2M. Dentro de 5 min se leyó la placa a 450nm y los valores de densidad óptica se analizaron para determinar las cantidades relativas de IFN-γ.

### 5.3 RESULTADOS:

#### a) Electroforesis de flujo continuo y detección de proteínas IgG2 específicas:

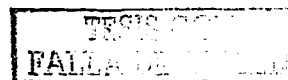
La separación de proteínas de los extractos de la cepa Méz-17 se llevó a cabo por EFC y 20 fracciones representativas de las 260 fracciones fueron probadas por electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con la técnica de plata. En la figuras 17 se muestra la separación de proteínas en geles de poliacrilamida al 12.5%. Estas proteínas se ubicaron en el rango de PM entre 21.3-198 kDa abarcando el rango de las proteínas de interés. Para confirmar la presencia de proteínas inmunogénicas, se probaron las fracciones por inmunoblot (Figuras 18, 19, 20 y 21) y de ésta manera se confirmó la



presencia no solo de proteínas novedosas (Am28, Am33, Am50) en las fracciones sino también proteínas correspondientes a las MSP como la MSP-1a y MSP-2. Sin embargo, de las proteínas nuevas observadas en el capítulo III, no se detectaron por inmunoblot las proteínas Am52, Am56 y Am170, aunque estas últimas fueron previamente demostradas en inmunoblots de los extractos crudos de *A. marginale* (Figura 18, 19, 20 y 21). El análisis de Western blots mostró que de las proteínas detectadas en las fracciones, la Am50 mostró el reconocimiento menos intenso por sueros inmune a la anaplasmosis.

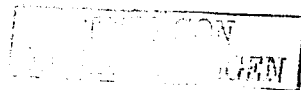
**b) Linfoproliferación in vitro de animales estimulados citometría de flujo de células CD4+:**

Las fracciones fueron probadas en ensayo de LP *in vitro* para evaluar la capacidad de inducir la respuesta de LP y solo la fracción de Am28 indujo una respuesta (Figura 22) con un índice de estimulación (IE) comparable con el observado por el inducido en los extractos crudos de la cepa Méx-17. La evaluación de otras fracciones por su capacidad para estimular células CD4+ dio resultados inconclusos cuando se probaron las PBMC *in vitro*. Como se mostró en las figuras 23 y 24, el IE de células CD4+ representado como un porcentaje en el aumento de la señal de fluorescencia para los diferentes tratamientos fue; Blanco: 28.6, Concanavalina-A: 56, Méx-17: 36, GRn: 30.3, Am28 (fracción 25): 27.7, Am28 (fracción 30): 28.7, Am33: (fracción 35): 29.4, MSP-2/37 kDa (fracción 50): 30.9, Am50 (fracción 85): 28.7, MSP-1a y MSP-3/75 kDa (fracción 125): 30.1 y proteína de 84/100 kDa (fracción 210): 29.0. De las fracciones de proteínas, las de 37 kDa (MSP-2) y 75 kDa (MSP-1a/MSP-3) mostraron índices de 30.9 y 30.1 respectivamente que son comparable con el del antígeno crudo de la cepa Méx-17 de 36. Sin embargo el extracto de GRn también mostró un porcentaje de 30.3 lo que hace que estos resultados sean difíciles de interpretar.

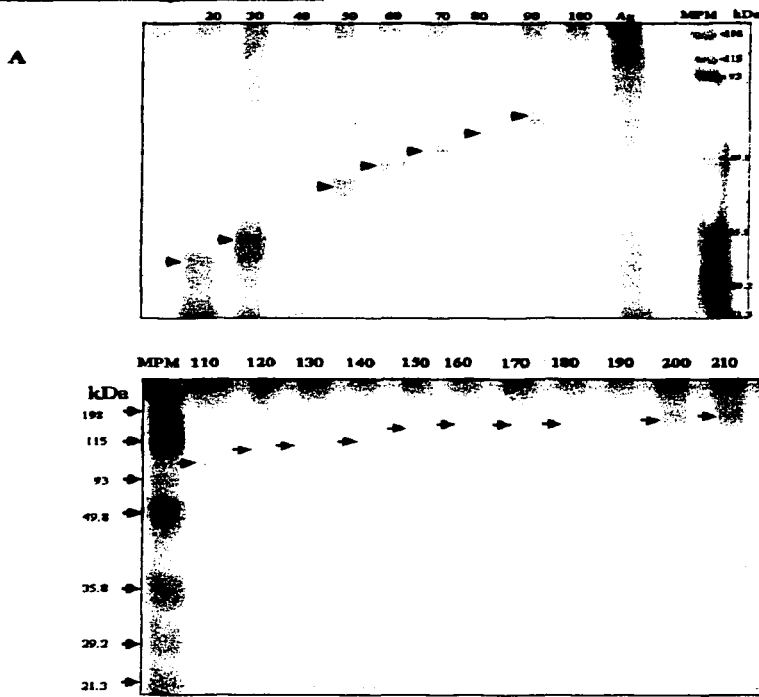


**c) Resultados del ensayo de IFN- $\gamma$ :**

Los resultados del ensayo de IFN- $\gamma$  se expresaron como valores de densidades óptica (DO) a 450nm. Como se señala en el Cuadro VI y Figura 25, las OD para los diferentes tratamientos fueron 0.624 (antígeno crudo de Méx-17), 0.229 (GRn), 0.342 (Am28/fracción 25), 0.361 (Am28/fracción 30), 0.2 (Am33), 0.345 (MSP-2/Am37), 0.139 (Am50), 0.208 (Am75/84), 0.209 (Am84/100).

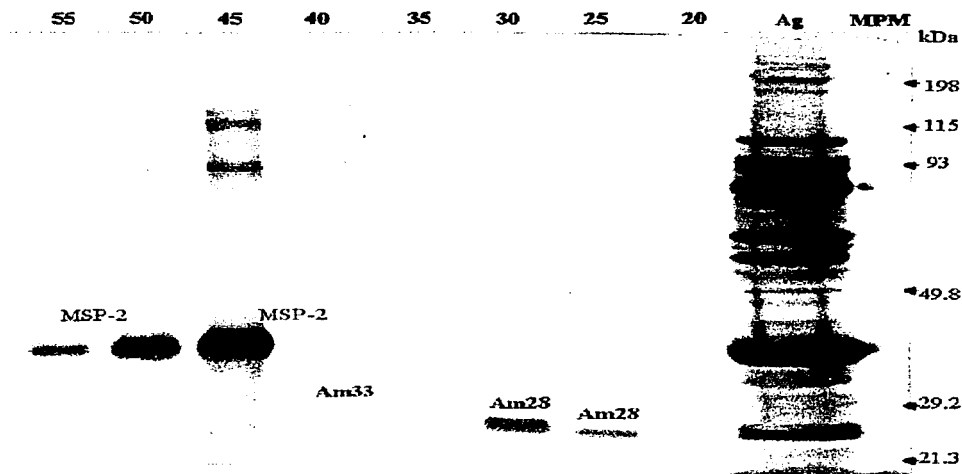


**Figura 17: Electroforesis de fracciones de la fracciones separadas por electroforesis de flujo continuo**



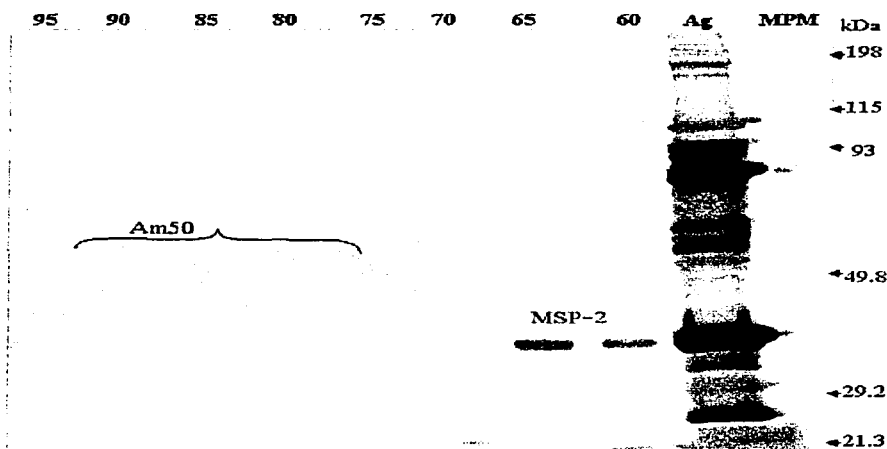
**LEYENDA:** 10 $\mu$ l de las fracciones fueron probadas en geles de poliacrilamida a 12.5% y teñido por la técnica de plata. Las flechas muestran bandas de las proteínas teñidas con plata. Panel superior fracciones 20 al 100, panel inferior fracciones 110 - 210.

**Figura 18: Western blot de fracciones No. 20 al 55 de proteínas de *A. marginale* (Méx-17) obtenidas por electroforesis de flujo continuo:**



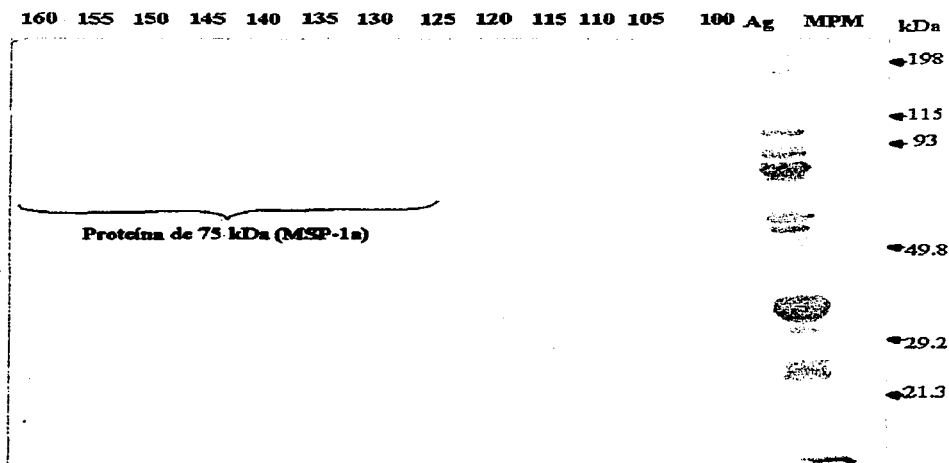
**LEYENDA:** 5  $\mu$ l de cada fracción mostrada en la parte superior del gel se usó por carril en un gel de poliacrilamida a 12.5% y transferidas a una membrana PVDF y probado con suero inmune a *Anaplasma*.

**Figura 19 Western blot de fracciones No. 60 al 95 de proteínas de *A. marginale* (Méx-17) obtenidas por electroforesis de flujo continuo:**



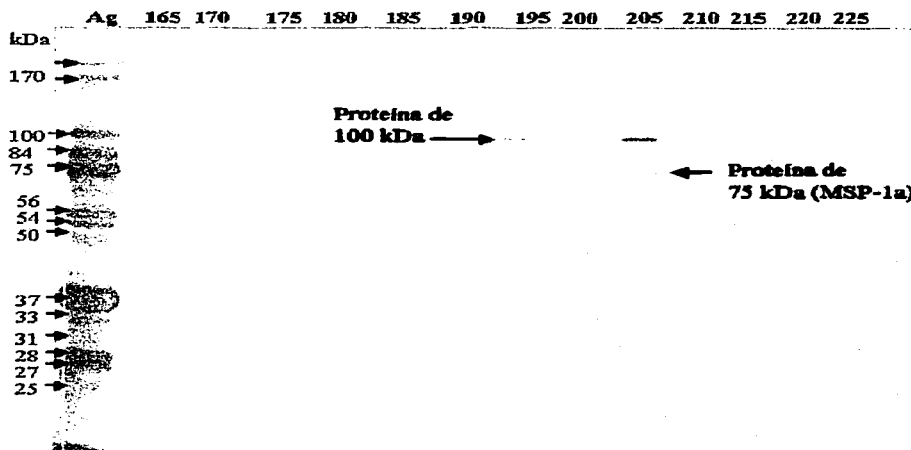
**LEYENDA:** 5 $\mu$ l de cada fracción mostrada en la parte superior del gel se usó por carril en un gel de poliacrilamida a 12.5% y transferidas a una membrana PVDF y probado con suero inmune a *Anaplasma*.

**Figura 20: Western blot de fracciones No. 100 al 160 de proteínas de *A. marginale* (Méz-17) obtenidas por electroforesis de flujo continuo:**



**LEYENDA:** 5 $\mu$ l de cada fracción mostrada en la parte superior del gel se usó por carril en un gel de poliacrilamida a 12.5% y transferidas a una membrana PVDF y probado con suero inmune a *Anaplasma*.

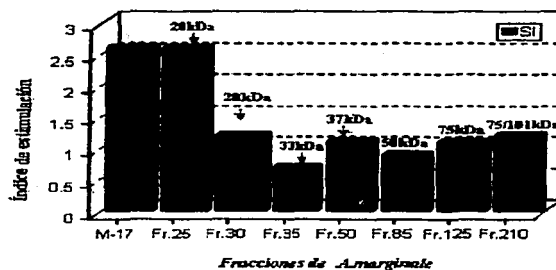
**Figura 21 Western blot de fracciones No. 165 al 225 de proteínas de *A. marginale* (Méx-17) obtenidas por electroforesis de flujo continuo:**



**LEYENDA:** 5  $\mu$ l de cada fracción mostrada en la parte superior del gel se usó por carril en un gel de poliacrilamida a 12.5% y transferidas a una membrana PVDF y probado con suero inmune a *Anaplasma*.

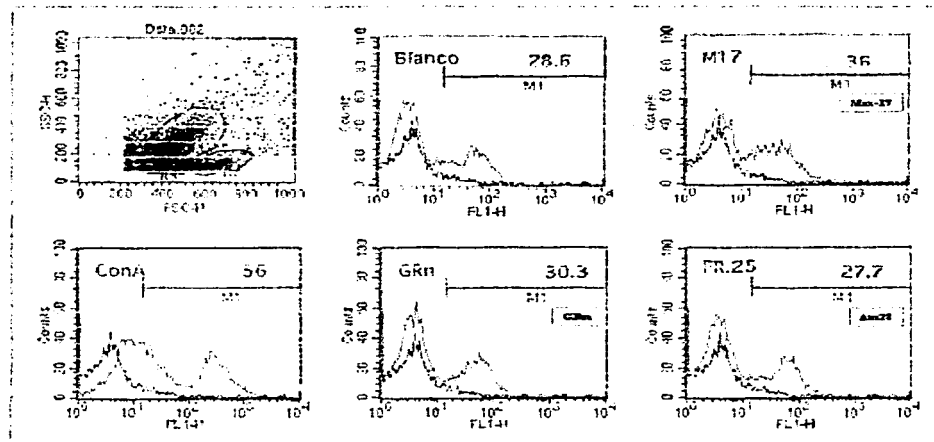


**Figura 22: Índice de estimulación en PBMC estimulados con diferentes fracciones de proteínas de *A. marginale* (Méx-17):**



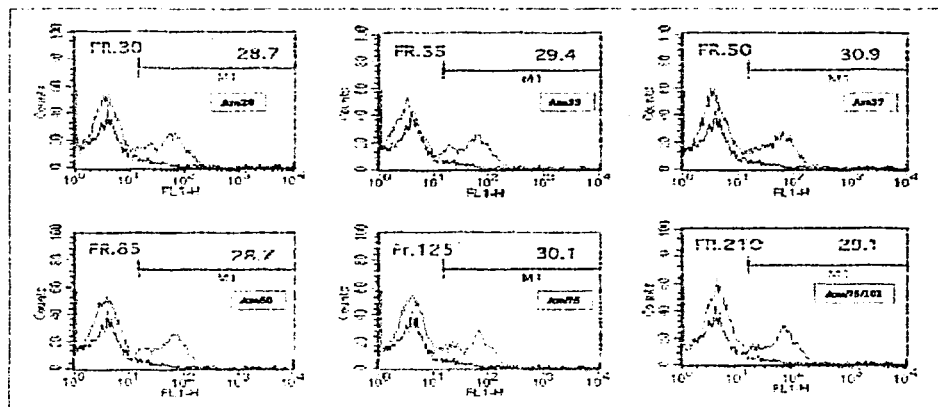
**LEYENDA:** Se cultivaron PBMC de un bovino que fue protegido por inmunización con inmunogeno de la cepa Méx-17 de *A. marginale* en presencia de fracciones de proteínas de la misma cepa obtenidas por electroforesis de flujo continuo. El ensayo de linfoproliferación in vitro se llevó a cabo como est descrito en Materiales y Metodos del capítulo IV. Se utilizó como control extractos crudo de la misma cepa de *A. marginale* (Méx-17).

**Figura 23: Resultados de análisis citométrico para células CD4+ inducida por extractos de *A. marginale* (Méz-17), proteína de GRn, Con-A y la fracción No. 25 de extractos de Méz-17:**



**LEYENDA:** Las fracciones fueron probadas *in vitro* con respecto de su capacidad para inducir la respuesta linfoproliferación de células CD4+. Cada fracción se probó como 5% v/v del medio de cultivo RPMI para estimular PBMC cultivado durante 4 días a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y después se llevó a cabo el marcado de células con un anticuerpo monoclonal anti-CD4+ de bovino de origen de antes de hacer el análisis citométrico en un fluorómetro de flujo

**Figura 24: Resultados de análisis citométrico para células CD4+ inducida por fracciones No. 30, 35, 50, 85, 125 y 210:**



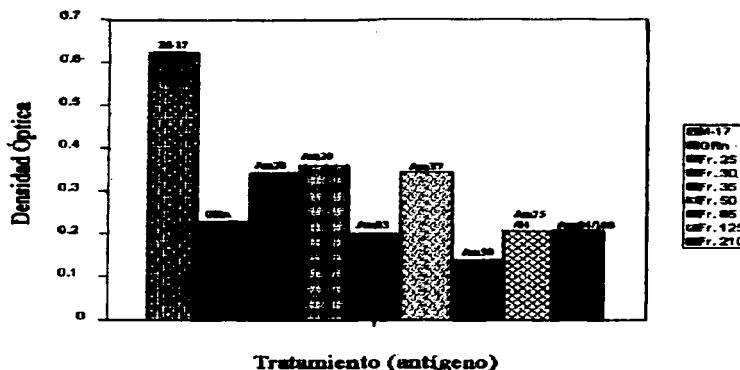
**LEYENDA:** Las fracciones fueron probadas in vitro con respecto de su capacidad para inducir la respuesta linfoproliferación de células CD4+. Cada fracción se probó como 5% v/v del medio de cultivo RPMI para estimular PBMC cultivado durante 4 días a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y después se llevó a cabo el marcado de células con un anticuerpo monoclonal anti-CD4+ de bovino de origen de antes de hacer el análisis citométrico en un fluorómetro de flujo.

Cuadro VI: Ensayo inmunoenzimático para determinar la IFN- $\gamma$  en sobrenadantes de cultivo de PBMC provenientes de un bovino inmunizado y protegido contra *A. marginale* (Valores de Densidad Óptica a 450nm):

Tratamiento (antígeno)	Contenido	Densidad Óptica a 450nm
Con A		3.751
M-17	Ag. crudo	0.624
GRn		0.229
Fr-25	Am28	0.342
Fr-30	Am28	0.361
Fr-35	Am33	0.200
Fr-50	37kDa	0.345
Fr-85	Am50	0.139
Fr-125	75/84kDa	0.208
Fr-210	84/100kDa	0.209

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Figura 25: Producción de IFN- $\gamma$  por PBMC del bovino inmunizado y protegido cultivado *in vitro* en presencia de fracciones de *A. marginale* (M $\acute{e}$ x-17):**

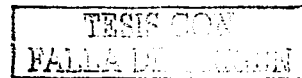


**LEYENDA:** Fr seguido por un número representa el número de la fracción de EFC, M-17, extractos crudos de *A. marginale* (cepa M $\acute{e}$ x-17) y GRn proteína de glóbulos rojos no infectados. Las dos fracciones Fr. 25 y Fr. 30 (No 25 y No.30) contienen la nueva proteína denominada Am28.

#### 5.4 DISCUSIÓN Y RECOMMENDACIONES:

La separación de proteínas por EFC se logró exitosamente considerando que se obtuvieron fracciones con proteínas de tamaño de acuerdo con las que se habían previamente demostrados por inmunoblot. La detección de proteínas por inmunoblot en las fracciones demuestra además que se conservaron los epitopos B y muy probablemente los de las células T ya que las proteínas fraccionadas por EFC fueron fuertemente reconocidas por sueros inmunes a la Anaplasmosis al inmunoblot. Aunque se esperaba un cierto grado de desnaturalización de los epitopos de los antígenos durante los largos procesos de la electroforesis, nuestros resultados mostraron que no fue suficiente para eliminar completamente la reactividad de los antígenos de interés y que hasta donde se pudo observar la EFC es un método práctico para este tipo de estudios. Sin embargo, de las proteínas nuevas previamente demostradas en inmunoblots, las de Am52, Am56, Am170 no se detectaron por inmunoblot de las fracciones. Este puede deber a que están expresadas en cantidades muy pequeñas que se disminuyen aún por la desnaturalización parcial y las pérdidas que ocurren durante el fraccionamiento dando cantidades tan pequeñas y difíciles de detectar por los dos ensayos de inmunoblot y la tinción con la técnica de plata.

Al análisis de las fracciones probadas y detectadas por inmunoblot, la proteína de 28kDa (Am28) mostró un IE comparable con el del antígeno crudo de Méx-17 por lo que se podría concluir que ésta proteína es de alta inmunogenicidad en comparación con todas las otras proteínas nuevas con especificidad de IgG2. El desarrollo de una vacuna eficaz en el futuro podría considerarse esta proteína sea sola o en combinación con otras proteínas de la membrana de la superficie de *A. marginale*. Sin embargo el análisis citométrico no dio resultados concluyentes en cuanto a la capacidad de inducir una respuesta de CD4+. Tomando en cuenta que las fracciones se ensayaron en



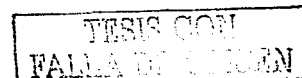
presencia de PBMC, otros estudios deben de llevarse a cabo para comprobar todas las nuevas proteínas con líneas específicas de células CD4+ provenientes de bovinos protegidos por vacunación contra la Anaplasmosis con capacidad de responder ante el estímulo por el antígeno crudo. Brown (2003, comunicación personal) comenta que este tipo de ensayo basado sólo en PBMC aunque puede dar resultados confiables, no es suficientemente sensible para detectar una respuesta de linfocitos CD4+ *in vitro* sobre todo cuando se utilizan antígenos en fracciones obtenidas por técnicas desnaturalizantes como es el EFC por lo que se recomienda probar éstas proteínas con líneas de células CD4+. Las líneas de linfocitos T CD4+ han sido utilizadas para estudiar propiedades inmunoprotectoras de antígenos específicos de *A. marginale* por Brown y col., (1998, 2001).

Para las fracciones de proteínas de 37 kDa (MSP-2/Am37), 75/100 kDa (MSP-1a y MSP-3) el ensayo citométrico para células CD4+ mostró índices comparables con los de los extractos crudos de la cepa Méx-17 de *A. marginale*. Este resultado es entendible considerando que las MSP-1a, MSP-2 y MSP-3 han sido reportadas por sus propiedades inmunoprotectoras por lo que se hubieran esperado dar una respuesta positiva y comparable con la de los extractos crudos de *A. marginale*. Brown y col., (1998, 2001) han probado estas proteínas ampliamente y reportan que están reconocidas por linfocitos provenientes de bovinos protegidos por la vacunación. Sin embargo, en este estudio, el extracto de GRn también indujo un índice comparable con el de los extractos crudos de *A. marginale* por lo que hace estos resultados difíciles de interpretar, sin embargo, hay que recordar que los animales vacunados recibieron tres veces cuerpos iniciales provenientes de una purificación incompleta contaminada con restos de membranas eritrocíticas, al momento de ensayar un extracto de eritrocitos como testigo en el ensayo de linfoproliferación

la respuesta observada no es sorprendente ya que se presupone que los animales vacunados hayan desarrollado una respuesta contra antígenos del eritrocito que se reflejó en dicho ensayo.

Para entender mejor el papel inmunológico que juegan las nuevas proteínas, se recomienda llevar a cabo varios estudios dirigidos a:

- Determinar la localización de las proteínas en el cuerpo inicial dando especial importancia a aquellas que se ubiquen en la membrana ya que las de la superficie estarían directamente expuestas al sistema inmune y serían capaces de inducir una respuesta inmune. Los varios estudios de inmunización han demostrado que los inmunógenos basados en membranas de superficie de los CI inducen una mejor protección (Tebele y col., 1991) especialmente las proteínas de la membrana: MSP-1 y MSP-2.
- Determinar el papel biológico de estas proteínas. Se espera que algunas de las nuevas proteínas sean receptores importantes en el metabolismo de *A. marginale* ubicadas en la membrana. Esto implicaría que usarlas para diseñar una vacuna tendría mucho éxito ya que al tomarlas como un blanco del sistema inmune se estarían bloqueando procesos importantes para la supervivencia de la rickettsia.
- Determinar con exactitud el peso molecular de cada antígeno. Estos ensayos pueden llevarse a cabo por espectroscopia de masas para elucidar la estructura molecular de estas proteínas y determinar el PM exacto de cada una de las nuevas proteínas. El conocimiento de la estructura molecular ayudaría en el entendimiento de los epítomos y esta información se podría usar como base para diseñar vacunas de péptidos sintéticos.
- Secuenciar el extremo amino de estas proteínas para permitir el diseño de oligonucleótidos (iniciadores) que podrían utilizarse





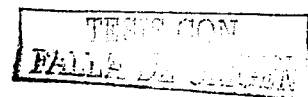
para amplificar y clonar los genes correspondientes. La clonación de las nuevas proteínas permitiría ensayos con sus contrapartes recombinantes como vacunas ya que muchas de las nuevas proteínas se expresan en cantidades muy pequeñas lo que hace difícil obtenerlas para amplios estudios de la inmunización.

- Estudiar los genes de estas proteínas mediante programas de computadora detectar las secuencias de epítopos Th1 en función del contexto del CPH de clase II
- Llevar a cabo estudios de inmunización con vacunas de subunidad que sean compuestas por una combinación de las nuevas proteínas con las proteínas ya estudiadas como el complejo MSP-1.



**BIBLIOGRAFÍA:**

- Adams, J.H., Smith, R.D., Kuhlenschmidt., M.S. 1986.** Identification of antigens of two isolates of *Anaplasma marginale*, using a Western blot technique. Am. J. Vet. Res. 47:501-506.
- Adler, H.E., Peterhans, E.E., Nikolett, J., and Jungi, T.W. 1994.** Inducible L-arginine-dependent nitric oxide synthetase activity in bone marrow-derived macrophages, Bioch. Biophys. Res. Commun. 198:510-515.
- Aebischer, T., Wolfram, M., Patzer, S.I., and Overrath, P. 2000.** Subunit vaccination of mice against new world cutaneous leishmaniasis. Comparison of three proteins expressed in amastigotes and six adjuvants. Inf. and Immun. 68(3):1328-1336.
- Alderich, F.J., and Dietrich, R. 1981.** Anaplasmosis in Texas. Epidemiologic and economic data from a questionnaire survey. In: Proc. Of the 7th National anaplasmosis conference. Edited by Hidalgo, R.J. and Jones, EW. Mississippi State University Press, Mississippi. p:27.
- Alleman, A.R., Kamper, S.M., Barbet, A.F. 1991.** Determination of the genome size of *Anaplasma marginale*. In: abstracts of the 72<sup>nd</sup>. Conference of Research Workers in Animal Diseases. Chicago 25.
- Alleman, A.R. and Barbet, A.F. 1996.** Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 (MSP-3) as a diagnostic test antigen. J. Clin. Microbiol. 34:270-276.
- Alleman, A.R., Palmer, G.H., McGuire, T.C., McElwain, T.F., Perryman, L.E., Barbet, A.F. 1997.** *Anaplasma marginale* major surface protein 3 is encoded by a polymorphic, multigene family. Infect. Immun. Jan;65(1):156-63.
- Allison, I. et al. 1985.** In: Manual for cell proliferation ELISA system, version 2, code RPN 250. Amershampharmacia biotech. pp. 2-43.



Allred, D.R., McGuire, G.H., Palmer, G.H., Leib, S.R., Harkins, T.M., McElwain, T.F., and 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.

Amerault, T.E., and Roby, T.O. 1968. A rapid card agglutination test for bovine anaplasmosis. JAVMA 153:1828-1834.

Anon, 1984. Immunization against bovine anaplasmosis. Tick and Tick-Borne Disease Control. A Practical Field Manual. Vol. II Food and Agricultural Organization of the United Nations. Rome 1984. pp.444-456.

Barbet, A.F., Anderson L.W., Palmer, G.H., and McGuire, T.C., 1983. Comparison of proteins synthesized by two different isolates of *A. marginale*. Infect. Immun. 40:1068.

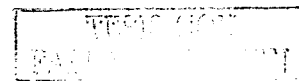
Barbet, A.F., Blentlinger, R., Lundgren, A.M., Blouin, E.F., Kocan, K.M. 1999. Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture and cattle. Infect. & Immun. 67:102-126.

Barbet, A.F. 1995. Recent developments in the molecular biology of anaplasmosis. *Vet. Parasitol.* 57. 43-49.

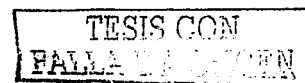
Barbet A.F., Palmer, G.H., Myler, P.J., and McGuire, T.C. 1987. Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for a polypeptide Am105L. Infect. Immun. 55:2428-2435.

Barbet, A.F., Lundgren, A.M., Yi., Rurangirwa, F.R., Palmer, G.H. 2000 Antigenic variation of *Anaplasma marginale* by expression of MSP-2 mosaics. Infect Immun. 68(11):6133-8.

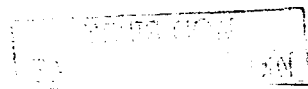
Barnett, S.F., 1974. Economical aspects of protozoan Tick-Borne Diseases in livestock in parts of the world other than Britain. Bull. Off. Int. Epiz. 81: 183-196.



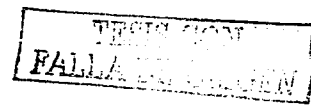
- Bear, P.D., and Philpott, M.S. 1987.** Isolation and characterization of *Anaplasma marginale* DNA. *Curr. Microbiol.* 15:171.
- Blouin, E.F., Barbet, A.F., Kocan, K.M., and Saliki, J.T. 2000.** Establishment and characterization of an Oklahoma isolate of *Anaplasma marginale* in cultured *Ixodes scapularis* cells. *Vet. Parasitol.* 87:301-313.
- Blouin, E.F., Saliki, J.T., de la Fuente, J., Garcia-Garcia, J.C and Kocan, K.M. 2003.** Antibodies to *Anaplasma marginale* major surface proteins 1a and 1b inhibit infectivity for cultured tick cells. *Vet. Parasitol.* 111:247-260.
- Blouin, E.F., Saliki, J.T., Kocan, K.M., and Rogers, S.J. 1998.** Evaluation of *Anaplasma marginale* from tick cell culture as an immunogen for cattle. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 849:253-258.
- Blouin, E.F., Kocan, K.M. 1998.** Morphology and development of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in cultured *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) cells. *J. Med. Entomol.* 35:788-797.
- Blouin, E.F., and Kocan, K.M. 1999.** Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture, tick salivary glands and cattle. *Infect. Immun.* 67:102-107.
- Boch, R.E., de Vos, A.J.J., Kingston, T.G., and McLellan., D.J., 1997.** Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale*. *Aust. Vet. J.* 1997:75:337-340.
- Bowie, M.V., de la Fuente, J., Kocan, K.M., Blouin, E.F., and Barbet, A.F. 2002.** Conservation of major surface protein 1 genes of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between tick and cattle. *Gene* 282, 95-102.
- Bradford, O.F. 1986.** Adaptation of the protein assay to membrane-bound proteins by solubilizing in glucopyranoside detergents. *Anal. Biochem.* 162:11-17.



- Brayton, K.A., Knowles, D.P., McGuire, T.C., and Palmer, G.H. 2001.** Efficient use of a small genome to generate antigenic diversity in tick-borne ehrlichial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98,4130-4135.
- Brock, W.E., Kliever, I.O., and Pearson, C.C. 1965.** A vaccine for anaplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 147:948-951.
- Brown, W.C., Zhu, D., Shkap, V., McGuire, T.C., Blouin, E.F., Kocan, K.M., and Palmer, G.H. 1998.** The repertoire of *Anaplasma marginale* antigens recognized by CD4(+) T-lymphocyte clones from protectively immunized cattle is diverse and includes major surface protein 2 (MSP-2) and MSP-3. *Infect Immun.* 66(11):5414-22.
- Brown, W.C., Shkap, V., Zhu, D., McGuire, T.C., Tuo, W., McElwain, T.F., and Palmer G.H. 1998.** CD4+ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infect. Immun.* 66:5406-5413.
- Brown, W.C., Palmer, G.H., Lewin, H.A., and McGuire, T.C., 2001.** CD4+ T-lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* major surface protein 1 (MSP-1), a heteromeric complex of MSP-1a and MSP-1b, preferentially recognize the MSP-1a carboxyl terminus that is conserved among strains. *Infect. Immun.* Vol 69.6853-6862.
- Brown, W.C., Zhu, D., Shkap, V., Travis, V., McGuire, Blouin, E.F., Kocan, K.M., and Palmer, G.H. 1998.** The repertoire of *Anaplasma marginale* antigens recognized by CD4+ T-lymphocyte clones from protectively immunized cattle is diverse and includes major surface protein 2 (MSP-2) and MSP-3. *Infect. Immun.* pp.5414-5422.
- Brown W.C, Zhu D, Shkap V, McGuire T.C, Blouin E.F, Kocan K.M, and Palmer G.H. 1998.** The repertoire of *Anaplasma marginale* antigens recognized by CD4(+) T-lymphocyte clones from



- protectively immunized cattle is diverse and includes major surface protein 2 (MSP-2) and MSP-3. *Infect Immun.* 66 (11):5414-22.
- Buening, G.M. 1973.** Cell-mediated immune responses in calves with anaplasmosis. *Am. J. Vet. Res.* 34:757-763.
- Buening, G.M. 1976.** Cell-mediated immune responses in anaplasmosis as measured by a micro cell mediated cytotoxicity assay and leukocyte migration-inhibition test. *Am. J. Vet. Res.* 37:1215-1218.
- Callow, L.L. 1976.** Tick-Borne livestock diseases and their vectors. Australian methods of vaccination against anaplasmosis and babesiosis. *World. Anim. Rev.* 1818-1819.
- Cantor, G.H., Pontzer, C.H., and Palmer, G.H., 1993.** Opsonization of *Anaplasma marginale* mediated by bovine antibody against major surface protein I. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 37(3-4):343-350.
- Carson, C.A., Sells, D.M., and Ristic, M. 1976.** Cutaneous hypersensitivity and isoantibody production in cattle injected with live or inactivated *Anaplasma marginale* in bovine and ovine erythrocytes. *Am. J. Vet. Res.* 37:1059-1063.
- Carson, C.A., Sells, D.M., and Ristic, M. 1977.** Cell-mediated immune response to virulent and attenuated *Anaplasma marginale* administered to cattle in live and inactivated forms. *Am. J. Vet. Res.* 38:173-179.
- CONASA. 1995.** Análisis de la situación de las vacunas contra anaplasmosis y babesiosis. Conclusiones y recomendaciones presentadas por el comité de enfermedades parasitarias. Memorias de la IV Reunión Anual. 14-17 de Nov. México DF. Pp79-81.
- CONASA, 1995.** Experiencias sobre el uso de vacunas contra *Anaplasma marginale*. Memoria de la IV reunión Anual 14-17 de nov. México D.F. pp.452.



- Conrad, P.A., Iams, K., Brown W.C., Sohanpal B., and Ole-moi Yoi, O.K. 1987.** DNA probes detect genome diversity in *Theileria parva* stocks. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25:213-226.
- Corrier, D.E., Kuttler., K.L., and Terry, M.K. 1983.** Observations on anaplasmosis following field exposure to heavy and light infestations with *Boophilu microplus*. *Vet. Parasitol.* 13(2):187-190.
- Cossio-Bayugar, R., Rodríguez, S.D., García-Ortiz, M.A., García-Tapia, D., and Aboytes-Torres, R. 1997.** Bovine anaplasmosis prevalence in northern Veracruz state, México. *Prev. Vet. Med.* 32:165-170.
- Cox, E.R., and Dimopoulos, G.T., 1972.** Demonstration of an autoantibody associated with anaplasmosis. *Am. J. Vet. Res.* 33:67-76.
- Dalglish, R.J., 1984.** Consideraciones actuales sobre la anaplasmosis del ganado bovino. *Reseña, CIDA*, 12.
- de la Fuente J., García-García J.C., Blouin E.F and Kocan K.M. 2001** Differential adhesion of major surface proteins Ia and Ib of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. *Int J Parasitol.* 31(2):145-153.
- de la Fuente J., Kocan K.M., García-García J.C., Blouin E.F and Saliki, J.T. 2002.** Vaccination of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture and bovine erythrocytes followed by challenge-exposure with infected ticks. *Vet. Microbiol.* 89:239-251.
- de Waal, D.T. 2000.** Anaplasmosis control and diagnosis in South Africa. *New York Acad. Of Sci.* 916:474-483.
- Delegación mexicana. 1981.** Estimación de pérdidas económicas por enfermedades en la ganadería mexicana durante el año de 1980. *Bull. Off. Int. Epiz.* 93:903.
- Dennis, R.A., O'Hara, P.J., Young M.F., and Doris, K.D., 1970.** Neonatal immunohemolytic anemia and icterus of calves. *JAVMA.* 156:1861-1869.



**Dickmans, G., 1950.** The transmission of anaplasmosis. *Am. J. Vet. Res.* 11,5-16.

**Dimopoulos, G.T. and Bedell, D.M. 1962.** Studies of bovine erythrocytes in anaplasmosis. II. Chemical and physical changes in erythrocytes in the mechanism of anemia in splenectomised calves. *Am j.Vet. Res.*23:813-820.

**Dumler, J.S., Barbet, A.F, Bekker, C.P.J., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rihikisa, Y., and Rurangirwa, F.R. 2001.** Reorganisation of genera in the families *Rickettsiaceae* and *anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. of Syst. Evol. Microbiol.* 51:2145-2165.

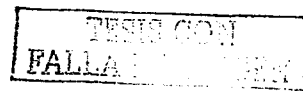
**Eid, G., French, D.M., Lundgren, A.M., Barbet A.F., McElwain, T.F. and Palmer G.H. 1996.** Expression of major surface protein 2 antigenic variants during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia.. *Infec. Immun.* 64:836-841.

**Eriks, I.S., Stiller, D. and Palmer, G.H. 1993.** Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission.. *J. Clin. Microbiol.* 31:2091-2096.

**Estes, D.M., Closer., N.M., and Allen, G.K. 1994.** IFN- $\gamma$  stimulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti- $\mu$  and mitogen. *Cell. Immunol.* 154:287-295.

**Ewing, S.A., 1981.** Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. In: Proc of the 7<sup>th</sup> National Anaplasmosis Conference, Mississippi State University, MS, USA, pp.395-423.

**Figueroa, M.V.J., Ramos, A.J.A., Rojas, R.E.E., Satiago, V.C, Cantó, A.G.J., Granjero, C.G., García-Ortiz, M.A., y Parrodi., L.F. 1997.** Evaluación en condiciones de campo de una vacuna





inactivada de *Anaplasma marginale* denominada Plazvax®. Decima reunión Científica-Tec. Veracruz.

**Fragoso, H.S. 1991.** La anaplasmosis bovina en México. Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten. 9, 10 y 11 de octubre. Oaxetepec. Morelos.

**Fragoso, S.G., y F. Millan. 1983.** Prevalencia de anticuerpos contra *Anaplasma marginale* y *Babesia spp.* En la zona centro del estado de Guerrero. Reunión nacional de investigación Pecuaria en México., México D.F., pp. 199-203.

**French, D.M., Brown W.C., and Palmer., G.H. 1999.** Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia Infect. Immun. 67:5834-5840.

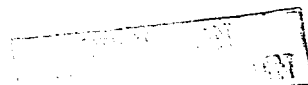
**French, D.M., McElwain, T.F., McGuire T.C., and Palmer, G.H. 1998.** Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. Infect. Immun. 66:1200-1207.

**Gale, K.R., Gartside, M.G., Dimmock, C.M., Zakrzewski, H., and Leach, G. 1996.** Peripheral blood lymphocyte proliferative responses in cattle with or vaccinate against *Anaplasma marginale*. Parasitol. Res. 82:551-562.

**Gale, K.R., Leach, G., Gartside, M.G., and Dimmock, C.M., 1992.** *Anaplasma marginale*. Failure of sera from immune cattle to confer protection in in passive-transfer experiments. Parasitol. Res.,78:410-415.

**García-Ortiz, M.A., Angeles-Ojeda, L.E., Hernández-Salgado, G., García-Tapia, D., Aboytes-torres, R., y Rodríguez, S.D. 1998.** Caracterización de la virulencia de un aislado mexicano de *Anaplasma marginale*. Tec. Pec. Méx. 36(3):197-202.

**Ge, N.L., Kocan, K.M., Blouin, E.F. and Murphy, G.L. 1996.** Developmental studies of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales;



*Anaplasmataceae*) in male *Dermacentor andersoni* (Acari:Ixodidae) infected as adults using no-radioactive *in situ* hybridization. J. Med. Ent. 33:911-920.

González, I.A., Vega y Murguía, C.A., Rodríguez, S.C., Flores, J.J., Fernández, M.R., y Sánchez, F.L. 1983. Experiencias con la prueba de aglutinación en tarjeta para el diagnóstico serológico de anaplasmosis. Tec. Pec. Méx. 44:35-40.

Goodger, W.J., Carpenter, T., Reinman, H. 1979. Estimation of Economic Loss Associated with anaplasmosis in California Beef Cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 174:1333-1336.

Hart, L.T., Luther, D.G., and Todd, W.J. 1991. *Anaplasma marginale* antigen, antigen compositions, vaccine and process for the production of said antigen, antigen compositions and vaccine. United States patent No. 4,956,278.

Hart, L.T., Todd, W.J., and Luther, D.J. 1988. *Anaplasma marginale* antigen, antigen composition, vaccine and process for the production of said antigen, antigen composition and vaccine. US Pat. Appl. A. Hy DK T No.102.

Henry, T., Norman, B.B., Fly, D.E., Wichmann., R.A., and York, S.M., 1983. Effects and use of modified live *Anaplasma marginale* vaccine in beef heifers in California. J. Am. Vet. Med. Assoc. 183:66-69.

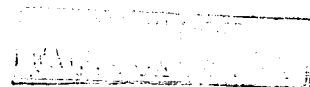
Howell, D.E. 1957. Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. In: Proc. 3rd National Research Conference on Anaplasmosis in cattle, Manhattan, Ks. Pp 14-16.

Hugh-Jones, M.E., Busch, D., Raby, C., and Jones F., 1988. Seroprevalence survey for *Anaplasma* card test reaction reactors in Louisiana, USA, cattle. Preventive Veterinary Medicine, 6: 143-153.

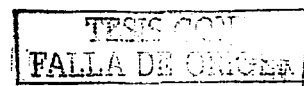
James, M.A., Coronado, A., and López, W. 1985. Seroepidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Venezuela. Trop. Anim. Prod. 17:8-18.

TRIS CON  
FALLA DE ORIGEN

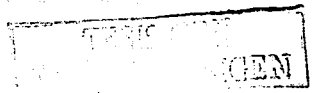
- Jones, E.W., Kliwer, I.O. Norman, B.B., and Brock, W.E., 1968. *Anaplasma marginale* infection in young and aged cattle. Am. J. Vet. Res. 29:535-544.
- Jorgensen, W.K., Weilgama, D.J., Navaratne, M., and Dalglish, R.J. 1992. Prevalence of *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* at selected localities in Sri Lanka. Trop. Anim. Prod. 24:9-14.
- Kieser, S.T., Eriks, I.S., and Palmer, G.H. 1990. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* of cattle. Infect. Immun. 58:1117-1119.
- Knowles, D.P., Toroni, de Echaide, S., Palmer, G.H., McGuire, T.C., Stiller, D. and McElwain, T. 1996. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP-5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. J. Clin. Microbiol. 34:000-000.
- Kocan, K.M., 1986. Development of *Anaplasma marginale*: coordinated of a rickettsial organism and its tick host. In: Sauer, J.R., Hair, J.A. (Eds), Morphology, Physiology and behavioral Ecology of Ticks. Horwood, Chinchester, England, pp. pp. 472-505.
- Kocan, K.M., Goff, W.L., Stiller, D. Claypool, P.L., Edwards, W., Ewing, S.A., Hair, J.A. and Barron, S.J. 1992. Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) transferred successfully from infected to susceptible cattle. J. Med. Ent. 29:657-668.
- Kocan, K.M., Halbur, T., Blouin, E.F., Onet, V., de la Fuente, J., Garcia-Garcia, J.C., and Saliki, J.T. 2001. Immunization of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture. Vet. Parasitol. 102:151-161.
- Kocan, K.M., Stiller, D., Goff, W.L., Claypool, P.L., Edwards, W., Ewing, S.A., McGuire, J.A., Hair, J.A., and Barron, S.J. 1992. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor*



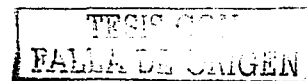
- andersoni* transferred from infected to susceptible cattle. Am. J. Vet. Res. 53:499-507.
- Kocan, K.M., Venable, J.H., and Brock, W.E., 1978. Ultrastructure of anaplasma inclusions (Pawhuska isolate) and their appendages in intact and hemolysed erythrocytes and in complement fixation antigen. Am. J. Vet. Res. 39:1123-1129.
- Kocan, K.M., Yelling, T.N., Ewing, S.A., Hair, J.A., and Barron, S.J., 1984. Morphology of colonies of *Anaplasma marginale* in nymphal *Dermacentor andersoni*. Am. J. Vet. Res. 45:1434-1440.
- Kreir, J.P., and Ristic, M. 1972. Definition and taxonomy of *Anaplasma* species with emphasis on morphologic and immunologic features. Z. Tropenmed. Parasitol., 23:88-89.
- Krigel, Y., Pipano, E., Shkap, V. 1992. Duration of carrier state following vaccination with live *Anaplasma centrale*. Trop. Anim. Health Prod. 24:209-210.
- Krueger, C.M. 1989. Comparison and detection of *Anaplasma* genomes by bacterial restriction endonucleases DNA analysis. (BRENDA), restriction fragment length polymorphism (RFLP) and in situ hybridization. PhD dissertation, university of Missouri, Columbia, 1989.
- Krueger, C.M., Buening G.M., Kiden D.A., Aboytes-torres, R., Turn, J. 1989. Detection of *Anaplasma marginale* genome in bovine tissues by in situ hybridisation. In Proc. 8<sup>th</sup> National Veterinary Hemoparasite Disease Conference St. Louis, 83.
- Kuttler, K.L., 1984. *Anaplasma* infection in wild and domestic ruminants: a review J. Wild Dis. 20, 12-20.
- Kuttler, K.L., Zaugg, J.L., and Johnson, L.W. 1984. Serologic and clinical responses of preimmunized, vaccinated, and previously infected cattle to challenge exposure by two different *Anaplasma marginale* isolates. Am. J. Vet. Res. 45(11): 2223-2226.



- Laemmli, U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lew, A.E., Bock, R.E., Minchin, C.M., Masaka, S. 2002.** A *msp1 $\alpha$*  polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. *Vet. Microbiol.* 86: 325-335.
- López, S.F., Cantó, G.J., Falcón, A.N., Aboytes, R.T. 1984.** Prevalencia de anaplasmosis y babesiosis en el centro experimental pecuario de Aldama, Tamaulipas. *Téc. Pec. Méx.* 46:88-92.
- López, S.F., Fajardo, J., y Cantó, G.J.A. 1983.** Prevalencia de anticuerpos contra la anaplasmosis y la babesiosis e incidencia de infección diaria de babesiosis en bovinos del municipio de Playa Vicente, Veracruz. *Téc. Pec. Méx.* 44:82-85.
- López, S.F., Fernández, R. y Cantó G.J.A., 1981.** Prevalencia de anticuerpos contra *Anaplasma marginale* y *Babesia spp.* en el municipio de Comaltitlán, Chiapas, *XV Reunión anual del instituto nacional de Investigaciones Pecuarias, SARH*. México, D.F. pp.457-459.
- Losos, G.J. 1986.** Anaplasmosis pp.742-795. In: G.L. Losos (ed) *Infectious Tropical Diseases of Domestic Animals*. Longman Press, Essex. United Kingdom.
- Lotze, J.C. 1944.** Carrier cattle as a source of infective material for horsefly transmission of anaplasmosis. *Am. J. Vet. Res.* 5:164-165.
- Lotze J.C. 1947.** Variables and constants in bovine anaplasmosis and their relationship to chemotherapy. *Am. J. Vet. Res.* 8:267-274.
- Maas, J., Lincoln, S.D., Coan, M.E. Kuttler, K.L. 1986.** Epidemiologic aspects of bovine anaplasmosis in semiarid range conditions of South Central Idaho. *Am. J. Vet. Res.* 47:528-533.
- Mann, D.K., and Ristic, M. 1963.** Anaplasmosis XIII. Studies concerning the nature of autoimmunity. *Am. J. Vet. Res.* 24:703-708.
- Markt, W. 1990.** Thesis Vienna University of Veterinary Medicine.

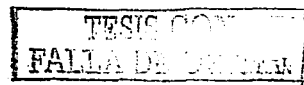


- McCallon, B.R. 1973.** Prevalence and economic aspects of anaplasmosis. In: Proc. Of the 6<sup>th</sup> National anaplasmosis conference. EW. Jones, Ed. 1-3. Heritage Press. Stillwater, OK.
- McCorkle-Shirley, S.M., Hart, L.T., Larson, A.D., Todd, W.J., and Donovan, M.S. 1985.** High yield preparation of purified *Anaplasma marginale* from infected bovine red blood cells. Am. J. Vet. Res. 46(8).
- McGarey, D.J., Barbet, A.F., Palmer, G.H., McGuire, T.C and Allred, D.R. 1994.** Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b. Infect. Immun. 62:(10)4594-4601.
- McGarey, D.J. and Allred, D.R. 1994.** Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. Infect. Immun. 62:4587-4593.
- McGuire T.C, Davis, W.C, Brassfield, A.L., McElwain, T.F., and Palmer, G.H. 1991.** Identification of *Anaplasma marginale* long-term carrier cattle by detection of serum antibody to isolated MSP-3. Clin Microbiol 29(4):788-93.
- McGuire, T.C., Palmer, G.H., Goff., W.L. Jonson, M.I., and Davis, W.C. 1984.** Common and isolate restricted antigens of *Anaplasma marginale* detected with monoclonal antibodies. Infect. Immun. 45: 697-700.
- McHardy, N., and Gilson, C. 1974.** An electron microscopic study of diagnostic antigens prepared from *Anaplasma marginale*. Z Tropenmed. Parasitol. 25:11-14.
- McHardy, N., and Sympson, R.M., 1973.** Attempts at immunizing cattle against anaplasmosis using a killed vaccine. Trop. Anim. Hlth. Prod. 5:166-73.
- Molloy, J.B., Bock, R.E., Templeton, J., Bruyeres, A.G., Bowles, P.M., Blight, G.W., and Jorgensen, W.K. 2000.** Identification of antigenic differences between cattle vaccinated with *Anaplasma*



- centrale* and cattle naturally infected with *Anaplasma marginale*. Int. J. Parasitol. 31::179-186.
- Montenegro-James, S., M.A. James Betinez, M.T., Leon, E., Guillen, A.T. 1991.** Efficacy of purified *Anaplasma marginale* initial bodies as vaccine against anaplasmosis. Parasitol. Res. 77:93-101.
- Munderloh, U.G., Blouin, E.F., Kokan, K.M., Ge, N.L., Edwards, W.L., Kurtti, T.J., 1996.** Establishment of the tick (Acari, Ixodidae)-borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales, anaplasmataceae) in tick cell culture. J. Med. Ent. 33:656-664.
- Munodzana, D., McElwain, T.F., Knowles, D.P., and Palmer, G.H. 1998.** Conformational dependence of *Anaplasma marginale* major surface protein 5 surface exposed B-cell epitopes. Inf. Immun. 66(6)2619-2624.
- Murphy, F.A., Osebold, J., and Aalund, O. 1966.** Kinetics of the antibody response to *Anaplasma marginale* infection. J. Infec. Diseases, 116:99-111.
- Nari, A., Solari, M., Cardozo, H. 1979.** Hemovacuna para el control de *Babesia spp* y *Anaplasma marginale* en el Uruguay. Veterinaria (Montevideo-Uruguay). 15:137-148.
- Ngeranwa, J.J.N., Venter, E.H., Penshorn, B.L., Soi, R.K., Mwanzia, J. and Nyongesa. 1997.** Characterization of *Anaplasma* isolates from eland (*Taurotragus oryx*) pathogenicity in cattle and sheep and DNA profiles análisis. Vet. Parasitol. 74:109-122.
- Norval, R.A.I., Fivaz, B.H., Lawrence, J.A., and Brown, A.F. 1984.** Epidemiology of tick-borne diseases of cattle in Zimbabwe. II. Anaplasmosis. Trop. Anim. Hlth Prod. 16:63-70.
- Oberle, S.M., Palmer, G.H., Barbet, A.F., McGuire T.C., 1988.** Molecular size variations in an immunoprotective protein complex among isolates of *Anaplasma marginale*. Infect. Immun. 56:1567-73.

- Oberle, S.M., Palmer, G.H. and Barbet, A.F. 1993.** Expression and immune recognition of the conserved MSP-4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.* 61:5245-5251.
- O'Farrell, P.H. 1975.** High Resolution of Two Dimensional Electroforesis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007.
- Osorno, M.B., and Ristic, M. 1977.** Anaplasmosis bovina con énfasis en control, diagnóstico, distribución de la enfermedad en México y uso de una vacuna atenuada de *Anaplasma marginale*. *Veterinaria México.* 8:85-98.
- Otim, C., Wilson, A.J., and Campbell, R.S.F. 1980.** Comparative study of experimental anaplasmosis in *Bos indicus* and *Bos taurus*. *Aust. Vet. J.* 56:262-266.
- Palmer, G.H. 2002.** The highest priority: What microbial genomes are telling us about immunity. Mini-review. *Vet. Immunol. & Immunopath.* 85:1-8
- Palmer, G.H., Barbet, A.F., Cantor, G.H. and McGuire, T.C. 1989.** Immunization of cattle with the MSP-1 surface protein complex induces protection against a structurally variant *Anaplasma marginale* isolate. *Infect. Immun.* 57:3666-3669.
- Palmer, G.H., Barbet, A.F., Davis, W.C., McGuire, T.C. 1986.** Immunization with an isolate-common surface protein protects cattle against anaplasmosis. *Science* 231:1299-1302.
- Palmer, G.H., Barbet, A.F., Musoke, A.J., Katende, Rurangirwa F.R., Shkap, V., Pipano, E., Davis, W.C., McGuire, T.C., 1988.** Recognition of conserved surface protein epitopes on *Anaplasma marginale* isolates from Israel, Kenya and the United States. *Int. J. Parasitol.* 18:33-38.
- Palmer, G.H., Oberle S.M., Barbet., A.F., McGuire, T.C. 1988.** Immunization of cattle with a 36kDa surface protein protects cattle against homologous and heterologous *Anaplasma marginale* challenge. *Infect. Immun.* 56:1526-1531.

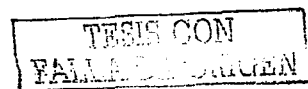




- Palmer, G.H., Eid, G., Barbet, A.F., McGuire, T.C., and McElwain, T.F. 1994.** The immunoprotective *Anaplasma marginale* protein 2 is encoded by a polymorphic multigene family. *Infect. Immun.* 62:3808-3816.
- Palmer, G.H., and McElwain, T.F. 1995.** Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Vet. Parasitol.* 57:233-253.
- Palmer, G.H. and McGuire, T.C. 1984.** Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *I. Immunol.* 133(2):1010-1015.
- Palmer, G.H., Oberle, A.M., Barbet, A.F., Goff, W.L., Davis, W.C., and McGuire, T.C. 1988.** Immunization of cattle with a 36 kilodalton surface protein induces protection against homologous and heterologous *Anaplasma marginale* challenge. *Infect. Immun.* 56:1526-1531.
- Palmer, G.H., Rurangirwa, F.R., Kocan, K.M., and Brown W.C. 1999.** Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitol. Today* 15:281-286.
- Paniagua, Z.M.J. y Sanchez, M.J.B. 1992.** Prevalencia de anticuerpos séricos contra *Anaplasma marginale* en bovinos del municipio de Berriozabal. Chiappas, XVII Congreso Nacional de buiatría. Villahermosa, Tabasco. 219.
- Parker, R.J., Sheperd, R.K., Trueman, K.F., Jones D.W., Kent, A.S. and Polkinghorne, I.G. 1985.** Suceptibility of *Bos indicus* and *Bos taurus* to *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina* infections. *Vet. Parasitol.* 17:205.
- Patarroyo, J.H.S., Henckel, D.J., Prates, A.A and Mafra, C.L. 1994.** Antigenic profile of a pure isolate of *Anaplasma marginale* of Brazilian origin, using a Western blot technique. *Vet. Parasitol.* 52:129-137.

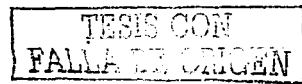
- Peterson, K.J. 1983.** An epidemiological study of bovine anaplasmosis in Oregon. Proc. US. Anim. Health Assoc. 77:75-82.
- Pipano, E., Kriegel, Y., Frank, M., Markovics, A., Mayer, E., 1986.** Frozen *Anaplasma centrale* vaccine against anaplasmosis in cattle. Br. Vet. J. 142:553-556.
- Potgieter, F.T., 1979.** Epizootiology and control of anaplasmosis in South Africa. J. South. Afr. Vet. Assoc. 50:367-372.
- Potgieter, F.T., Kocan, K.M., McNew, R.W., Ewing, S.A., 1983.** Demonstration of colonies of *Anaplasma marginale* in the midgut of *Rhipicephalus simus*. M. J. Vet. Res. 44 (12):2256-2261.
- Potgieter, F.T., Van Rensburg. 1987.** The persistence of colostral antibodies and the incidence on *in utero* transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. Ondestepoort J. Vet. Res. 54:557-560.
- Potgieter, F.T., and Stoltz., W.H. 1994.** Bovine anaplasmosis. In: Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa, Vol 1. J.A.W. Coetzer, G.R. Thomson & R.C. Tustin, Eds. 408-430. Oxford University Press, Cape Town.
- Puck, T.T., Cieciura, S.J., Robinson, A. 1958.** Genetics of somatic mammalian cells\* III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. J. Exp. Med. 108:945-955.
- Ramirez, D.J., López, F., Soffer, I., 1984.** Porcentaje de bovinos positivos a anticuerpos contra *Anaplasma marginale* y babesiosis spp. En los municipios de Martínez de la Torre, Vega de Alatorre, Atzacán y Tlapacoya, Veracruz. Memorias de X Congreso Nacional de Buiatria. Acapulco, Guerrero. 557.
- Riding, G., Hope, M., Waltisbuhl, D and Willadsen, P. 2002.** Isolation and identification of novel membrane associated antigens capable of inducing a protective immune response against *Anaplasma marginale*. Proc. 4<sup>th</sup> international conference on ticks and tick pathogens. Banff, Alberta Canada.

- Rikihisa, Y., 1991.** The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clin. Microbiol. Rev* 4:286-308.
- Rikihisa, Y., Stills, H., and Zimmerman, G. 1991.** Isolation and continuous culture of *Neorickettsia helminthoeca* in a macrophage cell line. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1928-1933.
- Ristic, M. 1960.** Anaplasmosis. *Adv. Vet. Sci.* 1:12-116.
- Ristic, M. 1968.** Anaplasmosis. In: *Blood diseases of man and animals*. Vol 2, Weinmand, Ristic, M. (eds.) Academic press., Inc., New York, N.Y. pp. 474-537.
- Ristic, M., 1980.** Anaplasmosis. In: Amstutz H.I. (ed) *Bovine Medicine and Surgery*. Am. Veterinary Publications, Inc. 2<sup>nd</sup> Ed.. Vol 1sta. Barbara, Cal. 324-348.
- Ristic, M. and Carson, C.A. 1977.** Method of immunoprophylaxis against bovine anaplasmosis with emphasis on the use of attenuated *Anaplasma marginale*. In: Miller, L.H. Pino, J.A. and McKelvey, J. Eds. *Immunity to Blood Parasites of Animals and Man*. New York: Plenum Publishing Copr. pp. 151-188.
- Ristic, M., and Kreir, J.P. 1984.** Family III: *Anaplasmataceae* Philip 1957, 980<sup>AL</sup>. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. vol 1, pp. 719-729. Edited by N.R. Krieg & J.G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Ristic, M., Watrach, A.M., 1963.** Anaplasmosis. VI. Studies and a hypothesis concerning the life cycle of development of the causative agent. *Am. J. Vet. Res.* 24: 267-276.
- Ristic, M, White, F.H., Green, J.H., Sanders. 1958.** Effect of cortisone on the mechanism of *Anaplasma* immunity in experimentally infected calves I. Hematological and immunoserological studies. *Am. J. Vet. Res.* 19:37-43.
- Rodríguez, S.D., Bucning, G.M., Vega, C.A., and Carson, C.A. 1986.** *Babesia bovis*: Purification and concentration of merozoites and infected erythrocytes. *Exp. Parasitol.* 61:236-243.



- Rodríguez, S.D., García-Ortiz, M.A., Cantó Alarcon, Hernández Salgado, Santos Cerda, N., Aboytes Torres, R. 1999.** Ensayo de una vacuna experimental inactivada contra *Anaplasma marginale* Tec. Pecu. Mex. 37(1):1-12.
- Rodríguez, S.D., García-Ortiz, M.A., Hernández Salgado, Santos Cerda, N., Aboytes Torres, R., Cantó Alarcon. 2000.** *Anaplasma marginale* inactivated vaccine: dose titration against a homologous challenge. Comp. Immunol. Microbiol. & Inf. Diseases. 23:239-252.
- Rodríguez, M.V., Montero, C., Machado, H., and Joglar, M. 2001.** The evaluation of yeast derivatives as adjuvants for the immune response to the Bm86 antigen in cattle. BMC Biotech. 1:2.
- Rogers, R.J., Blight, G.W., and Knott, S.G. 1978.** A study of the epidemiology of *Anaplasma marginale* infections of cattle in Sothern Queensland: Clinical disease and the prevalence of complement fixing antibodies. Aust. Vet. J., 54:115-120.
- Rogers, R.J., Dimmock, C.K., de Vos, A.J, Rodwell, B.J. 1988.** Bovine leucosis virus contamination of a vaccine produced against bovine babesiosis and anaplasmosis. Aust. Vet. J. 65:285-287.
- Rogers, R.J and Shiels, I.A., 1979.** Epidemiology and control of anaplasmosis in Australia. J.S. Afr. Vet. Assoc. 50:363-366.
- Salabarría, F.F., Pino, R., 1988.** Transmission vertical de *Anaplasma marginale* en bovinos infectados durante el periodo final de la gestación. Rvta. Cub. Cienc. Vet. 19(3):179-182.
- Samish, M.E., E. Pipano and Hana, B. 1988.** Cultivation of *A. marginale* from cattle in a *Dermacentor* cell line. Am. J. Vet. Res. 49:254-256.
- Sauer, J.R., J.L. McSwain, and R.C. Essenberg. 1994.** Cell membrane receptors and regulation of cell function in ticks and blood sucking insects. Int. J. Parasitol. 24:33-52.
- Schmidt, H., 1937.** Anaplasmosis in cattle. J. Am. Vet. Med Assoc. 90:723-736.

- Seddon, H.R., 1952.** Diseases of domestic animals in Australia. Part 4. Protozoan and viral diseases. Service publication No. 8 Commonwealth department of Health Canberra.
- Shkap V, Molad T, Fisk L, Palmer G.H. 2002.** Detection of the *Anaplasma centrale* strain and specific differentiation from *Anaplasma marginale* in vaccinated animals and infected animals. Parasitol. Res.; 88:546-552.
- Shkap V, Molad, T, Fish, L. and Palmer, G.H. 2002.** Expression of major surface protein 2 variants with conserved T-cell epitopes in *Anaplasma centrale* vaccines. Infect Immun. 70(2):642-648.
- Shkap, V., Pipano, E., McGuire T.C., Palmer, G.H. 1991.** Identification of immunodominant polypeptides common between *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale*. Vet. Immunol. Immunopathol. 29.:31-40.
- Sieber, H. 1910.** Uber. *Anaplasma marginale*. Ver. Tieraztl. Wschr. 50:993-998.
- Smith, T., and Kilborne, F.L. 1893.** Investigations into the Nature, Causation, and Prevention of Southern Cattle Fever. 8th and 9th Ann. Rep.. Chief. BAI, USDA, 177-304.
- Stich, R.W., Shoda, L.K.M., Dreeves, M., Adler, B., Jungi, T.W., and Brown, W.C. 1998.** Stimulation of nitric oxide production by *Babesia bovis*. Infect. Immun. 66:4130-4136.
- Stiller D., Kocan, K.M., Edwards, W., Ewing, S., Hair, J., and Barron, S.J. 1989.** Detection of colonies of *Anaplasma marginale* in salivary glands of three *Dermacentor spp.* infected as nymphs or adults. Am. J. Vet. Res 50:1382-1385.
- Stoger, J. 1990.** Thesis Vienna University of Veterinary Medicine.
- Tebele, N., McGuire, T.C., and Palmer, G.H. 1991.** Induction of protective immunity using *Anaplasma marginale* initial bodies membranes. Infect. Immun. 59:3199-3204.



- Theiler, A., 1910.** The marginal points in blood of cattle suffering from specific diseases. Rep. Gov. Vet. Bact. Transv:7.
- Theiler, A., 1911.** Further investigation into anaplasmosis of South African cattle. 1<sup>st</sup> report of the Director of Veterinary Research, union of South Africa. pp:7-46.
- Theiler, A., 1912.** Gallsickness of imported cattle and the protective inoculation against this disease. Agric. J. union S. Afr. 3:1.
- Tizard, I.R., 1996.** An introduction to Veterinary Immunology. 5th Edition. Chapter :13 pp. 153-164.
- Tjornhoj, K., Lawrence, J.A., Kafuwa, P.T., Whiteland, A.P., and Cimera, B.A. 1997.** Immunization of small holder dairy cattle against anaplasmosis and babesiosis in Malawi. Trop. Animal Health Prod. 29:77-82.
- Towbin, H., Staehlin, T., and Gordon, J., 1979.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:4350-4.
- Trápaga, B.J., Aguirre, E.J, Sobrino, A.L, 1988.** La Anaplasmosis y la babesiosis en Mexico. Informe al O.I.E. Dirección de Salud Animal SARH., México.
- Trueman, K.F., and Wilson, A.J. 1979.** Observation on the pathology of *Anaplasma marginale* infections in cattle. Aust. Adv. Vet. Sci. 5:75.
- Turton, J.A., Katsande, TC., Matingo, M.B. 1998.** Observations on the use of *Anaplasma centrale* for immunization against Anaplasmosis in Zimbabwe. Onderstepoort. J. Vet. Res. 65:81-87.
- Uilenberg, G. 1968.** [Note on babesiosis and anaplamosis in cattle in Madagascar. I. Introd. Transmission]. Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop. 21(4):467-474.

- USDA, Agricultural Research Service. 1958.** A manual for conducting the compliment fixation test for anaplasmosis. Washington, D.C. USDA. Pp. 1-20.
- Vaughn, H.W., Card, S., and Frank, F.W. 1973.** Anaplasmosis of cattle. Current information series no. 212. Moscow, ID. Univ. ID Agr. Exp. Sta.
- Vidotto, M.T., McGuire, T.C., McElewain, T.F., Palmer, G.H. and Knowles, D.P. 1994.** Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. Inf. Immun. 62:2940-2946.
- Visser, E.S., McGuire, T.C., Palmer, G.H., Davis, W.C, Shkap, V., Pipano, E., and Knowles, D.P. 1992.** The *Anaplasma marginale msp5* gene encodes a 19 kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. Infect. immune. 60:139-5154.
- Waghela, S.D., Cruz, J., Droleskey and Wagner, G.G. 1997.** In vitro cultivation of *Anaplasma marginale* in bovine erythrocytes co-cultured with endotelial cells. Vet. Parasitol. 73:43-52.
- Weisburg, W.G., Dobson, M.E., Samuel, J.E. and other authors. 1989.** Phylogenetic diversity of the *Rickettsiae*. *J. Bacteriol.* 171:4202-4206.
- Wilson, A.J., Foote, L.E., 1979.** Observations of the pathogenesis of anaplasmosis in cattle with particular reference to nutrition, breed and age. J.S. Afr. Vet. Med. Ass., 50:293-294.
- Wilson, A.J., Parker R.J., Trueman, K.F., 1980.** Anaplasmosis in *Bos indicus* type cattle. In: Johnson LAY, Cooper MG., Editors. Ticks and and tick borne diseases. Proc. Of 56<sup>th</sup> Annual conference of Australian Veterinary Association, Townsville, 1980:26-27.
- Yeruman, I., Braverman, Y., 1981.** The transmission of of *Anaplasma marginale* to cattle by blood sucking arthropods. Refuah. Vet. 38(1-2): 37-44.



Zaugg, J.L., and Kuttler, K.L., 1984. Bovine anaplasmosis *in utero* transmission and the immunological significance of ingested colostral antibodies. Am. J. Vet. Res. 45:440-443.

Zaugg, J.L., Stiller, D., Coan, M.E. and Lincoln, S.D. 1986. Transmission of *Anaplasma marginale* (Theiler) by males of *Demacentor andersoni* (Stiles) fed on Idaho field infected chronic carrier cow. Am. J. Vet. Res. 47:2269-2271.

