

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**



*Laboratorio de Inmunología y Parasitología, Instituto Nacional de Tecnología  
Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Rafaela*

**Producción y evaluación de antígenos recombinantes para  
el diagnóstico serológico y la generación de vacunas para el  
control de la anaplasmosis bovina**

Tesis para optar por el título de Doctora en Ciencias Veterinarias

**MÉD.VET. MACARENA SARLI**

**Director:** Dra. María Evangelina Primo

**Codirector:** Dr. Marcelo Lisandro Signorini

~ 2020 ~

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis directores, Evangelina y Marcelo

A los integrantes del Laboratorio de Inmunología y Parasitología

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

# ÍNDICE GENERAL

<b>ABREVIATURAS</b> .....	I
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	III
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	V
<b>RESUMEN</b> .....	VIII
<b>ABSTRACT</b> .....	X
<b>ANAPLASMOSIS BOVINA: INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	1
Etiología .....	1
Patogenia.....	3
Transmisión.....	5
Epidemiología.....	7
Características moleculares.....	9
Diagnóstico directo.....	11
Diagnóstico serológico.....	12
Control y prevención.....	13
Tratamiento .....	15
<b>HIPÓTESIS GENERAL</b> .....	17
<b>OBJETIVOS</b> .....	17
<b>CAPÍTULO I: DIAGNÓSTICO</b> .....	18
<b>1.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	19
<b>1.2 OBJETIVOS</b> .....	23
<b>1.3 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	24
1.3.1 Muestras.....	24
1.3.1.1 Obtención.....	24
1.3.1.2 Extracción del ADN genómico .....	24
1.3.1.3 Estatus de infección .....	25
1.3.2 Producción de los antígenos.....	25
1.3.2.1 Análisis <i>in silico</i> de MSP5 .....	25
1.3.2.2 Clonado de tMSP5m, tMSP5c y tMSP5cm.....	25
1.3.2.3 Expresión y purificación de las proteínas .....	27

1.3.2.4 Evaluación de la inmunorreactividad de las proteínas .....	27
1.3.2.5 Biotinilación de las proteínas.....	28
1.3.3 Protocolos de ELISA .....	29
1.3.3.1 ELISA de competición comercial v1 (ELISAcc v1) .....	29
1.3.3.2 ELISA de competición <i>in house</i> (ELISAhc) .....	29
1.3.3.3 ELISA de doble paratope (ELISAdp).....	30
1.3.4 Análisis de datos.....	31
<b>1.4 RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
1.4.1 Producción de los antígenos.....	32
1.4.2 Detección de anticuerpos por ELISA.....	35
1.4.2.1 Evaluación de los antígenos truncados por ELISAhc .....	35
1.4.2.2 ELISAdp .....	38
<b>1.5 DISCUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
<b>CAPÍTULO II: PREVENCIÓN .....</b>	<b>49</b>
<b>2.1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>50</b>
<b>2.2 OBJETIVOS.....</b>	<b>56</b>
<b>2.3 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>57</b>
2.3.1 Producción de los antígenos. ....	57
2.3.1.1 Análisis <i>in silico</i> de las proteínas.....	57
2.3.1.2 Clonado de las proteínas.....	57
2.3.1.3 Expresión y purificación de las proteínas .....	58
2.3.2 Inmunización y desafío .....	59
2.3.2.1 Animales .....	59
2.3.2.2 Inmunización.....	60
2.3.2.3 Desafío.....	60
2.3.3 Evaluación de la inmunidad.....	61
2.3.3.1 Evaluación de la respuesta inmune humoral .....	61
2.3.3.2 Evaluación de la respuesta inmune celular .....	62
2.3.4 Análisis estadístico .....	63
<b>2.4 RESULTADOS.....</b>	<b>64</b>
2.4.1 Producción de los antígenos.....	64

2.4.2 Evaluación de la respuesta inmune.....	65
2.4.3 Evaluación de la respuesta al desafío.....	67
<b>2.5 DISCUSIÓN .....</b>	<b>70</b>
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>73</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>75</b>
<b>PUBLICACIONES.....</b>	<b>90</b>

## ABREVIATURAS

**%:** porcentaje  
**µg:** microgramo  
**µl:** microlitro  
**AcM:** anticuerpo monoclonal  
**ADN:** ácido desoxirribonucleico  
**ADNc:** ADN complementario  
**cm:** centímetro  
**DE:** desvío estándar  
**DO:** densidad óptica  
**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético  
**ELISA:** ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas  
**EUA:** Estados Unidos de América  
**HRP:** *Horseradish peroxidase*  
**IgG:** inmunoglobulina G  
**kDa:** kilo Dalton  
**kg:** kilogramo  
**LB:** Luria-Bertani  
**M:** molaridad  
**Mb:** megabase  
**mg:** miligramo  
**min:** minutos  
**ml:** mililitro  
**mM:** milimolar  
**nm:** nanómetro  
**°C:** grados Celsius  
**OIE:** Organización Mundial de la Sanidad Animal  
**PBMC:** células mononucleares de sangre periférica  
**PBS:** *buffer* fosfato salino  
**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa  
**pH:** potencial hidrógeno

**SC:** subcutánea

**SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

**SEM:** desvío estándar de la media

**SENASA:** Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

**TA:** temperatura ambiente

**TBS:** *buffer* tris salino

**USDA:** *United States Department of Agriculture*

**v/v:** volumen/volumen

**V:** voltio

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación del orden Rickettsiales. Adaptado de Kocan y col., 2003. ....	2
<b>Tabla 2.</b> Lista de <i>primers</i> . Subrayadas se destacan las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción <i>NdeI</i> y <i>BamHI</i> en F-MSP5 y R-MSP5, respectivamente. En cursiva se muestra la secuencia que codifica para la cola de 6 histidinas en R-MSP5. Las secuencias subrayadas en R1 y F2 son complementarias y permiten la fusión de los productos de la PCR <sub>1</sub> y PCR <sub>2</sub> . ....	26
<b>Tabla 3.</b> Sensibilidad, especificidad y punto de corte del ELISAcc v1 y de las tres variantes del ELISAhc desarrollado para la detección de anticuerpos contra <i>Anaplasma</i> spp. Para cada uno se muestra la sensibilidad y la especificidad total y la sensibilidad evaluada según los animales estén infectados con <i>A. marginale</i> o vacunados con <i>A. centrale</i> . ....	36
<b>Tabla 4.</b> Número y proporción de resultados falsos negativos (FN) y falsos positivos (FP) de muestras de animales infectados con <i>A. marginale</i> o vacunados con <i>A. centrale</i> (n=428) o no infectados (n=216) obtenidos por ELISAcc v1 y ELISAhc-m. ....	37
<b>Tabla 5.</b> Sensibilidad y especificidad de las tres variantes del ELISAdp para la detección de anticuerpos contra <i>Anaplasma</i> spp. Para cada variante de ELISAdp se muestra la especificidad y la sensibilidad total de la prueba y la sensibilidad según la población evaluada esté infectada con <i>A. marginale</i> o vacunada con <i>A. centrale</i> . ....	41
<b>Tabla 6.</b> Lista de <i>primers</i> . Subrayadas se muestran las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción <i>BamHI</i> y <i>NdeI</i> y en cursiva la secuencia que codifica para la cola de histidinas. ....	57
<b>Tabla 7.</b> Parámetros clínicos individuales al momento de la aplicación del tratamiento con oxitetraciclina (20 mg/kg) en novillos (n=20) vacunados con cuatro dosis de proteínas recombinantes/Quil A (Grupo 1), proteínas recombinantes/Montanide (Grupo 2), PBS/Quil A (Grupo 3) y PBS/Montanide (Grupo 4) y desafiados con 10 <sup>7</sup> eritrocitos parasitados con <i>A. marginale</i> . En negrita se muestra la media ± SEM de cada grupo. ....	68

**Tabla 8.** Parámetros clínicos expresados como las medias ( $\pm$ SEM) por grupos de los valores máximos obtenidos luego del desafío con  $10^7$  eritrocitos parasitados con *A. marginale* en novillos (n=20) vacunados con cuatro dosis de proteínas recombinantes/Quil A (Grupo 1), proteínas recombinantes/Montanide (Grupo 2), PBS/Quil A (Grupo 3) y PBS/Montanide (Grupo 4)..... 69

**Tabla 9.** Respuesta inmune humoral al desafío con *A. marginale*. Número de novillos en los grupos inmunizados (Grupo 1 y Grupo 2) y en los grupos control (Grupo 3 y Grupo 4) con anticuerpos anti-MSP5 determinados por ELISAhc-cm a diferentes días post desafío..... 69

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Eritrocitos bovinos infectados con <i>A. marginale</i> . (A) Cuerpos de inclusión localizados en la periferia del eritrocito en una impronta de sangre teñida con Giemsa. (B) Micrografía electrónica donde se observa un cuerpo de inclusión que contiene cinco cuerpos iniciales. Fuente: Kocan y col., 2004.....	3
<b>Figura 2.</b> Ciclos de rickettsemia en animales persistentemente infectados. Adaptado de Palmer y col., 1999. ....	4
<b>Figura 3.</b> Ciclo de <i>A. marginale</i> en el ganado bovino y en la garrapata. Adaptado de Kocan y col., 2003. ....	7
<b>Figura 4.</b> Distribución geográfica de <i>A. marginale</i> en Argentina. Fuente: Späth y col., 1994. ....	8
<b>Figura 5.</b> Alineamiento de las secuencias de las proteínas MSP5 de <i>A. marginale</i> (MSP5m) y <i>A. centrale</i> (MSP5c). Subrayado se muestra el dominio de transmembrana el cual fue excluido en tMSP5m y tMSP5c.....	32
<b>Figura 6.</b> SDS-PAGE de la expresión y purificación en una columna de NTA-Ni <sup>2+</sup> de tMSP5cm, tMSP5c y tMSP5m. Calle MW, marcador de peso molecular (kDa); calles 1 y 2, fracciones insolubles y solubles del lisado celular post-inducción, respectivamente; calle 3, fracción de proteína purificada eluída con imidazol 100 mM. La coloración se realizó con <i>Coomassie Brilliant Blue R-250</i> . ....	33
<b>Figura 7.</b> <i>Western blot</i> de tMSP5cm (calle 1), tMSP5c (calle 2) y tMSP5m (calle 3) revelado con el AcM ANAF16C1. ....	34
<b>Figura 8.</b> <i>Western blot</i> de tMSP5m y tMSP5c revelado con el AcM ANAF16C1 (calle 1), Amc2 (calle 2), Am3 (calle 3) o anti- <i>Neospora caninum</i> (calle 4). Calle MW: marcadores de peso molecular (14, 21, 31, 45, 66 kDa). ....	34

<b>Figura 9.</b> Purificación y biotilación de las proteínas recombinantes. (A) SDS-PAGE y (B) <i>Western blot</i> de tMSP5m (calle 1), tMSP5c (calle 2), tMSP5m* (calle 3) y tMSP5c* (calle 4). MW: marcador de peso molecular (kDa). El SDS-PAGE se tiñó con <i>Coomasie Brilliant Blue R-250</i> y el <i>Western blot</i> se reveló con estreptavidina peroxidasa.....	35
<b>Figura 10.</b> Resultados de los porcentajes de inhibición obtenidos por ELISAhc-m (Am), ELISAhc-c (Ac), ELISAhc-cm (Acm) y ELISAcc v1 (C). A) población negativa (G3) (izquierda) y positiva (G1+G2) (derecha) a <i>Anaplasma</i> spp. por PCRn y B) población infectada con <i>A. marginale</i> (G1) (izquierda) y vacunada con <i>A. centrale</i> (G2) (derecha). Los puntos de corte para ELISAcc v1 y ELISAhc se indican con una línea sólida y punteada, respectivamente.....	37
<b>Figura 11.</b> Cinética de la reacción colorimétrica medida a 405 nm de muestras de animales con niveles altos y bajos de anticuerpos procesadas por ELISAdp. En rojo y azul se representan las muestras positivas a <i>A. marginale</i> y <i>A. centrale</i> , respectivamente con reacción colorimétrica rápida (Grupos I y III), en celeste y verde se representan las muestras positivas a <i>A. marginale</i> y <i>A. centrale</i> , respectivamente con reacción colorimétrica lenta (Grupos II y IV) y en amarillo se representan las muestras negativas (Grupo V).....	39
<b>Figura 12.</b> Resultados de los porcentajes de positividad obtenidos por ELISAdp-m, ELISAdp-c y ELISAdp-mc. Animales positivos (G1+G2) y negativos (G3) para <i>Anaplasma</i> spp (izquierda de la imagen) y animales infectados con <i>A. marginale</i> (G1) o vacunados con <i>A. centrale</i> (G2) (derecha de la imagen). La línea punteada indica el punto de corte y la línea sólida indica la media.....	40
<b>Figura 13.</b> Componentes del sistema de secreción tipo IV (T4SS). Adaptado de Cascales y Christie, 2003.....	53
<b>Figura 14.</b> Evaluación de las proteínas del T4SS de <i>A. marginale</i> purificadas. (A) SDS-PAGE teñido con <i>Coomasie Brilliant Blue R-250</i> (B) <i>Western blot</i> revelado con el AcM anti-His-tag. MW: marcador de peso molecular (kDa). Calle 1: VirB10, calle 2: VirB9.1t, calle 3: VirB11, calle 4: VirB9.2t, calle 5: Ef-Tu. ....	65

**Figura 15.** Niveles de anticuerpos (IgGT, IgG1 e IgG2) para cada proteína recombinante medidos por ELISAI. Grupo 1, proteínas recombinantes/Quil A (—); Grupo 2, proteínas recombinantes/Montanide (---); Grupo 3, PBS/Quil A (-●-) y Grupo 4, PBS/Montanide (-■-). Cada punto representa la media  $\pm$  SEM del grupo a los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 55, 63 y 70 luego de la aplicación de la primera dosis de vacuna y a los 35 días post desafío (día 140). La línea de puntos horizontal indica el punto de corte calculado como la media de  $DO_{405nm}$  en el día 0 + 3 DE. Las flechas indican los días de aplicación de las dosis de vacuna y la línea de puntos vertical indica el día del desafío con *A. marginale* (día 105 luego del comienzo del experimento)..... 66

**Figura 16.** Reactividad por *Western blot* de los sueros de los novillos inoculados con proteínas recombinantes/Quil A (Grupo 1) y proteínas recombinantes/Montanide (Grupo 2), obtenidos a los 28 días luego de la aplicación de la primera dosis de la vacuna. Se muestra un animal representativo perteneciente al Grupo 1. MW: marcador de peso molecular (kDa), calle 1: VirB10; calle 2: VirB9.1t; calle 3: VirB11; calle 4: VirB9.2t; calle 5: Ef-Tu; calle 6: MSP5 (control negativo). ..... 67

## RESUMEN

La anaplasmosis bovina, causada por *Anaplasma marginale* (rickettsia intraeritrocítica transmitida por artrópodos hematófagos), es una enfermedad infecciosa de gran interés por las severas pérdidas económicas que ocasiona. La enfermedad es leve en animales jóvenes (<12 meses) y aguda en animales adultos. Los bovinos que superan la etapa aguda, se transforman en portadores persistentes de *A. marginale*. En áreas endémicas los rodeos se encuentran en estabilidad enzoótica cuando más del 75% de los bovinos se infecta con *A. marginale* antes de los 9 meses de edad promedio, lo cual previene la ocurrencia de brotes de anaplasmosis. La vacuna viva basada en *A. centrale*, especie naturalmente menos patógena que *A. marginale*, produce inmunidad cruzada parcial y se aplica a cohortes de terneros de hasta 10 meses de edad que no alcanzaron naturalmente la estabilidad enzoótica. La evaluación serológica, realizada a través de la detección de anticuerpos contra la proteína principal de superficie 5 (MSP5) de *A. marginale* por ELISA de competición (ELISAc), se utiliza para i) identificar portadores de *Anaplasma* spp., ii) determinar la necesidad de vacunación de los terneros en regiones endémicas y, iii) evaluar la respuesta inmune a la vacunación con *A. centrale*. El ELISAc basado en MSP5 de *A. marginale* unida a la chaperona MBP (MBP-MSP5m) y en el anticuerpo monoclonal ANAF16C1, es la técnica recomendada por la OIE para la determinación de anticuerpos contra *A. marginale*. Esta técnica no se encuentra validada para la detección de anticuerpos contra *A. centrale*. En este trabajo, se desarrollaron un ELISAc *in house* (ELISAhc) y un ELISA de doble paratope (ELISAdp) basados en las proteínas truncadas (sin la hélice de transmembrana del extremo N-terminal) MSP5 de *A. marginale* (tMSP5m) y MSP5 de *A. centrale* (tMSP5c). La eliminación de la chaperona MBP aumentó la especificidad y la incorporación de tMSP5c incrementó la sensibilidad del ensayo. Adicionalmente, se evitó el uso de anticuerpos monoclonales con el diseño de ELISAdp. Para la prevención de la anaplasmosis se evaluó un inmunógeno recombinante, para uso en animales adultos, compuesto por cinco proteínas subdominantes de *A. marginale* pertenecientes al sistema de secreción tipo IV (T4SS): VirB9.1, VirB9.2, VirB10, VirB11 y Ef-Tu. Las proteínas fueron clonadas y expresadas en *E. coli*. Veinte novillos se agruparon en cuatro grupos (G) de cinco animales cada uno (n=5). G1 y G2 se inocularon con una mezcla de 50 µg de cada proteína recombinante con los adyuvantes Quil A<sup>®</sup> o Montanide<sup>™</sup>, respectivamente. G3 y

G4 (controles) se inocularon con Quil A o Montanide, respectivamente. Se aplicaron cuatro dosis a intervalos de tres semanas y el día 105, se desafió con una dosis de  $10^7$  eritrocitos parasitados con *A. marginale*. Post desafío, se observaron signos clínicos en todos los animales, con un significativo descenso del hematocrito e incremento del porcentaje de eritrocitos parasitados ( $p < 0,05$ ), los cuales requirieron tratamiento con oxitetraciclina para evitar la muerte. En resumen, en este trabajo se abordó el problema de la anaplasmosis de forma integral, desde el diagnóstico y la prevención; a través del desarrollo de un ELISA de bajo costo y de alta *performance* para la detección de anticuerpos contra *Anaplasma* spp., y de la evaluación de una vacuna recombinante para uso en animales adultos, que aunque en las condiciones ensayadas no resultó eficaz, sienta las bases para futuros experimentos.

## ABSTRACT

Bovine anaplasmosis is an infectious disease caused by *Anaplasma marginale*, an intraerythrocytic rickettsia transmitted by hematophagous arthropods. The disease is of great interest due to the severe economic losses that it causes. The disease is mild in young animals (<12-months old) and acute in adult animals. Bovines that overcome the acute stage become persistent carriers of *A. marginale*. Rodeos of endemic areas are in enzootic stability when more than 75% of cattle become infected with *A. marginale* before 9-months old, which prevents the occurrence of anaplasmosis outbreaks. Live vaccine based on *A. centrale*, a naturally less pathogenic species than *A. marginale*, produces partial cross immunity. It is applied in cohorts of calves up to 10-months old that did not naturally reach enzootic stability. Serological evaluation, performed through detection of antibodies against the major surface protein 5 (MSP5) of *A. marginale* by a competition ELISA (cELISA), allows us: i) identify carriers of *Anaplasma* spp., ii) determine the need of vaccination of calves in endemic regions, and iii) evaluate the immune response to the *A. centrale* vaccine. cELISA based on *A. marginale* MSP5 bound to the chaperone MBP (MBP-mMSP5) and on the monoclonal antibody ANAF16C1 is recommended by the OIE for the determination of antibodies against *A. marginale*. This test is not validated for the detection of antibodies against *A. centrale*. In this work, a cELISA in house (hcELISA) and a double paratope ELISA (dpELISA) were optimized both based on the truncated forms (without N-terminus transmembrane helix) of *A. marginale* MSP5 (tMSP5m) and *A. centrale* MSP5 (tMSP5c). Expression of MSP5 without MBP increased the specificity and the incorporation of tMSP5c increased the sensitivity of the assay. Additionally, the use of monoclonal antibodies was avoided in the dpELISA. For the prevention of anaplasmosis, a recombinant immunogen was developed for its evaluation in adult cattle. This immunogen was formulated with the subdominant proteins of type IV secretion system (T4SS) of *A. marginale*, VirB9.1, VirB9.2, VirB10, VirB11 and Ef-Tu, cloned and expressed in *E. coli*. Twenty steers (n=20) were randomly clustered into four groups (G) of five animals each. Cattle from G1 and G2 were inoculated with a mixture of 50 µg of each recombinant protein with Quil A<sup>®</sup> and Montanide<sup>™</sup> adjuvants, respectively. Cattle from G3 and G4 (controls) were inoculated with Quil A and Montanide adjuvants, respectively. Cattle received four doses at three-week intervals and were challenged with 10<sup>7</sup> *A. marginale*-

parasitized erythrocytes at day 105. After challenge, all cattle showed clinical signs, with a significant decreased of packed cell volume and a significant increased of parasitized erythrocytes ( $p < 0.05$ ), requiring treatment with oxytetracycline to prevent death. In summary, in this work, bovine anaplasmosis was studied integrally with diagnosis and prevention approaches. A low-cost and high-performance ELISA was developed for the detection of antibodies against *Anaplasma* spp. and a recombinant vaccine was evaluated for use in adult cattle. The vaccine, which under the tested conditions was not effective, establishes guidelines for future assays.

## ANAPLASMOSIS BOVINA: INTRODUCCIÓN GENERAL

### Etiología

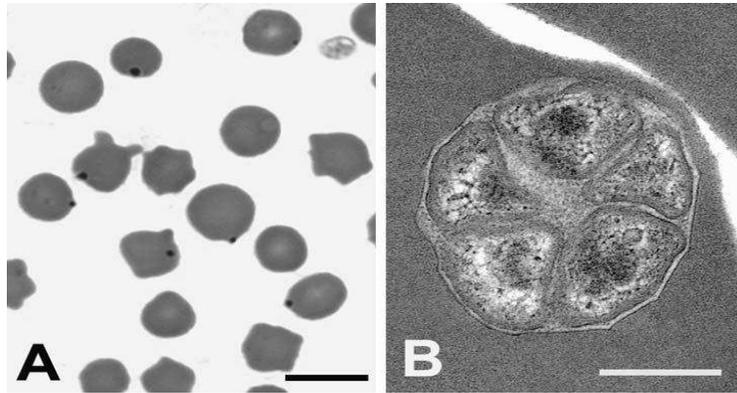
La anaplasmosis bovina es una enfermedad infecciosa causada por la rickettsia *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) (Dumler y col., 2001). La enfermedad clínica es más frecuente en el bovino, pero otros rumiantes como el búfalo, el bisonte, los antílopes africanos y el ciervo pueden infectarse persistentemente (Kocan y col., 2003). Smith y Kilborne (1893) estudiando la fiebre de Texas (babesiosis), descubrieron en los animales infectados cuerpos cocoides situados en el margen de los eritrocitos e interpretaron que estas formas eran diferentes etapas del ciclo de vida de *Babesia bigemina*. En Sudáfrica, Theiler (1910), describió un pequeño agente presente en los eritrocitos de bovinos afectados de anemia aguda y lo diferenció del organismo causante de la fiebre de Texas. El agente, como regla general, se ubicaba en el margen del eritrocito por lo que propuso el nombre de *A. marginale*. Un año después, describió una subespecie de *A. marginale* que parecía ser menos patógena, *A. centrale*, y para la cual las inclusiones del parásito se encontraban en el centro de los eritrocitos (Theiler, 1911).

*A. marginale* pertenece al orden Rickettsiales y se incluye en la familia Anaplasmataceae la cual está conformada por cuatro géneros; *Anaplasma*, *Wolbachia*, *Ehrlichia* y *Neorickettsia* (Dumler y col., 2001). La clasificación actual del orden Rickettsiales con sus respectivas familias y géneros se detalla en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Clasificación del orden Rickettsiales. Adaptado de Kocan y col., 2003.

<p><b>1. Orden Rickettsiales</b></p> <p><b>1.1 Familia Rickettsiaceae:</b> bacterias intracelulares obligadas que crecen libremente en el citoplasma de las células hospedadoras eucariotas.</p> <p><b>1.1.1 Género <i>Rickettsia</i></b></p> <p><b>1.1.2 Género <i>Orientia</i></b></p> <p><b>1.2 Familia Anaplasmataceae:</b> bacterias intracelulares obligadas que se replican, en vacuolas derivadas de la membrana, en el citoplasma de las células hospedadoras eucariotas.</p> <p><b>1.2.1 Género <i>Anaplasma</i></b>  <i>Anaplasma marginale</i>  <i>Anaplasma centrale</i>  <i>Anaplasma ovis</i>  <i>Anaplasma bovis</i> (antes <i>Ehrlichia bovis</i>)  <i>Anaplasma phagocytophilum</i> (antes <i>Ehrlichia phagocytophilum</i>,  <i>E. equi</i>, agente de la Ehrlichiosis Granulocítica Humana)  <i>Anaplasma platys</i> (antes <i>Ehrlichia platys</i>)  <i>Aegyptianella</i></p> <p><b>1.2.2 Género <i>Ehrlichia</i></b>  <i>Ehrlichia chaffeensis</i>  <i>Ehrlichia ruminantium</i> (antes <i>Cowdria ruminantium</i>)  <i>Ehrlichia ewingii</i>  <i>Ehrlichia ovis</i>  <i>Ehrlichia canis</i>  <i>Ehrlichia muris</i></p> <p><b>1.2.3 Género <i>Neorickettsia</i></b>  <i>Neorickettsia helminthoeca</i>  <i>Neorickettsia risticii</i> (antes <i>Ehrlichia risticii</i>)  <i>Neorickettsia sennetsu</i> (antes <i>Ehrlichia sennetsu</i>)</p> <p><b>1.2.4 Género <i>Wolbachia</i></b>  <i>Wolbachia pipientis</i></p>
---

*A. marginale* es una rickettsia intraeritrocitaria Gram negativa que al microscopio muestra el aspecto de una inclusión redondeada, basófila, pequeña (0,3-1  $\mu\text{m}$ ), única o doble, generalmente localizada a largo del margen del eritrocito (Figura 1A). La microscopía electrónica revela dos formas morfológicamente distintas del microorganismo: los clásicos corpúsculos marginales, denominados cuerpos de inclusión, y los cuerpos iniciales. Cada cuerpo de inclusión contiene en su interior de cuatro a ocho cuerpos iniciales que son las formas infectantes (del Cura, 2003) (Figura 1B). *A. marginale* se caracteriza, como todas las rickettsias, por no tener la cromatina organizada en un núcleo con membrana limitante, y por carecer de retículo endoplásmico (Rodríguez y col., 2004).



**Figura 1.** Eritrocitos bovinos infectados con *A. marginale*. (A) Cuerpos de inclusión localizados en la periferia del eritrocito en una impronta de sangre teñida con Giemsa. (B) Micrografía electrónica donde se observa un cuerpo de inclusión que contiene cinco cuerpos iniciales. Fuente: Kocan y col., 2004.

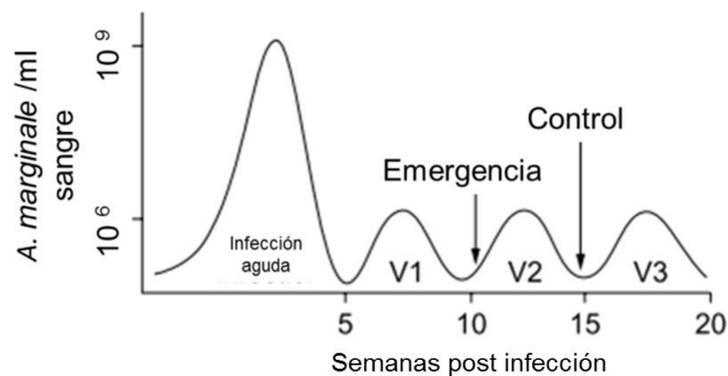
*A. centrale*, es un organismo naturalmente menos patógeno que está antigenicamente relacionado con *A. marginale*. Por esta razón, *A. centrale* confiere inmunidad cruzada parcial contra *A. marginale*, y es usado como una vacuna viva para la prevención de la anaplasmosis en Israel, África, Australia y varios países de América Latina (de la Fuente y col., 2005). *A. centrale* nunca ha sido reportado en América del Norte.

### Patogenia

Los eritrocitos son las únicas células que *A. marginale* puede infectar en el bovino. El 70% o más de los eritrocitos pueden infectarse durante una infección aguda. El período de incubación de la infección (período prepatente), varía con el número de organismos en la dosis infecciosa y va de 7 a 60 días con un promedio de 28 días (Kocan y col., 2003). Durante la infección inicial el número de eritrocitos parasitados aumenta geométricamente, duplicándose cada 24 horas. Los eritrocitos parasitados se eliminan del torrente circulatorio mediante fagocitosis por las células del sistema reticuloendotelial, lo que resulta en el desarrollo de anemia e ictericia leve a severa sin hemoglobinemia ni hemoglobinuria. Los signos clínicos pueden incluir: hipertermia, anemia, depresión, pérdida de peso, disminución en la producción láctea, aborto, ictericia y, a menudo, muerte en animales mayores de 2 años de edad (Kocan y col., 2003; 2010).

*A. marginale* puede infectar a bovinos de cualquier edad, pero el curso clínico de la enfermedad dependerá de la edad del animal al momento de la primoinfección. La

enfermedad clínica, es poco frecuente cuando los animales se infectan entre los 6 meses y 1 año de edad, es aguda pero raramente fatal en animales de entre 1 y 2 años de edad y es aguda y frecuentemente mortal, en mayores de 2 años de edad (Aubry y Geale, 2011). La resistencia juvenil a la anaplasmosis podría deberse a la presencia de anticuerpos calostrales (Potgieter y col., 2004), a la rapidez de la respuesta inmune que es mayor en animales jóvenes por la competencia de la función del timo, a la vigorosa actividad eritropoyética de la médula ósea y/o a un papel protector de la hemoglobina fetal (Ristic, 1981). Las razas *Bos taurus* (*Holstein*, *Brown Swiss* o *Hereford*) tienen más probabilidades de desarrollar anaplasmosis aguda que las crías de cebú o criollas (Aguirre y col., 1988). Los bovinos que se recuperan de la infección aguda permanecen infectados persistentemente durante el resto de su vida, presentando ciclos de rickettsemia cada 10 a 14 días donde la concentración de eritrocitos parasitados varía de  $10^3$  a  $10^5$  células/ml de sangre, concentración menor a la observada durante la infección aguda ( $10^9$  células/ml de sangre) (French y col., 1998; 1999) (Figura 2). Debido a que la vida media de los eritrocitos bovinos es de 160 días, para mantener una infección persistente nuevos glóbulos rojos deben infectarse en cada ciclo. Para ello, *A. marginale* utiliza la síntesis de variantes antigénicas como sistema de evasión de la respuesta inmune. Dichas variantes no son reconocidas por los anticuerpos presentes al momento de su emergencia, y se controlan luego con una respuesta inmune específica (Aubry y Geale, 2011) (Figura 2). El animal infectado persistentemente o "portador" tiene inmunidad de por vida y es resistente a la enfermedad clínica. Sin embargo, sirve como reservorio de *A. marginale* proporcionando una fuente de sangre infecciosa para la transmisión tanto mecánica como biológica del parásito.



**Figura 2.** Ciclos de rickettsemia en animales persistentemente infectados. Adaptado de Palmer y col., 1999.

## Transmisión

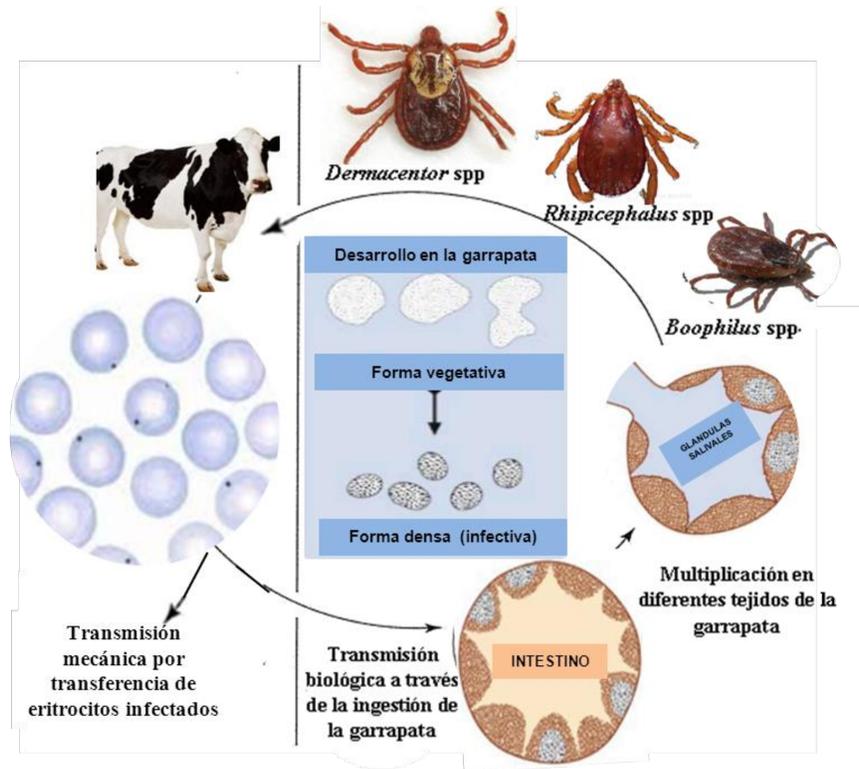
La transmisión de *A. marginale* desde animales portadores a animales susceptibles puede producirse por tres vías: (i) mecánica; eritrocitos infectados son transferidos mediante artrópodos hematófagos o fómites contaminados con sangre, sin amplificación de *A. marginale* (ii) biológica; eritrocitos infectados son ingeridos por garrapatas y *A. marginale* se replica dentro del intestino y las glándulas salivales del ácaro, y posteriormente, se transmite a través de la saliva a rumiantes no infectados, y (iii) transplacentaria; eritrocitos infectados se mueven a través de la placenta desde vacas infectadas a su descendencia (Kocan y col., 2003; 2010).

La transmisión mecánica se produce a través de agujas, sierras de descolar, pinzas nasales, instrumentos para tatuar, dispositivos para marcar orejas e instrumentos de castración contaminados con sangre infectada. Se ha demostrado experimentalmente que al menos doce especies de dípteros hematófagos tienen el potencial de transmitir mecánicamente *A. marginale*. Entre ellos se incluye; la mosca de los establos (*Stomoxys calcitrans*), ocho especies de tábanos (*Tabanidae*) y tres especies de mosquitos (*Culicidae*) (Kocan y col., 2003; 2010).

La transmisión biológica se realiza a través de garrapatas. Aproximadamente veinte especies de garrapatas se han identificado como vectores de *A. marginale* en todo el mundo (Aubry y Geale, 2011). La transmisión ocurre de forma transestadial, es decir de una etapa a otra (de larvas a ninfas o de ninfas a adultos), o intraestadial, es decir dentro de una etapa. La transmisión transovárica, de una generación de garrapatas a la siguiente, no se ha demostrado (Kocan y col., 2003; 2010). La transmisión transestadial de *A. marginale* ha sido demostrada para las garrapatas de tres hospedadores *Dermacentor andersoni* y *D. variabilis* en EUA, *Rhipicephalus sanguineus* en Israel y *R. simus* en Sudáfrica (Kocan y col., 2010). La transmisión transestadial también ha sido demostrada para la garrapata de un huésped *R. annulatus* en Israel, América Central, América del Sur y México (Guglielmone, 1995). La transmisión intraestadial de *A. marginale* es realizada por las garrapatas macho. Los machos *Dermacentor* juegan un papel importante en la transmisión biológica porque se infectan persistentemente con *A. marginale* y pueden transmitirlo repetidamente cuando se transfieren entre el ganado (Kocan y col., 1992a). Por lo tanto, las garrapatas macho de un huésped al servir como hospedadores reservorios de *A. marginale*, al igual que el ganado

infectado persistentemente (Kocan y col., 1992 a,b; Palmer y col., 2001), pueden ser una importante fuente de transmisión de la rickettsia (Kocan y col., 2003).

El desarrollo de *A. marginale* en la garrapata (Figura 3), comienza cuando ésta se alimenta con sangre de animales portadores. La rickettsia coloniza las células del intestino de la garrapata donde se replica y pasa a otros tejidos, incluyendo las glándulas salivales desde donde se transmite a los vertebrados durante la alimentación del ácaro. En cada sitio de infección en la garrapata, *A. marginale* se desarrolla dentro de vacuolas o colonias. La primera forma de *A. marginale* dentro de la colonia, es la forma reticulada (vegetativa) que se divide por fisión binaria generando colonias que pueden contener centenares de organismos. La forma reticulada cambia a una forma densa, que es la forma infectiva y que puede sobrevivir fuera de las células del huésped (Kocan y col., 1996; 2003). El bovino se infecta con *A. marginale* cuando la forma densa se transmite, a través de las glándulas salivales, durante la alimentación de la garrapata (Figura 3). En el hospedador vertebrado el desarrollo completo del agente infeccioso se produce dentro del eritrocito. El ciclo comienza cuando la forma infectante (cuerpos iniciales) penetra en el glóbulo rojo mediante endocitosis (Bauntgartner, 2005). Dentro de la vacuola endocítica, el agente se multiplica por fisión binaria formando los cuerpos de inclusión compuestos por cuatro a ocho cuerpos iniciales (Potgieter y col., 2004). Algunos autores, postulan que la salida de los cuerpos iniciales del eritrocito se produce por exocitosis, sin generar la lisis del glóbulo rojo (Giardina y col., 1983), y otros autores señalan a la lisis celular como forma de liberación del agente (Bundza y Samagh, 1982). Una vez que los cuerpos iniciales son liberados, invaden otros eritrocitos incrementándose al doble el número de eritrocitos infectados cada 24 horas (Potgieter y col., 2004).



**Figura 3.** Ciclo de *A. marginale* en el ganado bovino y en la garrapata. Adaptado de Kocan y col., 2003.

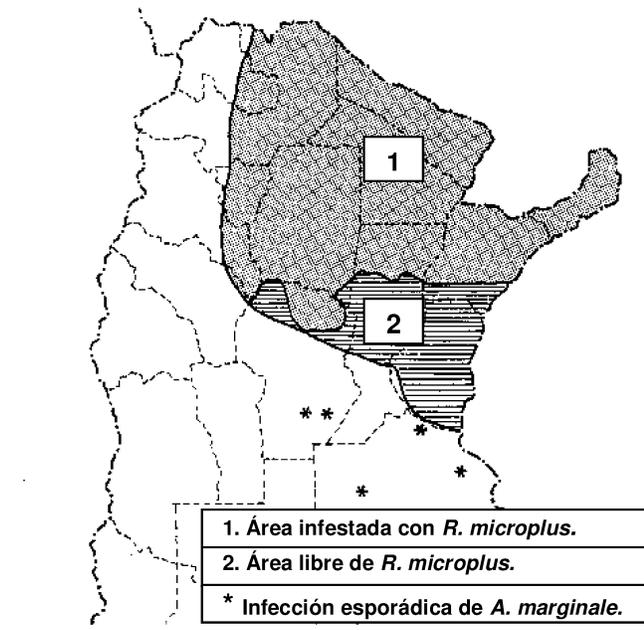
La transmisión biológica es considerada la forma más eficiente de propagación de *A. marginale* debido a la capacidad de replicación y persistencia de la rickettsia dentro de las garrapatas (Kocan y col., 1992 a, b). La transmisión mecánica por artrópodos, sin embargo, puede ocurrir en zonas donde el vector biológico no está presente, y se considera que es la principal vía de diseminación de *A. marginale* en áreas de América Central, América del Sur y África; donde hay datos contradictorios sobre la importancia de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, la garrapata del ganado tropical, en la transmisión biológica de *A. marginale* (Aubry y Geale, 2011).

## Epidemiología

La anaplasmosis se presenta en áreas tropicales y subtropicales de todo el mundo abarcando los cinco continentes. Se extiende aproximadamente entre los paralelos 40° N a 32° S (Kahn, 2007) aunque hay brotes esporádicos en zonas de clima templado al norte y al sur de estas latitudes, respectivamente (Jonsson y col., 2000). En EUA, la anaplasmosis es enzoótica en todos los estados del Atlántico sur, de la Costa del Golfo y en varios de los

estados del medio oeste y oeste (McCallon, 1973). Además, en casi todo el territorio estadounidense se han reportado casos de anaplasmosis por transmisión mecánica debido a la incorporación, a rodeos de zonas libres, de animales asintomáticos portadores de *A. marginale*. La anaplasmosis bovina también es endémica en México, América Central, América del Sur y las islas del Caribe (Guglielmone, 1995). La prevalencia de *A. marginale* varía ampliamente entre los países de América, y esta variabilidad geográfica genera el establecimiento de regiones enzoóticas estables o inestables. Además, la distribución de la anaplasmosis esta cambiando debido al calentamiento global que influencia el movimiento de los vectores (Jonsson y col., 2000).

En Argentina, *A. marginale* prevalece al norte del paralelo 33°S presentando un área de distribución mayor que el de la garrapata *R. microplus* (Späth y col., 1994). Sin embargo, se han detectado brotes de anaplasmosis en el sur de la zona endémica debido al movimiento de ganado portador hacia áreas no endémicas (Figura 4) (Anziani, 1979; de Echaide y col., 2004).



**Figura 4.** Distribución geográfica de *A. marginale* en Argentina. Fuente: Späth y col., 1994.

La anaplasmosis bovina provoca importantes pérdidas económicas en la mayoría de los países, principalmente debido a la alta morbilidad y mortalidad en los rodeos susceptibles. Estas pérdidas se miden a través de varios parámetros, entre ellos: bajo

aumento de peso, reducción en la producción de leche, abortos, costo de los tratamientos y mortalidad (Kocan y col., 2003).

### **Características moleculares**

El genoma de *A. marginale* es pequeño y circular, de aproximadamente 1,2-1,6 Mb (Meeus y Barbet, 2001). Aunque el tamaño del genoma es reducido, *A. marginale* posee una amplia expresión de antígenos de superficie y una gran variabilidad de los mismos que se manifiesta entre los diferentes ciclos de rickettsemia y/o entre los diferentes aislamientos (Palmer y col., 2000).

Las proteínas principales de membrana (MSP), son un grupo de cinco proteínas (MSP1a-b, MSP2, MSP3, MSP4 y MSP5) que se encuentran ubicadas en la membrana bacteriana, y que interactúan con las células del hospedador desempeñando un papel importante en el establecimiento de la infección (Tebele y col., 1991; Kocan y col., 2003). Estas proteínas generan una respuesta inmune eficiente, por lo que son útiles para el diagnóstico y/o prevención de la anaplasmosis bovina (Barbet y col., 1999). MSP1a, MSP4 y MSP5 están codificadas por genes de copia única, mientras que MSP1b, MSP2 y MSP3 están codificadas por familias multigénicas.

MSP1 es un heterodímero formado por las subunidades MSP1a y MSP1b. El peso molecular de MSP1a es variable entre diferentes aislamientos geográficos de *A. marginale*, debido a la presencia de un número de repeticiones variable de una secuencia de 28 o 29 aminoácidos variables, ubicada en la porción N-terminal de la proteína (Allred y col., 1990; de la Fuente y col., 2002). Debido a esta característica, MSP1a se ha utilizado para la identificación de aislamientos de diferentes orígenes geográficos (Allred y col., 1990; Barbet y col., 1999). Esta proteína se mantiene constante en los diferentes ciclos de rickettsemia de *A. marginale* dentro del hospedador y también durante la transmisión por garrapatas (Bowie y col., 2002). La región de MSP1a con las repeticiones, es necesaria y suficiente para efectuar la adhesión de la rickettsia a los eritrocitos bovinos y a las células de garrapatas (de la Fuente y col., 2003).

MSP1b es codificada por al menos dos genes, *mSP1β1* y *mSP1β2* (Aguirre y col., 1988; Bowie y col., 2002). Esta proteína que forma un complejo con MSP1a, es una

adhesina para los eritrocitos bovinos (McGarey y col., 1994). Sin embargo, MSP1b no demostró ser una adhesina para las células de garrapatas (de la Fuente y col., 2001).

MSP2 es un tetrámero, que pesa aproximadamente 36 kDa, cuyas subunidades se encuentran unidas por puentes disulfuro. (Palmer y col., 1988). Es una proteína polimórfica, codificada por la familia multigénica *mSP2* (Palmer y col., 1994). En animales con infección persistente, en cada ciclo de rickettsemia se expresa una nueva variante de MSP2 (de la Fuente y col., 2001). La expresión de variantes antigénicas diferentes, explica la persistencia de por vida de *A. marginale* en los bovinos (French y col., 1999). La variación antigénica de MSP2 que ocurre durante la infección persistente con *A. centrale*, es similar a la de *A. marginale*. Además, ambas especies presentan un repertorio similar de epitopes CD4+ al sistema inmune, lo que puede ser responsable de la protección cruzada de *A. centrale* contra *A. marginale*. (Brayton y col., 2002). MSP3 está codificada por una familia multigénica y pesa aproximadamente 86 kDa (Palmer y col., 1995). Al igual que la proteína MSP2, presenta variaciones antigénicas durante los ciclos de rickettsemia (French y col., 1999). En aislamientos de diferentes zonas geográficas, se observa una gran variabilidad en la estructura y propiedades antigénicas (Allegan y col., 1996).

MSP4 es codificada por un sólo gen y pesa aproximadamente 31 kDa. Se encuentra altamente conservada entre los distintos aislamientos y su función se desconoce (Kocan y col., 2003).

MSP5 tiene un peso molecular de 23 kDa, está altamente conservada entre los distintos aislamientos y está presente en todas las especies de *Anaplasma* conocidas. Se la considera muy importante en el ciclo de vida celular, aunque se desconoce exactamente su función (Vidotto y col., 1994). Se localiza en la membrana formando un homodímero cuyas subunidades se unen por puentes disulfuro. La proteína nativa y la recombinante, presentan un epítipo que es reconocido por el AcM ANAF16C1 (Visser y col., 1992), presente en los estadios del parásito en la garrapata y en el eritrocito. Se ha probado la utilidad de la proteína MSP5 en el diagnóstico serológico de la anaplasmosis, utilizando la técnica de ELISA de competición con el AcM ANAF16C1 (Torioni de Echaide y col., 1998; Chung y col., 2014; Primo y col., 2019), y del gen *mSP5* en el diagnóstico molecular utilizando la técnica de PCR (Gale y col., 1996; Torioni de Echaide y col., 1998).

### **Diagnóstico directo**

Los signos clínicos característicos de la anaplasmosis son anemia e ictericia sin presencia de hemoglobinemia ni hemoglobinuria, lo que ayuda en el diagnóstico diferencial con la babesiosis. No obstante, la enfermedad sólo se puede confirmar mediante la identificación del microorganismo causante (OIE, 2015).

En los animales muertos, los hallazgos más evidentes son emaciación, ictericia, palidez de tejidos, sangre acuosa, hígado aumentado de tamaño con una coloración anaranjada, vesícula biliar pletórica con bilis espesa, esplenomegalia y hemorragias miocárdicas (Vanzini y Ramírez, 1994).

Con base en los signos clínicos y a los hallazgos de la necropsia, se puede arribar a un diagnóstico presuntivo de la enfermedad que debe confirmarse mediante la determinación de la presencia del agente infeccioso (Bauntgartner, 2005). La presencia de *A. marginale* puede confirmarse por observación directa del parásito o por detección de su ADN.

Durante la fase aguda de la enfermedad se puede realizar la búsqueda de *A. marginale* en extendidos de sangre teñidos con Giemsa. Sin embargo, este método no es confiable para la detección de *A. marginale* en animales portadores o con infecciones incipientes o agudas tempranas donde la parasitemia es muy baja (Aubry y Geale, 2011). En estos casos, se prefiere la identificación del agente infeccioso por amplificación del ADN bacteriano. El gen *msp5* ha sido el más utilizado con fines diagnósticos. La PCR convencional desarrollada por Gale y col., (1996), que amplifica un fragmento del gen *msp5* de *Anaplasma* spp., reportó una sensibilidad de detección del 0,00015% (24 eritrocitos infectados por microlitro de sangre). La sensibilidad aumentó al 0,0000001% (30 eritrocitos infectados por mililitro de sangre), usando la misma dilución de eritrocitos infectados en ambos casos, cuando se utilizó una PCR anidada (PCRn) (Torioni de Echaide y col., 1998). Carelli y col., (2007) desarrollaron una PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de *A. marginale*, basada en la amplificación del gen *msp1b*, cuyo límite de detección presenta una concordancia del 100% con la PCRn. Posteriormente, desarrollaron una PCR en tiempo real para la detección y cuantificación simultánea de *A. marginale* y *A. centrale* (Decaro y col., 2008). Para diferenciar animales infectados con *A. marginale* de animales vacunados con *A. centrale*, se desarrollaron PCRn específicas de especie; entre

ellas la PCRn del gen *msp1b* para *A. marginale* y del gen *msp2* para *A. centrale*, con una sensibilidad de 50 eritrocitos infectados por mililitro de sangre (Molad y col., 2006).

El método de oro para demostrar que un animal es libre de *A. marginale*, consiste en la subinoculación de sangre del animal sospechoso en un ternero esplenectomizado, lo que lo convierte en altamente susceptible a la infección (Coetzee y Apley, 2006). En caso de haber recibido sangre infectada, en los extendidos de sangre del ternero esplenectomizado se observará la presencia de *A. marginale* dentro de las 4 a 8 semanas posteriores a la inoculación (OIE, 2015).

### **Diagnóstico serológico**

El estatus epidemiológico de anaplasmosis en los rodeos depende de la interacción hospedador-medioambiente-vector-manejo. Para evitar brotes de la enfermedad se debe alcanzar una estabilidad enzoótica en el rodeo, situación caracterizada por la presencia de una población adulta inmune, lo que puede lograrse a través de la infección natural o a través de la vacunación de los bovinos jóvenes susceptibles (Vanzini y col., 1999). Cuando menos del 75% de los terneros de 10 meses de edad promedio no logra infectarse, la cohorte estará en inestabilidad enzoótica con riesgo de ocurrencia de brotes de anaplasmosis durante la etapa adulta. La determinación del estatus epidemiológico de un rodeo frente a anaplasmosis, se realiza a través de la determinación de la presencia de anticuerpos mediante diferentes pruebas serológicas. Esto permite establecer la necesidad de vacunación en los terneros susceptibles, y la aplicación de estrategias terapéuticas preventivas en bovinos que transiten desde zonas no endémicas a zonas endémicas.

Se han evaluado varias técnicas para detectar la presencia de anticuerpos contra *Anaplasma* spp., entre las que se puede mencionar: fijación del complemento (FC), aglutinación en placa (Card Test, CT), inmunofluorescencia indirecta (IFI), enzimoimmunoensayo competitivo (ELISAc), enzimoimmunoensayo indirecto (ELISAi) y enzimoimmunoensayo puntual (DOT-ELISA), entre otras. Por lo general, excepto con los animales que han sido tratados o se encuentran en una fase incipiente de la infección (<14 días), las pruebas serológicas preferidas para identificar animales infectados son el ELISAc o el CT (OIE, 2015).

Comercialmente en la actualidad se dispone de dos *kits* de ELISA para la detección de anticuerpos contra *Anaplasma* spp.: ELISAc (VMRD, Inc., Pullman, WA) (Knowles y col., 1996; Torioni de Echaide y col., 1998; Chung y col., 2014) y ELISAi (Svanovir®) (Morzaria y col., 1999). Ambos diseños utilizan como antígeno a la proteína MSP5 de *A. marginale*.

La prueba CT fue desarrollada por Amerault y Roby (1968). La ventaja del CT es que es una técnica sensible y que proporciona resultados en pocos minutos. Sin embargo, algunas reacciones inespecíficas y la subjetividad en la interpretación de los resultados pueden ser una limitante. Además, el antígeno para CT es difícil de preparar, ya no se comercializa, y puede variar entre lotes y entre laboratorios (OIE, 2015).

Comparando ambas pruebas, el ELISAc mostró ser más específico que el CT, y este último arrojó más resultados sospechosos que el ELISAc trabajando con sueros bovinos de una zona libre y de una zona endémica (Molloy y col., 1999). El ELISAc es considerado por la OIE como una técnica excelente para estudios epidemiológicos, programas de erradicación y regulación internacional del movimiento de ganado (Torioni de Echaide y col., 1998; Molloy y col., 1999).

### **Control y prevención**

Las medidas de control para la anaplasmosis varían según la ubicación geográfica e incluyen; i) el control de artrópodos mediante la aplicación de acaricidas, ii) la administración de antibióticos, y iii) la vacunación (Kocan y col., 2003).

El control de artrópodos puede prevenir sólo parcialmente la transmisión de *A. marginale* ya que no es la única vía de transmisión. Es un método costoso y poco práctico. Además, el uso de acaricidas genera contaminación ambiental, y la aplicación repetida de los mismos genera el desarrollo de poblaciones de vectores resistentes (Aubry y Geale; 2011).

La terapia antimicrobiana para el control de la anaplasmosis bovina se utiliza principalmente en EUA. Implica el uso de tetraciclinas durante la temporada de vectores para limitar los efectos clínicos de la infección. No elimina las infecciones persistentes y no hay evidencia de que evite la infección de los animales con *A. marginale*. Las desventajas

de la administración de tetraciclinas son el alto costo, los períodos de carencia en carne y leche, y el riesgo de generación de cepas de *Anaplasma* resistentes (Aubry y Geale; 2011).

La vacunación es una forma económica y efectiva de controlar la anaplasmosis bovina a nivel mundial. Las vacunas para el control de la anaplasmosis se pueden dividir en dos tipos principales: vacunas con microorganismos (MO) vivos y vacunas inactivadas. El uso de vacunas con MO vivos fue iniciado por Sir Arnold Theiler a principios del siglo XX (Theiler, 1911) y sigue siendo de elección en muchas partes del mundo. La vacunación con MO vivos implica la infección del rodeo por inoculación de eritrocitos infectados con aislamientos menos patógenos de *A. marginale* o con *A. centrale*. Los animales vacunados desarrollan inmunidad protectora de por vida, lo que reduce o previene la enfermedad clínica, pero se transforman en portadores y sirven como reservorios de la infección (Kocan y col., 2003). La vacuna más utilizada es la que contiene *A. centrale*, especie menos patógena para el bovino pero con la capacidad de producir inmunidad cruzada parcial contra *A. marginale* (Guglielmone, 1994; OIE, 2015). Esta vacuna se prepara a partir de sangre de terneros esplenectomizados inoculados con una cepa de *A. centrale*. La vacunación con *A. centrale* en general causa enfermedad leve o poco aparente aunque, en algunos animales, puede producir reacciones graves. A pesar de que la protección brindada por esta vacuna no es absoluta, cuando los animales vacunados se infectan con cepas silvestres de *A. marginale*, se reduce la gravedad de la reacción (Radostits y col., 2002). La vacuna con *A. centrale* se utiliza en varias zonas del mundo, incluyendo África, Australia, Israel y varios países de América Latina (Kocan y col., 2010; Aubry y Geale, 2011).

Otro tipo de vacunas vivas que estuvieron presentes en el mercado argentino son las que contienen *A. marginale* atenuado en su patogenicidad por irradiación o por el paso sucesivo del microorganismo en otros huéspedes como ovejas o ciervos (Guglielmone, 1994). La protección proporcionada por estas cepas resultó poco fiable (Kocan y col., 2010). Trabajos experimentales hechos en Argentina, demostraron que el uso de cepas atenuadas de *A. marginale* puede producir reacciones que no difieren de las producidas por cepas silvestres (Anziani y col., 1981; Guglielmone, 1994).

La utilización de vacunas vivas con *A. centrale* no está permitida en EUA donde esta especie es exótica. Esta prohibición llevó al desarrollo de vacunas utilizando *A. marginale* inactivado. Las vacunas inactivadas se comercializaron en EUA desde 1960 y hasta 1999,

cuando dejaron de producirse, y fueron efectivas en la prevención de la anaplasmosis clínica en el centro-sur de EUA donde las cepas generaban protección cruzada (Kocan y col., 2003; 2010). Actualmente, se está produciendo y distribuyendo una vacuna inactivada en 14 estados de EUA. Sin embargo, esta vacuna no tiene licencia del USDA (no se han realizado pruebas de eficacia o potencia), y sólo está aprobada para su uso como vacuna experimental (Aubry y Geale, 2011). La necesidad de refuerzos anuales, la dependencia de animales vivos como fuente de antígeno, el alto costo de purificación, la falta de protección cruzada entre cepas de áreas geográficas distantes y la menor capacidad de generar inmunidad protectora respecto a las vacunas con MO vivos, son las principales desventajas de las vacunas inactivadas (Kocan y col., 2003).

La investigación realizada en las últimas décadas ha contribuido al conocimiento de la composición antigénica de *A. marginale* y el papel de los antígenos de superficie en el desarrollo de inmunidad protectora. Sin embargo, aún no se han desarrollado vacunas efectivas que utilicen tecnologías moleculares.

### **Tratamiento**

El tratamiento específico para la anaplasmosis aguda se basa en la aplicación de tetraciclinas o imidocarbo. La dosis recomendada de oxitetraciclina para casos clínicos en condiciones de campo es de 10-15 mg/kg si se utilizan fórmulas al 5-10%, o una dosis de 20 mg/kg si se utilizan formulaciones de larga acción (LA). En el caso del dipropionato de imidocarbo, la dosis recomendada para el tratamiento de la enfermedad es de 2,5 a 3,5 mg/kg. (SENASA, 2005).

Existen restricciones en el uso de oxitetraciclina en bovinos de carne, los cuales no deben faenarse para consumo humano hasta transcurridos 10 días si son tratados con soluciones al 5%, 14 días con soluciones al 10% y 28 días si se utiliza una formulación de LA. En leche las restricciones para el consumo son 3 días con soluciones al 5% y 5 días con soluciones al 10% (SENASA, 2005). El imidocarbo posee un período de restricción de 7 meses en carne y 6 días en leche.

La esterilización de *A. marginale* en áreas enzoóticas generalmente no es deseable ya que la presencia del microorganismo en el animal asegura una inmunidad prolongada. Sin embargo, cuando aparecen casos en áreas no endémicas debe considerarse la posibilidad

de erradicación. Como primera medida se debe conocer la prevalencia de la anaplasmosis en el rodeo afectado y en los establecimientos vecinos. Cuando la prevalencia es baja y no es posible eliminar del rodeo a los portadores, se puede indicar la esterilización con oxitetraciclina 20 mg/kg (LA) a razón de tres dosis con intervalo de 3 a 4 días. La conducta a seguir a continuación dependerá de la situación epizootica en el área (SENASA, 2005).

## **HIPÓTESIS GENERAL**

El desarrollo de un ELISA basado en la proteína MSP5 recombinante de *A. marginale* y *A. centrale* que permita evaluar la situación epidemiológica de la anaplasmosis, y de un inmunógeno recombinante aplicable en animales adultos; contribuye a la prevención y el control de la anaplasmosis bovina en la región.

## **OBJETIVOS**

1. Desarrollar un ELISA de elevada sensibilidad y especificidad para la identificación de bovinos infectados por *A. marginale* o vacunados con *A. centrale*.
2. Desarrollar un inmunógeno recombinante para la prevención de la enfermedad en animales adultos.

CAPÍTULO I  
DIAGNÓSTICO

---

## 1.1 INTRODUCCIÓN

La anaplasmosis bovina es una enfermedad en expansión que ocasiona un significativo impacto económico negativo en un país fuertemente ganadero y lechero como Argentina (Späth y col., 1994). El registro de brotes de la enfermedad en zonas consideradas libres es cada vez más frecuente como consecuencia del cambio climático que impacta sobre los nichos ecológicos de los transmisores de *A. marginale*, y de otros factores de manejo deficiente como el transporte de animales portadores asintomáticos desde áreas endémicas hacia áreas no endémicas (de Echaide y col., 2004; Anziani, 1979). Es por eso que existe una creciente demanda en la región de métodos de diagnóstico eficientes y de bajo costo.

La existencia de inmunidad en el animal y la edad a la que ocurre el primer contacto con el parásito (primoinfección), determinan el efecto clínico de la infección. El cuadro clínico típico de la infección aguda por *A. marginale* ocurre generalmente en animales adultos no inmunes cuando se transportan a regiones endémicas. En las zonas endémicas, donde los vectores son abundantes, la epidemiología de esta enfermedad se caracteriza por la estabilidad enzoótica que implica la presencia de un alto porcentaje de ganado infectado con la rara ocurrencia de enfermedad clínica. Esta relación se mantiene debido a la temprana infección de los terneros los cuales poseen resistencia innata a la anaplasmosis hasta los 9 meses de edad promedio. Durante este período los animales se infectan sin presentar signos de enfermedad, y la inmunidad resultante se mantiene en el animal adulto mediante reinfecciones periódicas sin signos clínicos. En regiones donde la población de vectores se reduce artificialmente por un intenso control, se rompe el equilibrio y no todos los terneros se infectan antes de los 9 meses de edad creándose un segmento de ganado sin inmunidad susceptible a desarrollar la enfermedad clínica aguda cuando entre en contacto con el hemoparásito. Esta situación es conocida como inestabilidad enzoótica en la cual la enfermedad se vuelve periódicamente aparente, coincidiendo con períodos favorables para la reproducción de los vectores (Ericks y col., 1993; Aubry y Geale, 2011).

La vacunación con *A. centrale*, una especie estrechamente relacionada pero menos patógena que *A. marginale*, se usa en varios países del mundo incluida Argentina en animales jóvenes (<10 meses) para prevenir la anaplasmosis aguda en áreas endémicas con inestabilidad enzoótica, y en terneros de zonas libres que se moverán a una región

endémica. Esta vacuna viva sólo causa signos clínicos leves, y genera inmunidad cruzada parcial contra *A. marginale* reduciendo la gravedad de la enfermedad y previniendo la muerte (Abdala y col., 1990).

En Argentina la ausencia de brotes de anaplasmosis en áreas endémicas se logra generando una alta proporción de bovinos adultos inmunes, ya sea a través de la infección natural de los terneros con *A. marginale* por un manejo adecuado de la población de vectores, o mediante la aplicación de la vacuna viva de *A. centrale*. En las zonas libres de anaplasmosis la aparición de brotes se evita controlando el ingreso de animales portadores de *A. marginale* (Aubry y Geale, 2011).

Las pruebas serológicas son de gran importancia para estudios epidemiológicos con el objetivo de caracterizar áreas de estabilidad e inestabilidad enzoótica. La implementación de medidas de control apropiadas requiere pruebas serológicas altamente sensibles y específicas que puedan proporcionar información sobre: i) la identificación de bovinos portadores de *Anaplasma* spp., ii) el estado inmune de los terneros frente a *Anaplasma* spp. en regiones endémicas y la necesidad de vacunación, y iii) la respuesta inmune de los terneros a la vacunación con *A. centrale* (Guglielmone, 1995).

El ELISAc es la técnica serológica recomendada por la OIE para la detección de anticuerpos contra *Anaplasma* spp. En nuestro país actualmente se usa el ELISAc comercial version 1 (ELISAcc v1) (VMRD, Inc.), avalado por la OIE (OIE, 2015), que utiliza como antígeno a la proteína MSP5 de *A. marginale* (MSP5m) expresada en forma recombinante como proteína de fusión con la chaperona molecular *maltose binding protein* (MBP) proveniente de *E. coli* (MBP-MSP5m); mientras que para la competición utiliza el AcM ANAF16C1 (Knowles y col., 1996).

MSP5 es una proteína de membrana, inmunodominante, compuesta por 210 residuos (23 kDa); presente en todas las especies de *Anaplasma* conocidas. El epitope de MSP5 reconocido por el AcM ANAF16C1 se conserva ampliamente en *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *A. phagocytophilum* y *Ehrlichia* spp. (Strik y col., 2007; Al-Adhami y col., 2011).

El uso del ELISAcc v1 se implementó en 1998 en el Laboratorio de Inmunología y Parasitología Veterinaria (LIPVet) del INTA EEA Rafaela, con reactivos provistos por la Universidad del Estado de Washington. Esta prueba fue validada en Argentina y utilizada en estudios epidemiológicos y en la evaluación de la respuesta inmune a la vacuna viva.

Desde 2008 el antígeno MBP-MSP5m se produce en el LIPVet y se lo utiliza en el ELISAc con el AcM ANAF16C1, obtenido comercialmente. El motivo de la utilización de MBP como proteína de fusión radica en la baja expresión y solubilidad de la proteína MSP5 recombinante cuando se la expresa sola, y en la baja recuperación obtenida cuando se la trata con la proteasa específica (enteroquinasa) para liberarla de la MBP. El uso del antígeno MBP-MSP5m obliga a realizar en las muestras de suero un paso previo de adsorción con MBP para disminuir las interacciones específicas no deseadas derivadas de los anticuerpos anti-MBP presentes en el animal, aumentando el tiempo de ejecución y afectando la especificidad de la prueba. El ELISAcc v1 fue validado con muestras de sueros de bovinos obtenidas de una región endémica para anaplasmosis en EUA (país libre de *A. centrale*). La sensibilidad y especificidad reportadas fueron del 96% y 95%, respectivamente (Torioni de Echaide y col., 1998).

Recientemente se comenzó a comercializar un ELISAc comercial versión 2 (ELISAcc v2) (VMRD, inc.), que reemplaza la MBP por glutatión S-transferasa (GST) (GST-MSP5m) para evitar el paso de absorción de las muestras; simplificando la técnica y aumentando la especificidad (Chung y col., 2014).

Ambos ELISAc fueron validados en EUA utilizando muestras de animales portadores de *A. marginale*. Sin embargo, estas técnicas son utilizadas en nuestro país para la evaluación de la inmunogenicidad de la vacuna viva con *A. centrale*, aún sin estar validadas para ese fin (EUA es un país libre de *A. centrale* y no está permitida la vacunación).

El ELISAi (Svanova<sup>®</sup>) utiliza como antígeno la proteína de fusión GST-MSP5m y un AcM anti-IgG bovino conjugado con peroxidasa para detectar el complejo inmune. Los autores reportan una sensibilidad y especificidad >90% (Morzaria y col., 1999), sin embargo, cuando fue utilizado para determinar la prevalencia de anaplasmosis en Uganda mostró una baja correlación con la observación microscópica directa de extendidos de sangre teñidos con Giemsa. Estos resultados no son concluyentes ya que el uso de técnicas moleculares sería más apropiado cuando las parasitemias esperadas son bajas (Palmfjord, 2015).

Con el objetivo de desarrollar un ELISA adaptado para satisfacer las necesidades de diagnóstico de nuestro país, se ha realizado un análisis de las características del antígeno MSP5 de las dos especies de *Anaplasma* de interés en la región, asociadas a los bovinos.

El análisis de la estructura primaria de MSP5 realizado con tres algoritmos computacionales diferentes obtenidos a través del servidor *ExPASy Proteomics Server* (<http://expasy.org>), predijo una hélice de transmembrana en el extremo N-terminal de la proteína (residuos 1-27). En otras proteínas se ha observado que la clonación y expresión en *E. coli* sin la región hidrofóbica de transmembrana, puede cambiar drásticamente los niveles de expresión y solubilidad sin afectar la inmunorreactividad (Yang y col., 2014).

Basado en estos datos, a través de este trabajo se propone probar las siguientes hipótesis: i) la clonación de MSP5 de *A. marginale* y MSP5 de *A. centrale* truncadas (sin la hélice de transmembrana) permite la expresión como proteínas solubles evitando el uso de las chaperonas moleculares MBP o GST, y ii) la utilización de las proteínas truncadas como antígenos en un ELISA aumenta la especificidad, y la incorporación al ensayo del antígeno de *A. centrale* mejora la sensibilidad en la detección de animales vacunados.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 *Objetivo general*

Desarrollar y validar un ELISA de alta sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos en animales naturalmente infectados con *A. marginale* y en animales vacunados con *A. centrale*.

### 1.2.2 *Objetivos específicos*

1. Clonar, expresar soluble en *E. coli* y purificar una forma truncada de las proteínas MSP5 de *A. marginale* (tMSP5m), *A. centrale* (tMSP5c) y la fusión de *A. marginale* y *A. centrale* (tMSP5cm), prescindiendo del uso de chaperonas moleculares.
2. Evaluar el reemplazo de MBP-MSP5m por tMSP5c/tMSP5m o tMSP5cm como antígenos en diferentes diseños de ELISA, para mejorar la especificidad e identificar con mayor sensibilidad los animales vacunados con *A. centrale*.

## 1.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.3.1 Muestras

#### 1.3.1.1 Obtención

Para la optimización y validación de los ELISA, se utilizaron muestras de sangre colectadas asepticamente, con y sin anticoagulante (citrato 5%), provenientes de tres grupos (G) de animales seleccionados por su procedencia: G1, vacas nacidas y criadas en una zona endémica de anaplasmosis con presencia de *R. microplus* (Villa Ángela [27°35'S-60°43'O] y Avia Terai [26°40'S-60°46'O], Chaco); G2, terneros vacunados al menos cuatro meses antes del comienzo del ensayo con una dosis de  $10^7$  eritrocitos parasitados con *A. centrale*, pertenecientes a un rodeo históricamente libre de anaplasmosis localizado en una zona libre de garrapatas (Rafaela [31°11'S-61°30'O], Santa Fe) y G3, vacas nacidas y criadas en el mismo rodeo libre de anaplasmosis, sin vacunar.

El número de muestras analizadas de cada grupo para el ELISA de competición *in house* (ELISA<sub>hc</sub>) fue de 255, 173 y 216 para el G1, G2 y G3, respectivamente; para el ELISA de doble paratope (ELISA<sub>dp</sub>) ese número se amplió a 436, 358 y 388, respectivamente.

Los controles positivos fueron sueros y sangre obtenidos de terneros esplenectomizados infectados experimentalmente mediante inoculación intramuscular de  $10^7$  eritrocitos parasitados con *A. marginale* o *A. centrale*. Estos animales se mantuvieron aislados en corrales *ad-hoc* provistos de agua y alimento *ad-libitum*. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (Protocolo N° 243/15).

#### 1.3.1.2 Extracción del ADN genómico

El ADN se purificó mediante el método del fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico (Baravalle y col., 2012), a partir de las muestras de sangre entera descriptas en 1.3.1.1:

A partir de 900  $\mu$ l de sangre se lisaron los eritrocitos con igual volumen de *buffer* lisis ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,14 M, Tris-HCl 0,17 M) durante 10 min a TA, y los parásitos libres se separaron por centrifugación. La hemoglobina se eliminó por sucesivos lavados del sedimento con agua destilada. Los cuerpos de inclusión se lisaron en 400  $\mu$ l de *buffer* lisis celular (Tris-

HCl 0,05 M, EDTA 0,1 M, NaCl 0,1 M, SDS 2%, pH 8) con 160 µg de proteinasa K, durante 2 horas a 58 °C. El ADN se extrajo con un volumen (400 µl) de fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico (25:24:1) y centrifugación durante 10 min a 4 °C; luego se precipitó con igual volumen de isopropanol frío y se lavó con etanol 75%. El pellet seco se resuspendió en 50 µl de agua destilada y se almacenó a -20 °C. Todas las centrifugaciones se realizaron a 14.000 x g. La concentración y pureza del ADN se determinó mediante la medición de la absorbancia a 260 y 280 nm de las muestras (NanoDrop™ 2000 Spectrophotometers, Thermo Fisher Scientific, EUA).

### 1.3.1.3 Estatus de infección

El ADN extraído en 1.3.1.2 se utilizó para confirmar el estatus de infección de cada muestra descrita en 1.3.1.1, mediante PCRn para *A. marginale* y *A. centrale* (Molad y col., 2006).

## 1.3.2 Producción de los antígenos

### 1.3.2.1 Análisis *in silico* de MSP5

Se realizó el alineamiento de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre MSP5 de *A. marginale* y MSP5 de *A. centrale* utilizando ClustalW (1.83) (<http://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html>). Se obtuvo la predicción de las hélices de transmembrana (HTM) en las proteínas a través del algoritmo TMPred ([http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED\\_form.html](http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html)) (Hofmann y Stoffel, 1993). Se calculó la solubilidad de las proteínas MSP5 de longitud completa y truncada (sin HTM) usando un modelo estadístico de predicción de la solubilidad para la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli* (<http://biotech.ou.edu/>) (Díaz y col., 2010).

### 1.3.2.2 Clonado de tMSP5m, tMSP5c y tMSP5cm

La amplificación de los genes que codifican para la forma truncada (residuos 28-210) de las proteínas MSP5 de *A. marginale* (tMSP5m) y MSP5 de *A. centrale* (tMSP5c), se realizó con el mismo par de *primers* (F-MSP5 y R-MSP5) ya que las secuencias de ADN en las zonas de hibridación son idénticas para las dos especies (Tabla 2). El *primer* R-MSP5 agregó una secuencia que codifica para una cola de 6 histidinas (His-tag) en el extremo C-terminal de las proteínas, la cual facilitó la purificación por pseudoafinidad con

una resina de NTA-Ni<sup>2+</sup>. Además, dichos *primers* agregaron la secuencia de reconocimiento para las enzimas de restricción *NdeI* (F-MSP5) y *BamHI* (R-MSP5) con el objetivo de orientar la inserción del inserto en el vector de expresión (Tabla 2).

La amplificación de los genes se realizó por PCR utilizando la enzima polimerasa de alta fidelidad de copia *pfx platinum* (Thermo Fisher Scientific). Los fragmentos amplificados se clonaron en el vector pGEM-T *Easy* (Promega, EUA) con el que se transformaron células *E. coli Top10F* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez confirmadas las secuencias (Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar), los plásmidos resultantes se utilizaron como material de partida para construir los vectores para la expresión de las proteínas en sistemas procariontes. Así, mediante la digestión con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*, los fragmentos obtenidos se subclonaron en el vector de expresión pET-9b (Novagen, EUA) para producir los plásmidos ptMSP5c y ptMSP5m.

Para generar la fusión de tMSP5c y tMSP5m (tMSP5cm), se realizaron tres PCR adicionales: PCR<sub>1</sub>, usando ptMSP5c como molde y los *primers* F-pET9 y R-1; PCR<sub>2</sub>, usando ptMSP5m como molde y los *primers* F-2 y R-pET9 y PCR<sub>3</sub>, usando los productos de PCR<sub>1</sub> y PCR<sub>2</sub> como templado y los *primers* F-pET9 y R-pET9. En la Tabla 2 se muestra la secuencia de los distintos *primers*.

Se evaluó la expresión de las proteínas en las cepas de *E. coli BL21(DE3)pLysS* (Promega, EUA), *Rosetta*<sup>TM</sup> (Novagen, EUA) y *BL21-CodonPlus-RIL* (Stratagene, EUA); las dos últimas poseen plásmidos para la expresión de ARNt de bajo uso en *E. coli*.

**Tabla 2.** Lista de *primers*. Subrayadas se destacan las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* en F-MSP5 y R-MSP5, respectivamente. En cursiva se muestra la secuencia que codifica para la cola de 6 histidinas en R-MSP5. Las secuencias subrayadas en R1 y F2 son complementarias y permiten la fusión de los productos de la PCR<sub>1</sub> y PCR<sub>2</sub>.

<i>Primers (5' a 3')</i>	
<u>catatgggtat</u> ttttcagcaaaatc	F-MSP5
<u>ggatcctcagtgatggtgatggtgatggcggccttgaattaagcatgtgacc</u>	R-MSP5
tgcattgcaaggagatggcgcccaacagt	F-pET9
<u>gctttcttatacagagaggtagaattaagcatg</u>	R-1
<u>ctctgtataagaaagcaggtggtat</u> ttttcag	F-2
ttctccttcattacagaaacggct	R-pET9

### 1.3.2.3 Expresión y purificación de las proteínas

Para la expresión de las proteínas recombinantes, células *E. coli BL21-CodonPlus-RIL* transformadas con ptMSP5c, ptMSP5m o ptMSP5cm fueron cultivadas a 37° C en 500 ml de medio de cultivo LB suplementado con kanamicina 50 µg/ml y cloranfenicol 34 µg/ml hasta  $DO_{600nm}=1$ . La expresión se indujo con 1% de lactosa durante 3 horas. Posteriormente las células fueron colectadas por centrifugación y resuspendidas en 10 ml de *buffer* lisis (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 8) con el agregado de *cocktel* inhibidor de proteasas 1:1000 (Set III Calbiochem). Finalmente se lisaron mediante dos pasadas por un disruptor celular (Avestin Emulsiflex B15, Canada) a 20000 psi. La fracción soluble se separó mediante centrifugación (12.000 x g, 30 min, 4 °C) y se incubó en agitación (1 hora, 4 °C) con 2 ml de resina NTA-Ni<sup>2+</sup> (Quiagen, Germany) equilibrada previamente con *buffer* lisis. Luego la suspensión se colocó en columnas de 1,5 cm x 5 cm y se lavó con cinco volúmenes de columna de *buffer* lisis con imidazol 30 mM. La elución de las proteínas se realizó sucesivamente con cinco volúmenes de columna del mismo *buffer* con imidazol 100 mM y 200 mM. Finalmente las proteínas se dializaron durante toda la noche a 4 °C en *buffer* fosfato de sodio 50 mM, NaCl 200 mM, pH 7,2, y se evaluaron por SDS-PAGE usando un protocolo estándar (Schägger y von Jagow, 1987). La concentración se determinó mediante la medición de la absorbancia a 280 nm (NanoDrop™ 2000) y la utilización del coeficiente de extinción molar de cada proteína ( $\epsilon_{280nm}$ ) (8940M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, 10430M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, 20860 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> para tMSP5m, tMSP5c y tMSP5cm, respectivamente).

### 1.3.2.4 Evaluación de la inmunoreactividad de las proteínas

La evaluación de la conservación de la inmunoreactividad de las proteínas recombinantes tMSP5m, tMSP5c y tMSP5cm se realizó por ELISAI y *Western blot* (WB), utilizando el AcM ANAF16C1 y ocho AcM previamente generados en el LIPVet usando como inmunógeno a la proteína recombinante tMSP5m.

Para realizar el ELISAI, placas de alto pegado de 96 pocillos se incubaron durante toda la noche con 100 µl de tMSP5m, tMSP5c y tMSP5cm (10 µg/ml) diluidas en PBS (NaCl 145 mM, NaHPO<sub>4</sub> 4,4 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18,3 mM). Luego de 2 lavados con PBS, se bloquearon con solución de bloqueo (PBS/10% leche descremada) durante 1 hora.

Posteriormente se realizaron tres lavados con PBST (PBS/0,05% *Tween* 20), y las placas se incubaron durante 1 hora con cada AcM diluido 1:200 en PBST/10% leche descremada. Luego de cinco lavados con PBST, se incubaron durante 1 hora con un suero policlonal anti-ratón IgG-HRP (#115-036-072, Jackson ImmunoResearch, EUA) diluido 1:2000 en PBST/10% leche descremada. Finalmente se realizaron cinco lavados con PBST, y la reacción se reveló con el sustrato cromogénico 2,2'-Azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]-diamonio sal (ABTS) 1 mM (Sigma-Aldrich, EUA) en citrato de sodio 0,05 M pH 4,5, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,0025% v/v. La absorbancia se midió a 405 nm.

Para realizar el WB, las proteínas tMSP5, tMSP5c y tMSP5cm (1 µg) luego de su separación por SDS-PAGE, se transfirieron (50 V, 2 horas) a una membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot® 0,45 µm, Bio-Rad) la cual se bloqueó durante 2 horas por incubación con TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6)/5% leche descremada. Luego de cuatro lavados con TBST (TBS/0,05% *Tween*20), se incubó durante 1 hora con el AcM ANAF16C1-HRP (VMRD Inc.) diluido 1:100 en TBST/3% leche descremada. La membrana se lavó cinco veces con TBST, y la reacción se reveló con 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 0,5 mg/ml (DAB) (Sigma-Aldrich)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01%. También se realizaron WB con las proteínas tMSP5m y tMSP5c y los ocho AcM producidos en el LIPVet, siguiendo el mismo protocolo. Como control positivo se usó el AcM ANAF16C1, y como control negativo un AcM contra *Neospora caninum*.

### 1.3.2.5 Biotinilación de las proteínas

Alícuotas de las proteínas tMSP5m y tMSP5c purificadas en 1.3.2.3 se biotinilaron para de ser utilizadas como reactivo revelador de la reacción primaria antígeno-anticuerpo en el ELISAdp. tMSP5m o tMSP5c (2 mg) se incubaron con 0,8 mg de sulfo-NHS-biotina (Pierce, Rockford, IL) en un volumen final de 2 ml, durante 2 horas en hielo. La biotina libre se eliminó con una columna de desalación *Thermo Scientific Zeba spin*. El número de grupos de biotina incorporados por molécula se determinó mediante el método del ácido 4'-hidroxiazobenceno-2-carboxílico (HABA) (Pierce® Biotin Quantitation Kit; Thermo Scientific). La pureza de tMSP5m-biotina (tMSP5m\*) y tMSP5c-biotina (tMSP5c\*) se evaluó mediante SDS-PAGE. La presencia de contaminantes proteicos biotinilados se evaluó por WB siguiendo el protocolo descrito en 1.3.2.4, utilizando estreptavidina-HRP

(Jackson ImmunoResearch) a una dilución de 1:750 en TBST/3% leche descremada para revelar la presencia de biotina.

### 1.3.3 Protocolos de ELISA

Las muestras de suero y controles se evaluaron por duplicado y todas las incubaciones se realizaron a 25 °C.

#### 1.3.3.1 ELISA de competición comercial v1 (ELISAcc v1)

Los resultados obtenidos en los distintos diseños de ELISA ensayados se contrastaron con los resultados obtenidos con el *kit* comercial de ELISAcc v1 (VMRD Inc.), recomendado por la OIE (OIE, 2015), el cual se utilizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, 70 µl de cada muestra de suero y controles se incubaron en una placa de adsorción con MBP durante 30 min. Luego 50 µl de cada muestra adsorbida se transfirieron al correspondiente pocillo de la placa tapizada con el antígeno (MBP-MSP5m), y la misma se incubó durante 1 hora. Luego de dos lavados, se adicionaron 50 µl del AcM ANAF16C1-HRP y la placa se incubó por 20 min. Se realizó cuatro lavados, y la reacción se reveló durante 20 min en la oscuridad con el agregado de 50 µl de solución de sustrato. Finalmente la reacción se detuvo con 50 µl de solución *stop* y la placa se leyó a 620 nm.

#### 1.3.3.2 ELISA de competición *in house* (ELISAhc)

Tres variantes de ELISAhc fueron evaluadas basadas en los antígenos recombinantes tMSP5m (ELISAhc-m), tMSP5c (ELISAhc-c) y tMSP5cm (ELISAhc-cm). Placas de 96 pocillos (*Nunc Polysorp*) se tapizaron con 50 µl de tMSP5m o tMSP5c o tMSP5cm (1 µg/pocillo) diluidas en PBS, y se incubaron a 4 °C durante toda la noche. Luego de dos lavados con PBS, se bloquearon con 300 µl de solución de bloqueo durante 1 hora. Se realizaron tres lavados con PBST, y se incubaron con 100 µl de suero por 1 hora. Luego se siguió con el mismo protocolo y con los mismos reactivos del ELISAcc v1 descrito en 1.3.3.1.

### 1.3.3.3 ELISA de doble paratope (ELISAdp)

Tres variantes de ELISAdp fueron evaluadas basadas en los antígenos recombinantes tMSP5m (ELISAdp-m), tMSP5c (ELISAdp-c) y la combinación individual de ambos (ELISAdp-mc). Las concentraciones óptimas de los antígenos para el tapizado de la placa y de los antígenos biotinilados utilizados para revelar la interacción primaria entre el antígeno inmovilizado y el anticuerpo, se determinaron mediante combinaciones de diluciones seriadas de los reactivos. Placas de 96 pocillos (*Nunc Polysorp*) se incubaron a 4 °C durante toda la noche con 100 µl de tMSP5m o tMSP5c (80 ng/pocillo) o ambos antígenos individuales (40 ng/pocillo) diluidos en PBS. Después de dos lavados con PBS, se agregaron 300 µl de solución de bloqueo y se incubaron durante 1 hora. Luego de lavar tres veces con PBST, las placas se incubaron durante 1 hora con 100 µl de las muestras de suero sin diluir. Posteriormente se lavaron (cinco veces con PBST), y se incubaron durante una hora con 100 µl de tMSP5m\* o tMSP5c\* (2 µg/ml) o ambos (1 µg/ml de cada uno) diluidos en PBST/10% leche descremada. Las placas se lavaron (cinco veces con PBST), y la proteína unida a biotina se detectó por incubación durante 1 hora con 100 µl de estreptavidina-HRP (Jackson ImmunoResearch) diluida 1:500 en PBST/10% leche descremada. El lavado final (cinco veces con PBST) fue seguido por la adición de 100 µl del sustrato cromogénico ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y las placas se incubaron en la oscuridad. La reacción se midió a 405 nm entre las 16 y 20 horas.

Una vez optimizadas las concentraciones de los reactivos y los tiempos de incubación, se procedió a analizar la cinética de la reacción colorimétrica a 405 nm para optimizar el tiempo de incubación del sustrato. Para ello, se utilizaron sueros de cinco grupos (G) de 10 bovinos (n=10) cada uno: GI y GII correspondieron a animales infectados con *A. marginale* con reacción colorimétrica rápida (GI) y lenta (GII); GIII y GIV a animales vacunados con *A. centrale* con reacción colorimétrica rápida (GIII) y lenta (GIV), y GV a animales no vacunados ni infectados. La cinética de la reacción colorimétrica se analizó durante 20 horas a través de mediciones de la DO<sub>405nm</sub> a diferentes tiempos luego del comienzo de la reacción: cada 5 min durante las primeras 2 horas, cada 10 min durante las próximas 2 horas, cada 30 min durante la quinta hora, y a la hora 6, 8 y 20 de agregado el sustrato.

### 1.3.4 Análisis de datos

Los resultados de los ELISAc se expresaron como porcentajes de inhibición (% I) y los resultados del ELISAdp como porcentajes de positividad (% P). Los % se calcularon utilizando las siguientes fórmulas:

$$\% I = 100 [1 - (\text{DO de la muestra} / \text{DO del control negativo})]$$

$$\% P = 100 (\text{DO de la muestra} / \text{DO del control positivo})$$

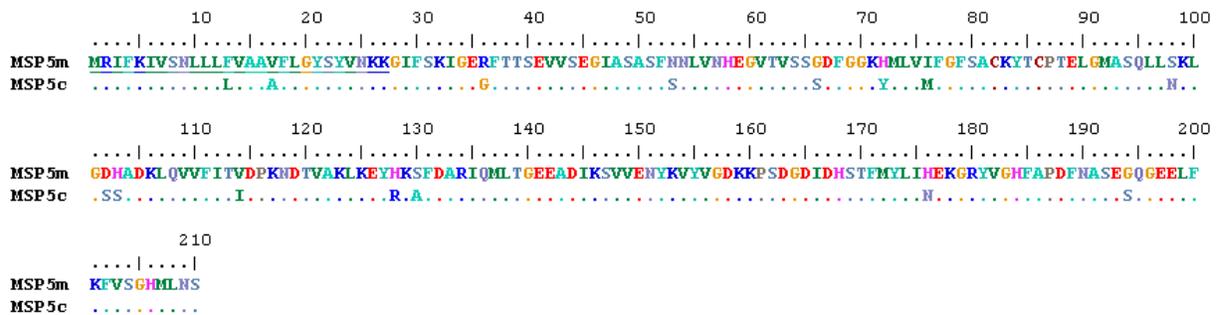
El punto de corte, sensibilidad y especificidad para el ELISAcc v1 y las variantes del ELISAhc y del ELISAdp se establecieron mediante una curva de características operantes de un receptor (curva ROC) utilizando el programa MedCalc (Greiner y col., 2005). El análisis de las curvas ROC para cada variante de ELISA se realizó utilizando el grupo de muestras negativas y positivas específicas para el antígeno de la variante de ELISA ensayada. Así, el análisis de las curvas ROC de los ELISA que utilizan el antígeno tMSP5m se realizó con los resultados de las muestras del G1 y G3, el de los que utilizan el antígeno tMSP5c se realizó con los resultados de las muestras del G2 y G3, y el de los que utilizan los dos antígenos se realizó con los resultados de las muestras de los tres grupos.

La concordancia entre los ELISA fue determinada usando el valor kappa de Cohen proporcionado por el programa MedCalc. Las diferencias en las medias de los resultados obtenidos con las distintas variantes de ELISA se establecieron aplicando el *test* de Mann Whitney.

## 1.4 RESULTADOS

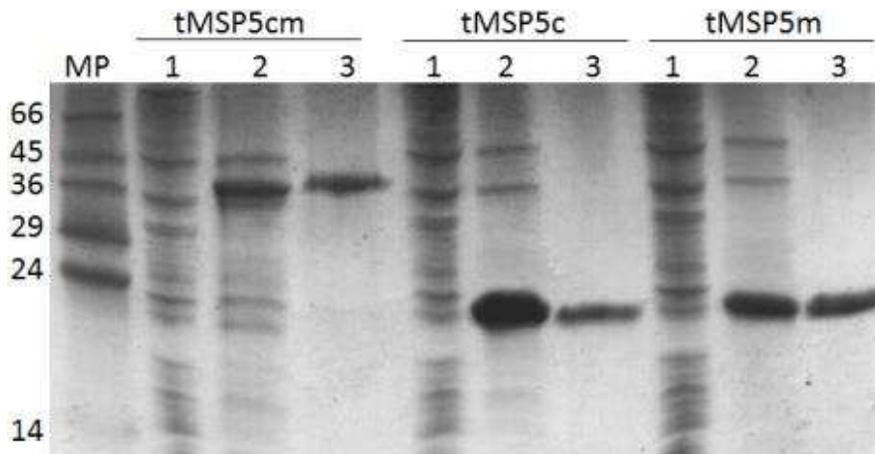
### 1.4.1 Producción de los antígenos

La comparación de las secuencias de MSP5 de *A. marginale* y MSP5 de *A. centrale* reveló una identidad del 91,5% (Figura 5). El análisis de la estructura primaria de MSP5 con TMpred predijo una HTM en el extremo N-terminal de las proteínas (residuos 1 al 27). La predicción de la solubilidad para la expresión heteróloga en *E. coli* de la forma truncada (residuos 28-210) de las proteínas MSP5 (tMSP5m y tMSP5c) fue del 100%, mientras que la predicción para las proteínas de longitud completa fue del 65%.



**Figura 5.** Alineamiento de las secuencias de las proteínas MSP5 de *A. marginale* (MSP5m) y *A. centrale* (MSP5c). Subrayado se muestra el dominio de transmembrana el cual fue excluido en tMSP5m y tMSP5c.

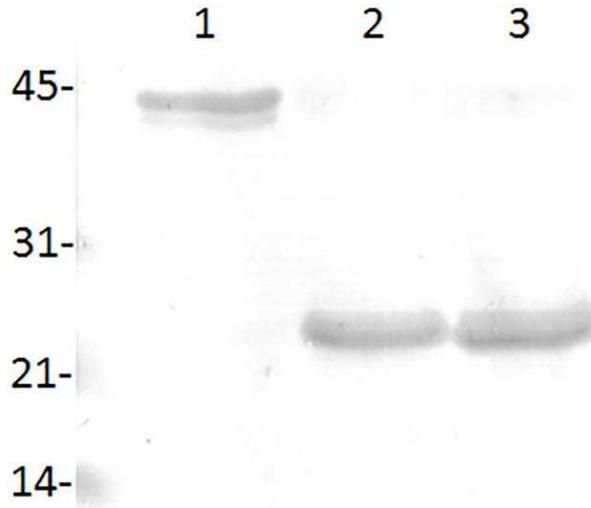
Las proteínas tMSP5m, tMSP5c y tMSP5cm se expresaron en forma soluble (>95%) en el citoplasma de *E. coli*, y el rendimiento fue de aproximadamente 40, 60 y 60 mg de proteína pura por litro de cultivo, respectivamente. El epítopo His-tag agregado al extremo C-terminal de las proteínas permitió obtener un alto nivel de pureza (>95%) en un único paso de purificación (Figura 6).



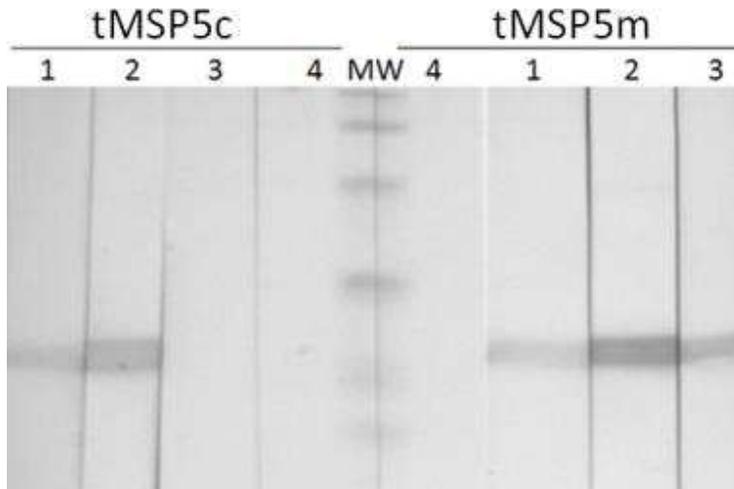
**Figura 6.** SDS-PAGE de la expresión y purificación en una columna de NTA-Ni<sup>2+</sup> de tMSP5cm, tMSP5c y tMSP5m. Calle MW, marcador de peso molecular (kDa); calles 1 y 2, fracciones insolubles y solubles del lisado celular post-inducción, respectivamente; calle 3, fracción de proteína purificada eluída con imidazol 100 mM. La coloración se realizó con *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

La conservación de la inmunorreactividad de las proteínas recombinantes tMSP5m, tMSP5c y tMSP5cm con el AcM ANAF16C1 fue demostrada por ELISAI y WB (Figura 7).

El análisis por ELISAI y WB de la reactividad frente a tMSP5m y tMSP5c de un total de ocho hibridomas productores de AcM previamente obtenidos en el LIPVet utilizando para la inmunización a la proteína tMSP5m, permitió confirmar la presencia de epitopes específicos de MSP5 de *A. marginale* y epitopes compartidos entre MSP5 de *A. marginale* y *A. centrale*. Por ambas técnicas cuatro de estos AcM reconocieron epitopes compartidos entre tMSP5m y tMSP5c (identificados como Amc) y los otros cuatro, reconocieron epitopes específicos de tMSP5m (identificados como Am). La reactividad por WB de los AcM Amc2-HRP y Am3-HRP, se muestra en la Figura 8.



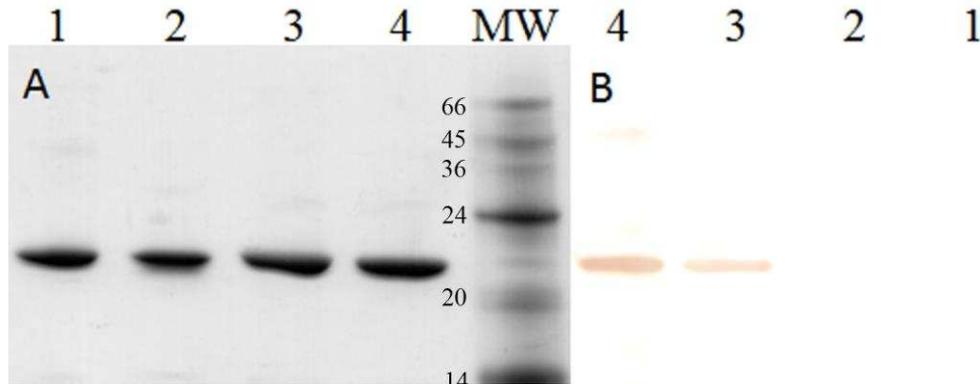
**Figura 7.** *Western blot* de tMSP5cm (calle 1), tMSP5c (calle 2) y tMSP5m (calle 3) revelado con el AcM ANAF16C1.



**Figura 8.** *Western blot* de tMSP5m y tMSP5c revelado con el AcM ANAF16C1 (calle 1), Amc2 (calle 2), Am3 (calle 3) o anti-*Neospora caninun* (calle 4). Calle MW: marcadores de peso molecular (14, 21, 31, 45, 66 kDa).

Las proteínas tMSP5m y tMSP5c biotiniladas (tMSP5m\* y tMSP5c\*) utilizadas como reactivos en el ELISAdp, incorporaron entre 2 y 3 grupos de biotina por molécula según lo determinado por el método HABA. El peso molecular de la biotina es 244 Da por lo que no se aprecia diferencia en la movilidad electroforética entre las proteínas

biotiniladas y sin biotinilar (Figura 9A). El WB con estreptavidina-HRP reveló una banda de ~22 kDa en las calles donde se sembró tMSP5m\* y tMSP5c\* (Figura 9B).



**Figura 9.** Purificación y biotinylación de las proteínas recombinantes. (A) SDS-PAGE y (B) *Western blot* de tMSP5m (calle 1), tMSP5c (calle 2), tMSP5m\* (calle 3) y tMSP5c\* (calle 4). MW: marcador de peso molecular (kDa). El SDS-PAGE se tiñó con *Coomasie Brilliant Blue R-250* y el *Western blot* se reveló con estreptavidina peroxidasa.

## 1.4.2 Detección de anticuerpos por ELISA

### 1.4.2.1 Evaluación de los antígenos truncados por ELISAhc

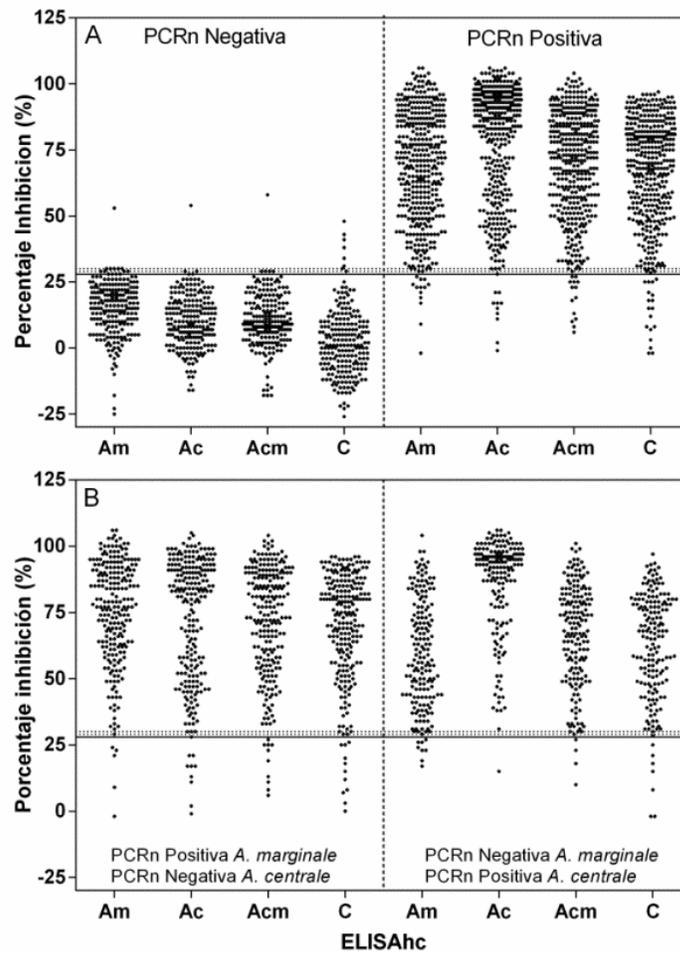
El análisis mediante las curvas ROC de las 644 muestras de suero correspondientes a 216 bovinos no infectados ni vacunados (G3), 255 bovinos infectados con *A. marginale* (G1) y 173 bovinos vacunados con *A. centrale* (G2), permitió establecer un punto de corte para el ELISAcc v1 y cada variante del ELISAhc (Tabla 3). Las tres variantes del ELISAhc (basadas en las proteínas truncadas tMSP5m, tMSP5c o tMSP5cm), mostraron mayor sensibilidad y especificidad que el ELISAcc v1 (basado en el antígeno MBP-MSP5m). La especificidad para el ELISAcc v1 fue del 96,3% y la sensibilidad general fue del 95,5%. La especificidad fue la misma para las tres variantes del ELISAhc (99,5%) mientras que la sensibilidad general fue 95,5%, 96,2% y 97,2% para ELISAhc-m, ELISAhc-cm y ELISAhc-c, respectivamente. La mejor *performance* se obtuvo con el ELISAhc-c y la mayor diferencia se vio cuando las poblaciones de animales infectados y vacunados se analizaron por separado (Tabla 3). La distribución de los resultados de % I medidos por

ELISAcc v1 y por las tres variantes de ELISAhc agrupados según la clasificación de los animales como negativos (G3) o positivos (G1+G2), se representa en la figura 10A. La distribución de los % I de la población de animales positiva subdividida según los bovinos se encuentren infectados con *A. marginale* (G1) o vacunados con *A. centrale* (G2), se representa en la Figura 10B.

La integridad antigénica de la molécula truncada de MSP5 se evaluó comparando los resultados del ELISAcc v1 y del ELISAhc-m. La sensibilidad de los dos ELISA fue la misma (95,5%) pero la especificidad del ELISAhc-m fue superior (99,5%). La concordancia entre los resultados de ambos ELISA fue del 97% con un valor de kappa de 0,94. Por ELISAcc v1 y/o MSP5hc-m hubo en total 8 resultados falsos positivos, y 29 resultados falsos negativos de los cuales 7 fueron coincidentes en ambos *test* (Tabla 4).

**Tabla 3.** Sensibilidad, especificidad y punto de corte del ELISAcc v1 y de las tres variantes del ELISAhc desarrollado para la detección de anticuerpos contra *Anaplasma* spp. Para cada uno se muestra la sensibilidad y la especificidad total y la sensibilidad evaluada según los animales estén infectados con *A. marginale* o vacunados con *A. centrale*.

	ELISAhc-m	ELISAhc-c	ELISAhc-cm	ELISAcc v1
Antígeno/punto de corte	tMSP5m (% I >30)	tMSP5c (% I >29)	tMSP5cm (% I >29)	MBP-MSP5m (% I >28)
<b>Total animales (n=644)</b>				
Especificidad (%)	99,5	99,5	99,5	96,3
Sensibilidad (%)	95,5	97,2	96,2	95,5
<b>Infectados (n=255)</b>				
Sensibilidad (%)	97,3	95,6	95,6	95,1
<b>Vacunados (n=173)</b>				
Sensibilidad (%)	93,1	99,4	97,1	96,0



**Figura 10.** Resultados de los porcentajes de inhibición obtenidos por ELISAhc-m (Am), ELISAhc-c (Ac), ELISAhc-cm (Acm) y ELISAcc v1 (C). A) población negativa (G3) (izquierda) y positiva (G1+G2) (derecha) a *Anaplasma* spp. por PCRn y B) población infectada con *A. marginale* (G1) (izquierda) y vacunada con *A. centrale* (G2) (derecha). Los puntos de corte para ELISAcc v1 y ELISAhc se indican con una línea sólida y punteada, respectivamente.

**Tabla 4.** Número y proporción de resultados falsos negativos (FN) y falsos positivos (FP) de muestras de animales infectados con *A. marginale* o vacunados con *A. centrale* (n=428) o no infectados (n=216) obtenidos por ELISAcc v1 y ELISAhc-m.

	Infectados (FN)			No infectados (FP)
	Total (n=428)	<i>A. marginale</i> (n=255)	<i>A. centrale</i> (n=173)	(n=216)
<b>ELISAcc v1 y ELISAhc-m</b>	7 (1,6%)	4 (1,6%)	3 (1,7%)	0 (0,0%)
<b>ELISAcc v1</b>	11 (2,6%)	7 (2,7%)	4 (2,3%)	8 (3,7%)
<b>ELISAhc-m</b>	11 (2,6%)	2 (0,8%)	9 (5,2%)	0 (0,0%)

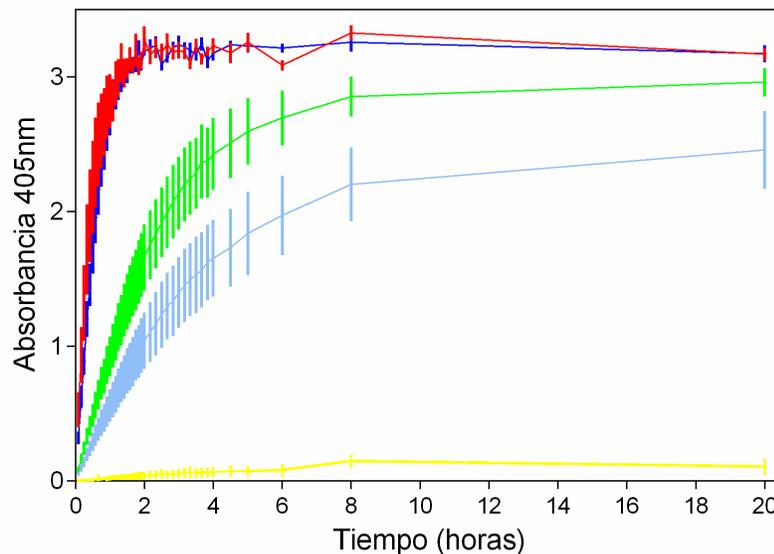
### 1.4.2.2 ELISAdp

El tiempo de lectura de los resultados se evaluó analizando la cinética de la reacción colorimétrica de sueros de animales vacunados e infectados con niveles de anticuerpos bajos y altos. Todas las muestras de suero de los grupos I y III (reacción colorimétrica rápida), se saturaron a la hora de reacción. En cambio en los grupos II y IV (reacción colorimétrica lenta) la intensidad del color aumentó durante las primeras 8 horas y luego permaneció constante durante el tiempo analizado. Los valores de  $DO_{405nm}$  del grupo V (muestras negativas) se mantuvieron bajos y constantes entre las 8 y 20 horas de reacción. La  $DO_{405nm}$  de saturación fue  $\sim 3$ . Estos resultados permitieron establecer el tiempo de lectura del ELISAdp entre las 16 y 20 horas luego del agregado del sustrato cromogénico, cuando la diferencia entre el control negativo y el positivo débil es máxima (Figura 11). La lectura a este tiempo permite una mejor polarización de los resultados positivos y negativos alejándolos del punto de corte.

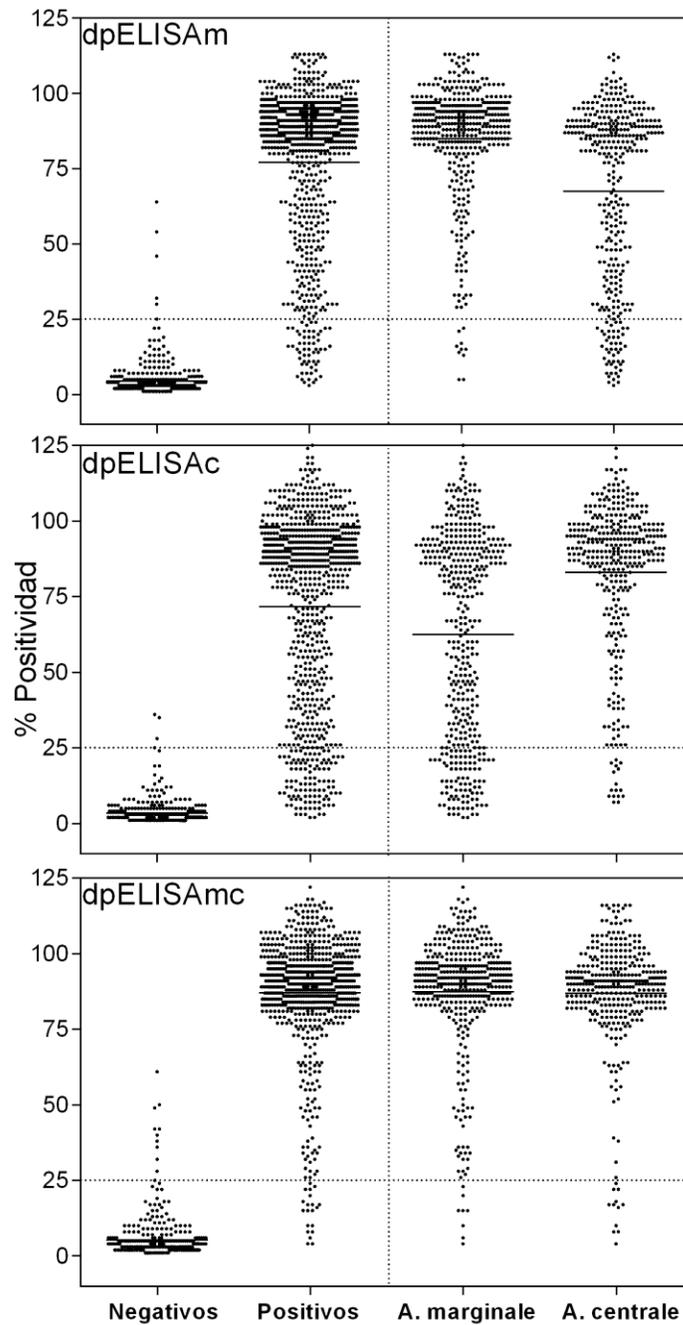
Para las tres variantes del ELISAdp el punto de corte obtenido por el análisis de las curvas ROC utilizando como población negativa el G3 (animales no infectados-no vacunados) y como población positiva el G1 (animales infectados con *A. marginale*) y/o el G2 (animales vacunados con *A. centrale*) fue  $\geq 25$  % P. El G1 se utilizó como población positiva para calcular el punto de corte en el ELISAdp-m, el G2 en el ELISAdp-c, y el G1 y G2 en el ELISAdp-mc. El área bajo la curva ROC fue 0,998, 0,996 y 0,997 para el ELISAdp-m, ELISAdp-c y ELISAdp-mc, respectivamente.

La distribución de los % P de las 1182 muestras de suero, 388 negativos (G3) y 794 positivos para *Anaplasma* spp. (G1 y G2) medidos por ELISAdp-m, ELISAdp-c o ELISAdp-mc se muestra en la Figura 12 (izquierda). La distribución de los % P para los sueros positivos discriminados según provienen de bovinos infectados con *A. marginale* (G1) o vacunados con *A. centrale* (G2) medidos por las tres variantes de ELISAdp, se muestra en la Figura 12 (derecha). Cuando se analizaron las medias de los % P entre el G1 y G2 para el ELISAdp-m y ELISAdp-c se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Las medias y el DE de los % P con el ELISAdp-m fueron  $85 \pm 19$  para el G1 y  $68 \pm 30$  para el G2. Con el ELISAdp-c, fueron  $63 \pm 34$  para el G1 y  $83 \pm 25$  para el G2. El análisis de las medias de los % P entre el G1 y G2 con el ELISAdp-mc no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

Con un punto de corte  $\geq 25\%$  P, la especificidad fue del 98,7% para el ELISAdp-m y el ELISAdp-c, y del 97,4% para el ELISAdp-mc. La sensibilidad general fue del 92,6%, 85,7% y 97,4% para ELISAdp-m, ELISAdp-c y ELISAdp-mc, respectivamente. La sensibilidad más baja se observó para el ELISAdp-c (77,7%) cuando se analizaron los sueros de los bovinos infectados con *A. marginale* seguido del ELISAdp-m (86,3%) cuando se estudiaron los sueros de los bovinos inmunizados con *A. centrale*. Para el ELISAdp-mc se obtuvo una sensibilidad similar cuando se analizaron los grupos de bovinos infectados con *A. marginale* (98,2%) o vacunados con *A. centrale* (96,6%) (Tabla 5). El ELISAdp-mc y el ELISAcc v1 mostraron una tasa de concordancia del 96,3% (94,6%, 99,3% y 95,6% cuando se analizaron los sueros de los animales negativos (G3), infectados con *A. marginale* (G1) o vacunados con *A. centrale* (G2), respectivamente) con un valor kappa de 0,92.



**Figura 11.** Cinética de la reacción colorimétrica medida a 405 nm de muestras de animales con niveles altos y bajos de anticuerpos procesadas por ELISAdp. En rojo y azul se representan las muestras positivas a *A. marginale* y *A. centrale*, respectivamente con reacción colorimétrica rápida (Grupos I y III), en celeste y verde se representan las muestras positivas a *A. marginale* y *A. centrale*, respectivamente con reacción colorimétrica lenta (Grupos II y IV) y en amarillo se representan las muestras negativas (Grupo V).



**Figura 12.** Resultados de los porcentajes de positividad obtenidos por ELISAdp-m, ELISAdp-c y ELISAdp-mc. Animales positivos (G1+G2) y negativos (G3) para *Anaplasma* spp. (izquierda de la imagen) y animales infectados con *A. marginale* (G1) o vacunados con *A. centrale* (G2) (derecha de la imagen). La línea punteada indica el punto de corte y la línea sólida indica la media.

**Tabla 5.** Sensibilidad y especificidad de las tres variantes del ELISAdp para la detección de anticuerpos contra *Anaplasma* spp. Para cada variante de ELISAdp se muestra la sensibilidad y la especificidad total de la prueba y la sensibilidad según la población evaluada esté infectada con *A. marginale* o vacunada con *A. centrale*.

	<b>ELISAdp-m</b>	<b>ELISAdp-c</b>	<b>ELISAdp-mc</b>
<b>Antígeno</b>	<b>tMSP5m</b>	<b>tMSP5c</b>	<b>tMSP5m/tMSP5c</b>
<b>Total animales (n=1182)</b>			
Especificidad (%)	98,7	98,7	97,4
Sensibilidad (%)	92,6	85,7	97,4
<b>Animales infectados (n=436)</b>			
Sensibilidad (%)	97,7	77,7	98,2
<b>Animales vacunados (n=358)</b>			
Sensibilidad (%)	86,3	95,5	96,6

## 1.5 DISCUSIÓN

En este trabajo las formas truncadas de las proteínas MSP5 de *A. marginale* (tMSP5m), MSP5 de *A. centrale* (tMSP5c) y la fusión de ambas (tMSP5cm) se lograron expresar con alto rendimiento, solubilidad y pureza prescindiendo de una proteína chaperona y conservando la inmunorreactividad. La sustitución del antígeno MBP-MSP5m en el ELISAc comercial (ELISAcc v1) por las formas truncadas de MSP5 evaluadas en el ELISAhc (ELISAhc-m, ELISAhc-c, ELISAhc-cm), aumentó la especificidad del ensayo al disminuir las interacciones específicas no deseadas generadas por la MBP. Además, la utilización en el ensayo del antígeno de *A. centrale* (tMSP5c) aumentó la sensibilidad en la detección de animales con anticuerpos de origen vacunal (Primo y col., 2019). Posteriormente se desarrolló un ELISA utilizando un sistema *sandwich* de doble antígeno o ELISA de doble paratope (ELISAdp) <sup>basado</sup> en los antígenos truncados de MSP5. El ELISAdp mostró una *performance* similar al ELISAhc, pero con las ventajas que no utiliza AcM y que posee un menor costo debido a que se desarrolló íntegramente con reactivos de origen nacional.

La proteína MSP5 de *A. marginale* es codificada por un gen de copia única que se encuentra conservado en aislamientos de *A. marginale* de diferentes orígenes geográficos, muestra una alta identidad de secuencia con MSP5 de otras especies de *Anaplasma*, y es inmunodominante; todas características importantes para ser considerada una proteína de elección para el diagnóstico de anaplasmosis (Al-Adhami y col., 2011). Knowles y col., (1996) desarrollaron el ELISAcc v1 basado en la proteína de fusión MBP-MSP5m y en el AcM ANAF16C1, y lo validaron utilizando sueros de bovinos infectados naturalmente con *A. marginale* provenientes de una región endémica para anaplasmosis de EUA. Sin embargo, esta prueba también se utiliza de rutina para detectar anticuerpos contra *A. centrale* aunque su eficacia para tal fin no ha sido validada. En Argentina el ELISAcc v1 se usa para identificar animales portadores de *Anaplasma* spp., para evaluar la estabilidad enzoótica de los rodeos con el fin de establecer la necesidad de vacunación, y para evaluar la respuesta inmune post vacunal (de Echaide y col., 2005; Palacios y col., 2014).

Las proteínas MSP5 de *A. marginale* y *A. centrale* tienen un 91,5% de identidad de secuencia. Esta característica ha permitido la utilización del ELISAcc v1 en la evaluación de la respuesta inmune post vacunal con resultados aceptables. A pesar de esto, los estudios

realizados con ocho AcM producidos previamente en el LIPVet por inoculación de la proteína tMSP5m en ratones, indican que hay epitopes inmunodominantes específicos en la proteína MSP5 de *A. marginale*. Por ELISAi y *Western blot* se determinó que cuatro (50%) de los AcM reconocen epitopes compartidos entre MSP5 de ambas especies, y los otros cuatro (50%) reconocen epitopes exclusivos de *A. marginale*. Estos resultados confirman la presencia de epitopes específicos inmunodominantes en MSP5 de *A. marginale* y sugieren la presencia de epitopes específicos en MSP5 de *A. centrale*.

La solubilidad, estabilidad e integridad estructural de las proteínas recombinantes son requisitos importantes para el uso como antígenos en el desarrollo de una prueba de diagnóstico serológico. Por ese motivo es conveniente la expresión de las proteínas en la fracción soluble en el citoplasma celular. Cuando las proteínas forman agregados (cuerpos de inclusión), estos deben ser solubilizados y las proteínas replegadas a su estructura nativa con el inconveniente de que sólo se recupera una pequeña fracción de la proteína inicial (Singh y Panda, 2005). La expresión de la proteína MSP5 de longitud completa en *E. coli* es muy baja y se produce en forma de cuerpos de inclusión. Se han evaluado distintos reactivos (vectores, cepas bacterianas de expresión) y estrategias (co-expresión con chaperonas, inducción a baja temperatura, composición del medio de cultivo) para optimizar la expresión de la proteína en forma soluble en *E. coli*. Knowles y col., (1996), evitaron la precipitación de MSP5 en cuerpos de inclusión mediante la expresión como proteína de fusión con la molécula chaperona MBP que mejoró la expresión y solubilidad de la proteína recombinante. La MBP ha demostrado ser más eficaz para solubilizar las proteínas asociadas que otras chaperonas comunmente usadas como la GST y la tiorredoxina (Trx) (Kapust y Waugh, 1999). La MBP es una proteína de *E. coli* que participa en el sistema maltosa/maltodextrina. Dada la ubicuidad de *E. coli*, que a menudo es la causa de infecciones entéricas y mamarias en bovinos, es frecuente la presencia de anticuerpos anti-MBP en las muestras de suero (Chung y col., 2014). Por lo tanto, los sueros analizados por ELISAcc v1 basado en MBP-MSP5m requieren una adsorción previa con MBP para evitar falsas reacciones positivas (Knowles y col., 1996). Para eliminar el paso de adsorción, Chung y col., (2014) reemplazaron la MBP por GST y expresaron el antígeno GST-MSP5m en *E. coli*, solubilizándolo en micelas de detergente. La fracción solubilizada se usó en un ELISAcc v2 para detectar anticuerpos contra *A. marginale*. El

reemplazo de MBP-MSP5m por GST-MSP5m mostró mayor especificidad, sensibilidad comparable y mejoró la resolución respecto al ELISAcc v1 (Chung y col., 2014). La eficacia de esta prueba para identificar el ganado vacunado con *A. centrale* no fue evaluada. Ambos ELISAcc (v1 y v2) se desarrollaron en EUA donde *A. centrale* no está presente.

En Argentina y en otros países la cepa vacunal de *A. centrale* se usa en cohortes de terneros de hasta 10 meses de edad en áreas en inestabilidad enzoótica, y en terneros de las zonas libres de anaplasmosis que se moverán a una región endémica (Anziani y col., 1987). En estos países es importante tener en cuenta la presencia de anticuerpos originados por la vacunación con *A. centrale* al momento del desarrollo de pruebas serológicas.

El análisis *in silico* mostró que la condición más favorable para expresar la proteína MSP5 recombinante soluble es sin su región de transmembrana. La clonación y la expresión en *E. coli* de proteínas recombinantes sin la región de transmembrana puede aumentar drásticamente los niveles de expresión y solubilidad (Yang y col., 2014). En este trabajo las proteínas tMSP5m, tMSP5c y tMSP5cm sin la hélice de transmembrana del extremo N-terminal (residuos 1-27), se expresaron en la fracción soluble de *E. coli* y se obtuvieron con una pureza > 90% (Primo y col., 2019).

La inmunorreactividad de los antígenos recombinantes desarrollados fue evaluada con el ELISAhc. El reemplazo de la proteína de fusión MBP-MSP5m utilizada en el ELISAcc v1 por MSP5 truncada en el ELISAhc (ELISAhc-m, ELISAhc-c, ELISAhc-cm), permitió evaluar la antigenicidad de las proteínas recombinantes producidas a la vez que redujo el tiempo de ejecución de la prueba y aumentó la sensibilidad y especificidad para detectar anticuerpos contra *A. marginale* y *A. centrale*. Los nuevos antígenos que carecen de una proteína chaperona, nos permitieron simplificar el protocolo del ELISAcc v1 ya que se evita la etapa de adsorción de los sueros que se utiliza para eliminar la mayoría de las reacciones falso positivas.

En los tres grupos de animales analizados, las tres variantes del ELISAhc mostraron una mejor *performance* que el ELISAcc v1. La mayor especificidad observada para las tres variantes de ELISAhc (99,5%) respecto al ELISAcc v1 (96,3%), fue resultado de la eliminación de la proteína MBP del ensayo evidenciando que, en algunos casos, la adsorción del suero con MBP no es suficiente para evitar la interferencia de los anticuerpos anti-MBP cuando esta proteína forma parte del antígeno (Primo y col., 2019).

Observaciones similares fueron descriptas al comparar los antígenos MBP-MSP5m y GST-MSP5m (Chung y col., 2014).

La sensibilidad del ELISAhc fue idéntica (ELISAhc-m) o superior (ELISAhc-c y ELISAhc-cm) a la alcanzada por el ELISAcc v1. Curiosamente la sensibilidad más alta fue alcanzada por el ELISAhc-c seguida por el ELISAhc-cm, ambos incluyendo el antígeno MSP5 de *A. centrale*. Cuando los resultados de los grupos de bovinos infectados y vacunados se analizaron por separado, la sensibilidad y los valores medios de % I fueron mayores para el ELISAhc que utiliza como antígeno la proteína de la misma especie que originó los anticuerpos. Así, la mayor sensibilidad se obtuvo cuando se evaluó el grupo de animales infectados con *A. marginale* con el ELISAhc-m y el grupo de animales vacunados con *A. centrale* con el ELISAhc-c. Esto está en relación directa con la detección de los anticuerpos dirigidos contra los epitopes inmunodominantes específicos de cada especie. El uso de la proteína de fusión (tMSP5cm) aumentó la sensibilidad general del ELISAhc al mejorar el nivel de detección en el grupo vacunado (Primo y col., 2019).

El ELISA *sandwich* de doble antígeno o ELISA de doble paratope (ELISAdp) se ha utilizado con éxito para detectar bajos niveles de anticuerpos contra varios virus y toxinas incluyendo, circovirus porcino (Ge y col., 2012), virus de la hepatitis B humana (Li y col., 2010), virus de la hepatitis C (He y col., 2011), virus de la hepatitis E (Hu y col., 2008), virus de la influenza A (Watcharatanyatip y col., 2010) y virus de la rabia. En esta prueba los anticuerpos específicos presentes en las muestras de suero se unen al antígeno inmovilizado en la fase sólida por uno de sus sitios de unión al antígeno (paratope). El segundo paratope se une al antígeno soluble biotinilado que va a ser revelado con estreptavidina conjugada con peroxidasa. Al igual que el ELISAc, el ELISAdp tiene potencial para la vigilancia serológica universal; de hecho, puede detectar anticuerpos contra todas las clases de inmunoglobulinas de cualquier especie animal debido a que no hay anticuerpos secundarios involucrados en su diseño (Watcharatanyatip y col., 2010). Sin embargo, la prueba debe ser validada para cada especie y región.

En este trabajo se desarrolló un ELISAdp basado en MSP5 troncada de *A. marginale* (ELISAdp-m), *A. centrale* (ELISAdp-c) y una mezcla equimolecular de ambas (ELISAdp-mc) para detectar anticuerpos contra *Anaplasma* spp.

El ELISAdp-m alcanzó un 97,7% de sensibilidad cuando se estandarizó utilizando sueros de bovinos infectados con *A. marginale*. Sin embargo, este valor disminuyó a 86,3% cuando se evaluó con sueros de bovinos vacunados con *A. centrale*. De forma similar, cuando se usó el ELISAdp-c con sueros de bovinos vacunados con *A. centrale*, la sensibilidad fue de 95,5% y disminuyó a 77,7% cuando se evaluó el mismo antígeno con sueros de bovinos infectados con *A. marginale*. Esta disminución en la sensibilidad fue más notable que la descrita previamente para el ELISAhc (Primo y col., 2019), y pone en evidencia que un sólo antígeno en la prueba no garantizaría una sensibilidad adecuada para detectar anticuerpos contra *Anaplasma* spp. cuando se realizan estudios epidemiológicos en áreas endémicas de anaplasmosis con historia desconocida de vacunación con *A. centrale*.

En el ELISAdp la incorporación simultánea de los dos antígenos (ELISAdp-mc) produjo una sensibilidad global del 97,4% (98,2% correspondiente a la población infectada naturalmente con *A. marginale* y 96,6% a la vacunada con *A. centrale*) y no afectó sustancialmente la especificidad que se mantuvo por encima del 97%. Estos resultados, indican que el ELISAdp-mc sería adecuado para estudiar diferentes situaciones epidemiológicas de anaplasmosis en zonas donde el uso de la vacuna basada en *A. centrale* es una práctica habitual.

El ELISAdp posee la ventaja adicional de mantener la polarización entre el % P de sueros positivos y negativos, incluso en muestras positivas débiles. Esta ventaja estaría asociada con las características intrínsecas del sistema del ELISAdp que permite a los sueros positivos débiles con reacción colorimétrica lenta, alcanzar la saturación (DO) entre 8 y 20 horas después de la adición del sustrato cromógeno. La lectura de las placas en el ELISAdp se realiza luego de 16-20 horas de incubación con el sustrato sin afectarse la especificidad de la prueba ya que el % P de los sueros negativos se mantiene en niveles mínimos.

El ELISAdp al igual que el ELISAhc, y a diferencia del ELISAi y el ELISAcc v1 y v2 cuyos antígenos se basan en proteínas de fusión (GST-MSP5 y MBP/GST-MSP5), se basan en la proteína MSP5 truncada lo que evita la interferencia debida a la presencia de MBP o GST. Estas proteínas de fusión podrían disminuir la especificidad de la prueba por la presencia de anticuerpos contra la proteína chaperona o disminuir la sensibilidad por

esconder epitopes importantes del antígeno debido a un impedimento estérico (Chung y col., 2014; Primo y col., 2019).

De manera similar al ELISAc, el ELISAdp tiene el potencial de ser utilizado para la determinación de anticuerpos de diferentes isotipos y en diferentes especies animales ya que no están involucrados anticuerpos secundarios en la prueba. Recientemente el ELISAcc v2 ha sido validado para la determinación de anticuerpos contra *A. ovis* en ovejas domésticas (Mason y col., 2017). Esto indica que MSP5 de *A. marginale* es un buen antígeno para la determinación de anticuerpos contra esta especie, por lo tanto, el ELISAdp también sería efectivo para detectarlos, aunque esta hipótesis debe ser demostrada.

La *performance* del ELISAdp fue mejor que la reportada para el ELISAi (Morzaria y col., 1999) y similar a la reportada para el ELISAcc v1 y v2 (Knowles y col., 1996; Chung y col., 2014), únicos *kits* disponibles comercialmente. Una ventaja del ELISAdp es que no utiliza como reactivos anticuerpos secundarios ni monoclonales, por lo tanto, el uso de animales de laboratorio no es necesario. Todos los reactivos que involucran el uso de animales de laboratorio en alguna etapa de su generación, han sido reemplazados en el diseño del ELISAdp; un aspecto relevante alentado por todos los comités de ética para el bienestar animal (Hovell, 2013).

En conclusión:

1. La clonación de las proteínas MSP5 truncadas permitió la purificación de antígenos solubles prescindiendo de chaperonas moleculares. La utilización de estos antígenos en dos diseños de ELISA, mejoró la especificidad de los *tests* al eliminar la interferencia de los anticuerpos presentes en los sueros contra la proteína chaperona.
2. La incorporación del antígeno de *A. centrale* en los dos diseños de ELISA, permitió aumentar la sensibilidad del ensayo cuando se evaluó la inmunidad post vacunal. Por lo tanto, se desarrollaron técnicas eficientes y adaptadas para determinar la situación epidemiológica frente a la anaplasmosis en rodeos de nuestro país y la región, donde la vacunación con *A. centrale* es una herramienta común para la prevención de la anaplasmosis bovina.

3. El desarrollo del ELISAdp permitió la evaluación serológica de la anaplasmosis utilizando únicamente reactivos de origen nacional, disminuyendo los costos de diagnóstico. Además, al prescindir de anticuerpos como reactivos se evitó el uso de animales de laboratorio.

CAPÍTULO II  
PREVENCIÓN

---

## 2.1 INTRODUCCIÓN

Actualmente la prevención de la anaplasmosis en las regiones endémicas de Argentina y en otras zonas del mundo como Israel, África, Australia y varios países de América Latina, se basa en la utilización de una vacuna viva producida mediante la multiplicación de *A. centrale* en terneros esplenectomizados. *A. centrale* es una especie naturalmente menos patógena que confiere inmunidad cruzada parcial contra *A. marginale*. Esto se debe a que ambas especies comparten epitopes inmunodominantes (Shkap y col., 1991) y la variación antigénica de MSP2 que se produce durante las infecciones persistentes de *A. centrale* es similar a la de *A. marginale* (Shkap y col., 2002a). Además, los epitopes de MSP2 reconocidos por los linfocitos T CD4+ son conservados entre las dos especies, lo que puede contribuir a la protección cruzada de la vacuna viva de *A. centrale* (Shkap y col., 2002b).

En Argentina la vacuna viva de *A. centrale* es la única autorizada por el SENASA para la prevención de la anaplasmosis. Se elabora en las Estaciones Experimentales Agropecuarias (EEA) del INTA Rafaela (Santa Fe) y Mercedes (Corrientes), se comercializa en forma refrigerada y se aplica en una única dosis en bovinos de hasta 10 meses de edad. Sin embargo, esta vacuna presenta algunas desventajas como la multiplicación en animales vivos, el riesgo de transmisión de otros patógenos, la breve vida útil (7 días con estricta cadena de frío) y la posibilidad de generar reacciones clínicas severas en animales adultos lo que limita su aplicación a terneros de entre 4-10 meses de edad. También se ha observado que la protección inmune que induce en algunos bovinos y en determinadas razas, es insuficiente cuando son desafiados por cepas silvestres de *A. marginale* no logrando impedir la ocurrencia de casos clínicos de anaplasmosis. En algunos países de África, Latinoamérica y en EUA, las cepas de *A. marginale* tienen una gran diversidad genética que se corresponde con una elevada proporción de cepas virulentas capaces de provocar formas severas de la enfermedad con niveles de mortalidad que pueden alcanzar el 50% (de la Fuente y col., 2007). A nivel de campo y de laboratorio, se han registrado fallas en las vacunas de *A. centrale* (Brizuela y col., 1998; Guglielmone y Vanzini, 1999) y se ha informado que la cepa vacunal causa anaplasmosis grave en bovinos esplenectomizados y en adultos, siendo las vacas lecheras de alto rendimiento las más afectadas (Pipano y col., 1985). En un estudio realizado en Australia (Bock y de Vos,

2001), el uso de la vacuna viva parecía estar justificado porque, aunque la respuesta bovina era variable, la protección contra la exposición era adecuada para prevenir la enfermedad en la mayoría de los casos. Sin embargo, los autores advirtieron que esta vacuna podría no brindar protección contra poblaciones de *A. marginale* antigenicamente diversas y altamente virulentas en otras partes del mundo.

La gran diversidad genética de *Anaplasma* spp. y la gran variabilidad antigénica que ocurre durante la infección, dificultan el desarrollo de una vacuna sintética efectiva para la prevención de la enfermedad. Actualmente la secuenciación del genoma completo y los avances en el conocimiento de la genómica y proteómica de *A. marginale*, nos proporcionan las herramientas para diseñar una vacuna más segura y eficiente basada en proteínas recombinantes. El éxito de una nueva vacuna dependerá de la capacidad para imitar o redirigir la respuesta del huésped durante la infección natural o bloquear la infección de las células huésped (Kocan y col., 2003). Investigaciones recientes han proporcionado mucha información sobre la naturaleza de la respuesta inmune del bovino a la infección por *A. marginale*, así como la definición de los antígenos clave que parecen jugar un papel en la respuesta inmune.

*A. marginale* ha desarrollado mecanismos únicos para persistir en el huésped que incluyen: la pérdida de lipopolisacáridos y peptidoglicanos que activan los mecanismos de defensa innatos, el establecimiento de la infección en el eritrocito (célula no fagocítica que carece de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad) y una extensa variación antigénica en proteínas de su superficie (MSP2 y MSP3) que le permite evadir la respuesta inmune adaptativa (Brown, 2012).

La inmunización de bovinos con la membrana externa purificada de *A. marginale*, previno la infección y la enfermedad clínica cuando los animales fueron expuestos a un desafío con una cepa homóloga (Tebele y col., 1991; Brown y col., 1998a; Noh y col., 2008). Si bien este inmunógeno es complejo, difícil de formular e inapropiado para la producción masiva (Brown y col., 1998a), se pudo determinar que la inmunidad protectora contra *A. marginale* requiere de la inducción de altos niveles de anticuerpos, especialmente IgG2, dirigidos contra epitopes de superficie y de la activación de macrófagos para la opsonización y destrucción microbiana (Palmer y col., 1999). El centro de este modelo son las células T CD4+ que expresan interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), lo que estimula la síntesis de

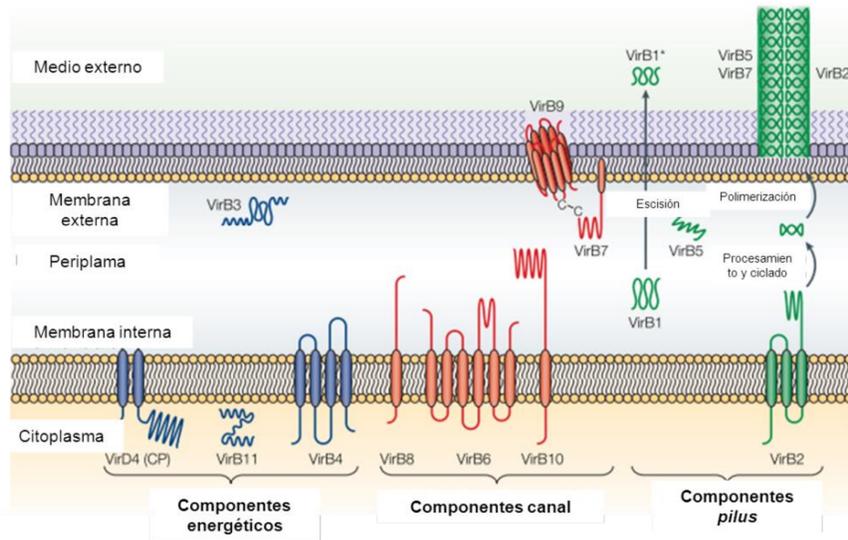
IgG2 y activa a los macrófagos los cuales aumentan la expresión de receptores, la fagocitosis, la fusión fagolisosomal y la liberación de óxido nítrico (Potgieter y Stoltz, 2004).

Se han realizado ensayos con vacunas recombinantes utilizando las MSPs (Abbott y col., 2005; Brayton y col., 2006; Noh y col., 2010) o el virus vaccinia recombinante expresando antígenos de *A. marginale* (McGuire y col., 1994) sin lograr recrear la protección generada por la membrana externa. Esto indica que probablemente se requiere de una combinación de varios antígenos para lograr una respuesta inmune protectora eficiente.

Debido a que las MSPs inmunodominantes no resultaron protectoras, actualmente el desarrollo de vacunas para anaplasmosis está enfocado en la identificación de proteínas de membrana subdominantes las cuales representan una pequeña proporción del proteoma de *A. marginale*, permanecen invariantes durante la infección y están altamente conservadas entre cepas. Las proteínas que reúnen estas características son atractivas como posibles candidatas para el desarrollo de vacunas (Lopez y col., 2005; 2008).

Entre los antígenos subdominantes identificados en la membrana externa de *A. marginale*, se encuentran las proteínas del sistema de secreción tipo IV (T4SS). El T4SS es un complejo de proteínas de 1.1-MDa que atraviesa la membrana bacteriana interna y externa, ampliamente estudiado en *Agrobacterium tumefaciens* (Christie y col., 2005; Backert y Meyer, 2006) (Figura 13). Está formado por proteínas de membrana VirB/D que interactúan, varias de las cuales están expuestas en la superficie y, por lo tanto, son blanco para la neutralización y las respuestas inmunitarias protectoras (Christie y col., 2005).

La función del T4SS en *A. marginale* no se ha determinado, pero la retención de estos genes en el pequeño genoma del patógeno indica su requerimiento para la invasión y supervivencia dentro de los eritrocitos y/o las células de garrapata (Brown, 2012). Debido a que los organismos de la familia Anaplasmataceae carecen de lipopolisacáridos, muchas proteínas del T4SS pueden estar expuestas a la superficie donde podrían ser reconocidas por anticuerpos neutralizantes. De hecho varias de estas proteínas expresadas en forma recombinante, han sido reconocidas por anticuerpos presentes en los sueros de animales inmunizados protectivamente con la membrana externa (Lopez y col., 2007; 2008; Suttén y col., 2010).



**Figura 13.** Componentes del sistema de secreción tipo IV (T4SS). Adaptado de Cascales y Christie, 2003.

Las proteínas VirB9.1, VirB9.2 y VirB10 son las más inmunogénicas del T4SS (Lopez y col., 2007; Morse y col., 2011). Forman canales que median la transferencia de proteínas, ADN o complejos proteína-ADN con otras bacterias o con la célula hospedadora (Christie y col., 2005). Estimulan la proliferación de linfocitos T CD4+, la secreción de IFN- $\gamma$  y la producción de IgG2 en bovinos inmunizados con la membrana externa, respuestas asociadas con la inmunidad protectora (Lopez y col., 2007; Morse y col., 2011). Están altamente conservadas entre distintas cepas de *A. marginale* y, además, hay evidencia de que interactúan en la membrana (Morse y col., 2011; 2012).

El factor de elongación Tu (Ef-Tu) se identificó como una proteína asociada a la pared celular. En algunos microorganismos interviene en la síntesis de proteínas en el citoplasma celular bacteriano mientras que, en otros, se localiza en la superficie y participa en la interacción bacteria-célula huésped (Christie y col., 2005). El Ef-Tu fue reconocido por IgG2 de animales naturalmente infectados con *A. marginale* (Araújo y col., 2008) y estimuló la proliferación de células T y la producción de IgG2 en animales inmunizados con la membrana externa (Lopez y col., 2005; 2008).

VirB11 es una ATPasa que podría estar involucrada en la producción de energía utilizada para facilitar el traslado de moléculas o el ensamblaje del complejo T4SS (Berger y Christie, 1994; Christie y col., 2005). Se localiza en el citoplasma bacteriano o en el

espacio periplásmico entre las membranas interna y externa, y se encontró asociada con VirB9 en ensayos que identifican interacciones proteína-proteína (Cascales y Christie, 2003). VirB11 no fue reconocida por los sueros de animales inmunizados con la membrana externa de *A. marginale*, debido probablemente a no estar altamente expuesta a las células B, pero demostró estimular la respuesta de células T (Sutten y col., 2010).

Las proteínas pertenecientes al T4SS han sido postuladas por varios autores como potenciales candidatas para el desarrollo de una vacuna recombinante para *A. marginale* debido a que son subdominantes, altamente conservadas entre cepas, y han sido reconocidas por sueros de animales inmunizados protectivamente con la membrana externa (Lopez y col., 2007; Sutten y col., 2010). Sin embargo, nunca fueron evaluadas en bovinos para determinar su eficacia protectora. Es por eso que, en este trabajo, se evaluó la respuesta inmune y la capacidad protectora frente al desafío con una cepa de *A. marginale*, de dos formulaciones de inmunógenos compuestas por las proteínas VirB9.1, VirB9.2, VirB10, VirB11 y Ef-Tu, expresadas en forma recombinante en *E. coli*, con los adyuvantes Montanide™ ISA 201 (Seppic Inc., Francia) y Quil A® (Brenntag, Denmark).

Los adyuvantes tienen efectos significativos sobre la naturaleza de la respuesta inmune y pueden inclinar el sistema inmunitario a favor de respuestas tipo Th1 o Th2 (Sun y col., 2009). El adyuvante ideal es el que genera una respuesta inmune potente, persistente, de calidad y específica contra un antígeno particular, además de carecer de toxicidad. Uno de los criterios más importantes para la selección de un adyuvante es su mecanismo de acción en relación al tipo de respuesta inmune adaptativa que induce, es decir, una respuesta celular o una respuesta humoral a través de la estimulación respectiva de linfocitos CD4+ Th1 o CD4+ Th2 (Kenney y Edelman, 2000).

Las saponinas son glucósidos naturales de esteroides o triterpenos que exhiben muchas acciones biológicas y farmacológicas tales como: inmunomoduladoras, antitumorales, antiinflamatorias, molusquicidas, antivirales, antifúngicas, hipoglucemiantes e hipocolesterolémicas (Sparg y col., 2004). En particular, las saponinas también pueden activar el sistema inmune de los mamíferos lo que descarta el potencial como adyuvantes para vacunas. Los adyuvantes basados en saponinas más utilizados son Quil A y sus derivados QS-21 aislados de la corteza de *Quillaja saponaria* Molina (Sun y col., 2009). La capacidad de Quil A y QS-21 para estimular tanto la respuesta inmune Th1 y la generación

de anticuerpos como la producción de linfocitos T citotóxicos contra antígenos exógenos, los hace ideales para el uso en vacunas dirigidas contra patógenos intracelulares (Sun y col., 2009).

Montanide ISA 201 es una emulsión de agua en aceite. Las emulsiones agua en aceite son capaces de inducir respuestas inmunes celulares potentes. Los Montanides poseen características físicas similares al adyuvante incompleto de Freund pero se caracterizan por ser biodegradables (Aucouturier y col., 2006). Han sido utilizados en ensayos de vacunas contra malaria, VIH y cáncer e inducen una respuesta inmune potente (Kenney y Edelman, 2003).

Basado en estos antecedentes, a través de este trabajo se propone probar la siguiente hipótesis: el inmunógeno compuesto por las proteínas recombinantes VirB9.1, VirB9.2, VirB11, VirB10 y Ef-Tu es una herramienta eficaz para la prevención de la anaplasmosis bovina en animales adultos.

## **2.2 OBJETIVOS**

### **2.2.1 *Objetivo general***

Desarrollar un inmunógeno recombinante para la prevención de la anaplasmosis bovina que pueda aplicarse en animales adultos.

### **2.2.2 *Objetivos específicos***

1. Clonar, expresar en *E. coli* y purificar las proteínas VirB9.1, VirB9.2, VirB11, VirB10 y Ef-Tu, pertenecientes T4SS de *A. marginale*, para utilizar como antígenos en la formulación del inmunógeno.
2. Evaluar la respuesta inmune humoral y celular generada por el inmunógeno en bovinos y la capacidad protectora frente al desafío con una cepa de *A. marginale*.

## 2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.3.1 Producción de los antígenos

#### 2.3.1.1 Análisis *in silico* de las proteínas

Las secuencias de ADN codificantes para las proteínas VirB9.1, VirB9.2, VirB11, VirB10 y Ef-Tu fueron extraídas del *GeneBank*. La predicción del péptido señal se realizó con el algoritmo SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). La predicción de las hélices de transmembrana (HTM) y la solubilidad en *E. coli* de las proteínas de longitud completa y truncada (sin HTM) se realizó utilizando los servidores descritos en 1.3.2.1.

#### 2.3.1.2 Clonado de las proteínas

Las proteínas VirB9.1 y VirB9.2 se clonaron y expresaron en forma truncada sin el péptido señal (VirB9.1t y VirB9.2t). Los *primers* utilizados (Tabla 6) se diseñaron para amplificar por PCR los ADNc que codifican para los residuos 22-272 de VirB9.1, 27-281 de VirB9.2 y las secuencias completas de VirB10, VirB11 y Ef-Tu. En el *primer reverse*, se agregó la secuencia que codifica para una cola de 6 histidinas (His-tag) en el extremo C-terminal de VirB9.2t, VirB10, VirB11 y Ef-Tu. El clonado se realizó siguiendo la metodología descrita en 1.3.2.2.

**Tabla 6.** Lista de *primers*. Subrayadas se muestran las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Nde*I y en cursiva la secuencia que codifica para la cola de histidinas.

Proteína	<i>Forward primer</i> (5' 3')	<i>Reverse primer</i> (5' 3')
VirB9.1t	<u>catatg</u> caggaaccgcgctctatag	<u>ggatcctt</u> aaaccacgtccccttctggatg
VirB9.2t	<u>catatg</u> gtaagcgggtggtg	<u>ggatcctc</u> agtgatggtgatggtgatggcgcctcaattttaaaagcaccg
VirB11	<u>catatg</u> acagcaggatacgcagcgttag	<u>ggatcc</u> ctagtgatggtgatggtgatgtttaaatcattgccttgtaacatttagtg
VirB10	<u>catatg</u> tcagacgaaaccaagataataac	<u>ggatcc</u> ctagtgatggtgatggtgatgtttaaactacgcaccgcctccc
Ef-Tu	<u>catatg</u> acagaagggagaaagcc	<u>ggatcc</u> ctagtgatggtgatggtgatgtttaaactcaaaatctcagttatg

### 2.3.1.3 Expresión y purificación de las proteínas

El protocolo de expresión de todas las proteínas se realizó siguiendo la metodología descrita en 1.3.2.3.

La purificación de VirB9.1t y Ef-Tu se realizó en condiciones nativas a partir de la fracción soluble del lisado de *E. coli*.

Ef-Tu se purificó por pseudoafinidad con una columna de NTA-Ni<sup>2+</sup> siguiendo la metodología descrita en 1.3.2.3.

VirB9.1t se precipitó con 30% de sulfato de amonio saturado durante 20 min en hielo. La proteína precipitada se separó del sobrenadante por centrifugación (12.000 x g, 20 min, 4 °C) y se dializó en *buffer* A (Tris-ClH 25 mM, pH 7,2). Finalmente se purificó en *batch* por cromatografía de intercambio iónico utilizando una resina *Q-sepharose* (GE Healthcare, EUA) equilibrada con el mismo *buffer*. La resina se lavó con cinco volúmenes de *buffer* A con NaCl 50 mM y luego se eluyó la proteína con cinco volúmenes de *buffer* A con NaCl 200 mM.

Las proteínas VirB9.2t, VirB10 y VirB11 se expresaron en cuerpos de inclusión y se purificaron en condiciones desnaturalizantes. Los cuerpos de inclusión se obtuvieron de la fracción insoluble del lisado de *E. coli* y se lavaron tres veces con *buffer* de lavado (Tris 50 mM, EDTA 5 mM, DTT 5 mM, pH 8) con el agregado de Triton X-100 1% en el primer lavado, Triton X-100 2% en el segundo y urea 2 M en el tercero. Finalmente, se realizaron dos lavados con agua ultrapura. Luego de cada lavado las proteínas se centrifugaron (12.000 x g, 15 min, 20 °C) y el sobrenadante se descartó.

La solubilización de los cuerpos de inclusión se realizó por incubación (3 horas, 25 °C) en *buffer* B (fosfato de sodio 100 mM, urea 8 M, β-mercaptoetanol 5 mM, pH 8) para VirB10 y VirB11 y en *buffer* C (fosfato de sodio 100 mM, cloruro de guanidinio 6 M, β-mercaptoetanol 5 mM, pH 8) para VirB9.2t. Luego se centrifugó (12.000 x g, 30 min, 20 °C) y la fracción soluble obtenida se incubó con 2 ml de resina de NTA-Ni<sup>2+</sup> (Quiagen, Germany) previamente equilibrada con el *buffer* correspondiente. Finalmente la suspensión se colocó en columnas de 1,5 cm x 5 cm y se lavó con cinco volúmenes de *buffer* B con imidazol 30 mM. La elución de las proteínas se realizó con cinco volúmenes de *buffer* B con imidazol 200 mM.

La movilidad electroforética de las proteínas y la presencia de productos de degradación en la fracción purificada, se evaluaron por SDS-PAGE y por WB con un AcM anti-His-tag. La membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot® 0,45 µm, Bio-Rad) luego de la transferencia de las proteínas a 50 V durante 2 horas, se bloqueó con TBS/5% leche descremada durante toda la noche a 4 °C. Luego de cuatro lavados con TBST, se incubó durante 1 hora con el AcM de ratón anti-His-tag (MA1-21315, Thermo Fisher Scientific) diluido 1:2000 en TBST/3% leche descremada. Se realizaron cuatro lavados con TBST y se incubó con un suero policlonal anti-ratón IgG-HRP (Jackson ImmunoResearch) en la misma dilución. La reacción se reveló con DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La concentración de las proteínas puras se determinó por medición de la absorbancia a 280 nm y la utilización del coeficiente de extinción molar teórico de cada proteína ( $\epsilon_{280\text{nm}}$ ) (25600 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, 26360 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, 11710 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, 25900 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> y 26025M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> para VirB9.1t, VirB9.2t, VirB10, VirB11y Ef-Tu, respectivamente).

## 2.3.2 Inmunización y desafío

### 2.3.2.1 Animales

Se utilizaron 20 novillos *Hosltein* de 2 años de edad para la evaluación de la vacuna y un ternero esplenectomizado de 4 meses de edad para la multiplicación de *A. marginale*. Todos los animales provinieron de un rodeo libre de anaplasmosis localizado en una zona libre de la garrapata *R. microplus* (Rafaela [31°11'S-61°30'O], Santa Fe). Durante el experimento los animales se mantuvieron aislados en corrales alejados del rodeo restante, provistos de agua y alimento *ad libitum*. Se les aplicó semanalmente flumetrina *pour-on* para mantenerlos libres de moscas.

Antes del comienzo del experimento se confirmó el estatus de los animales frente a anaplasmosis mediante ELISAhc-cm (Primo y col., 2019) y PCRn para *A. marginale* y *A. centrale* (Molad y col., 2006).

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (Protocolo N° 243/15).

### 2.3.2.2 Inmunización

Los novillos fueron aleatoriamente distribuidos en cuatro grupos (G) de cinco animales cada uno (n=5).

Se prepararon dos formulaciones de inmunógenos basadas en una mezcla de las proteínas recombinantes (VirB9.1t, VirB9.2t, VirB10, VirB11 y Ef-Tu) con los adyuvantes I) Montanide™ ISA 201 (Seppic Inc., Francia) y II) Quil A® (Brenntag, Denmark). Los respectivos adyuvantes diluidos en PBS se usaron como control.

Cada grupo fue vacunado con la siguiente formulación:

- ✓ G1: 50 µg de cada proteína recombinante en PBS/Quil A (1 mg/ml).
  - ✓ G2: 50 µg de cada proteína recombinante en PBS/Montanide 50/50 v/v.
  - ✓ G3: PBS/Quil A (1 mg/ml).
  - ✓ G4: PBS/Montanide 50/50 v/v.
- } controles

El volumen final de cada dosis fue de 2 ml. Los animales de cada grupo recibieron cuatro dosis de la vacuna correspondiente por vía SC en la región del cuello a intervalos de 21 días (días 0, 21, 42, 63). Los novillos se sangraron al comienzo del experimento y luego semanalmente durante diez semanas. Las muestras de sangre y suero se almacenaron a -20 °C.

### 2.3.2.3 Desafío

Para el desafío se utilizó un aislamiento de *A. marginale* obtenido de un brote de anaplasmosis en el norte de Argentina, provincia de Salta (de la Fuente y col., 2007). La sangre de un animal infectado se crioconservó y previo al desafío se multiplicó en un ternero esplenectomizado (Abdala y col., 1990). Cuando la parasitemia del ternero alcanzó el 5%, se recogió asepticamente sangre con citrato de sodio al 5% y se utilizó inmediatamente para el desafío de los novillos. El desafío se realizó el día 105 luego del comienzo del experimento, por inyección vía SC de una dosis de  $10^7$  eritrocitos frescos parasitados con *A. marginale* en un volúmen final de 2 ml por dosis.

La reacción clínica al desafío se evaluó diariamente durante 40 días post desafío (dpd), comenzando a partir de los 10 dpd, por medición de la temperatura corporal (T), del porcentaje de hematocrito (HTO) por la técnica del micro-hematocrito y del porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP) en frotis de sangre teñidos con Giemsa. Los parámetros

fijados para aplicar tratamiento a los animales (20 mg/kg de oxitetraciclina, Terramicina® LA, *Pfizer*) y evitar su muerte fueron: HTO  $\leq 15\%$ , PEP  $\geq 5$  y/o 3 días de T  $\geq 41$  °C.

Los parámetros clínicos de cada grupo se expresaron como la media del máximoporcentaje de descenso del HTO, la media del máximo PEP y la media de la T acumulada por encima de 39,5 °C. Los novillos se sangraron semanalmente durante cinco semanas post desafío y las muestras se analizaron por ELISAhc-cm y PCRn.

### 2.3.3 Evaluación de la inmunidad

#### 2.3.3.1 Evaluación de la respuesta inmune humoral

La evaluación de la respuesta inmune humoral se realizó a través de la determinación de IgG total (IgGT), IgG1 e IgG2 anti VirB9.1t, VirB9.2t, VirB10, VirB11 y Ef-Tu. La determinación de IgGT se realizó por ELISAi y WB, y la de los isotipos sólo por ELISAi.

La determinación por ELISAi de IgGT y de los isotipos IgG1 e IgG2 se realizó a los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 y 70 luego de la aplicación de la primera dosis de la vacuna y a los 35 dpd. Placas de 96 pocillos (*Nunc Polysorp*) se tapizaron individualmente con 100  $\mu$ l de cada antígeno (0,5  $\mu$ g/pocillo) diluido en PBS e incubaron a 4 °C durante toda la noche. Luego de tres lavados con PBS, se bloquearon con 300  $\mu$ l de solución de bloqueo durante 1 hora. Para la determinación de IgGT, las placas se lavaron tres veces con PBST y se incubaron durante 1 hora con 100  $\mu$ l de suero diluido 1:10 en PBST/3% leche descremada. Luego de cuatro lavados con PBST, se colocaron 100  $\mu$ l de un suero policlonal anti-bovino IgG-HRP (A5295 Sigma-Aldrich) diluido 1:2000 en PBST/10% leche descremada y las placas se incubaron durante 1 hora. Finalmente se agregaron 100  $\mu$ l de ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El color de la reacción se midió a 405 nm en un lector de placas de ELISA. Los resultados se expresaron en DO. El punto de corte para cada antígeno se determinó como la media de DO<sub>405nm</sub> de las muestras negativas (día 0) + 3 DE.

Para la detección de los isotipos se usó el mismo protocolo con algunas modificaciones: las muestras de suero se diluyeron 1:20 y la identificación de los isotipos se realizó por adición de un AcM de ratón anti-IgG1 bovina (MCA627 Serotec<sup>TM</sup>, UK) o anti-IgG2 bovina (B8400 Sigma-Aldrich) diluidos 1:200. Cada suero fue evaluado simultáneamente con ambos AcM en la misma placa. Como anticuerpo secundario se utilizó un suero policlonal anti-ratón IgG-HRP (Jackson ImmunoResearch) diluido 1:1000.

Todas las muestras y controles se analizaron por duplicado.

La determinación por WB de IgGT se realizó el día 28 luego de la aplicación de la primera dosis de la vacuna en los animales de los grupos inmunizados (G1 y G2). Las proteínas VirB9.1t, VirB9.2t, VirB10, VirB11 y Ef-Tu purificadas (0,5 ug) luego de la separación electroforética por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Trans-Blot® 0,45 µm, Bio-Rad). Las membranas se bloquearon por incubación con TBS/10% leche descremada a 4 °C durante toda la noche y, luego de tres lavados con TBST, se incubaron con una dilución 1:100 de cada suero en TBST/3% leche descremada durante 1 hora. Los sueros se adsorbieron previamente con un lisado de *E. coli*. Luego de cuatro lavados con TBST, la presencia de anticuerpos se determinó por incubación de la membrana durante 1 hora con un suero policlonal anti-bovino IgG-HRP (A5295 Sigma-Aldrich) a una dilución de 1:1000 en TBST/3% leche descremada. La reacción se reveló con DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 2.3.3.2 Evaluación de la respuesta inmune celular

La respuesta inmune celular se evaluó por medición, a través de ELISA comerciales, de las citoquinas INF-γ e IL-4 el día 7 luego de la aplicación de la cuarta dosis de la vacuna. Se extrajeron asepticamente 20 ml de sangre con EDTA de la vena yugular de cada animal. Las PBMC se aislaron utilizando Ficoll-Paque™ PLUS (densidad 1,077 g/ml) (GE Healthcare Bio-Sciences AB) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se resuspendieron en medio RPMI (Gibco) suplementado con suero fetal bovino 5%, glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 100 µg/ml y anfotericina 0,25 µg/ml.

La estimulación *in vitro* de las PBMC se realizó por triplicado en placas de 24 pocillos colocando 10<sup>6</sup> células/pocillo en un volumen final de 1 ml/pocillo con el agregado de: i) una mezcla de 5 µg/ml de cada proteína recombinante, ii) concanavalina A (ConA) 5 µg/ml como control positivo, y iii) medio de cultivo como control negativo. Las placas se incubaron a 37 °C en atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> durante 72 horas, y los sobrenadantes se extrajeron e inmediatamente se realizó la medición de IFN-γ (Bovine Interferon-γ Specific ELISA Assay Kit MCA5638KZZ BIO-RAD) e IL-4 (Bovine IL-4 ELISA Reagent Kit

ESS0031 Thermo Scientific) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. La concentración de citocinas (pg/ml) se determinó por interpolación con la curva estándar.

#### **2.3.4 Análisis estadístico**

El análisis de datos se realizó utilizando el *software* InfoStat (Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina). Los niveles de anticuerpos contra las proteínas recombinantes se compararon entre los grupos a través de un Modelo Lineal Generalizado de medidas repetidas con distribución Gamma como función de enlace, considerando la distribución de frecuencia de la variable de respuesta. Las medias post desafío de los parámetros clínicos (HTO, PEP, T) al momento de la aplicación del tratamiento antibiótico y de los valores máximos alcanzados, se compararon entre los grupos mediante un análisis de la varianza (ANOVA). Las diferencias en las medias de anticuerpos anti-MSP5 (% I) entre los grupos inmunizados y los grupos control a diferentes días post desafío, se establecieron a través del *test* de Mann Whitney. Todos los análisis estadísticos se consideraron significativos con un nivel de  $p < 0,05$ .

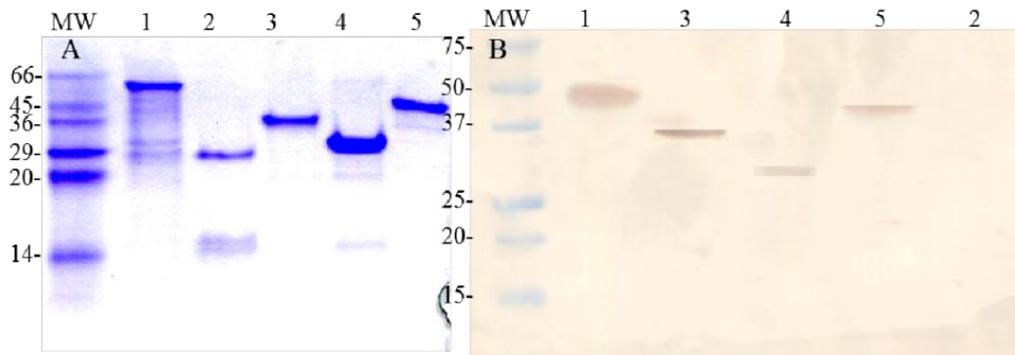
## 2.4 RESULTADOS

### 2.4.1 Producción de los antígenos

El análisis *in silico* predijo la presencia de un péptido señal en las secuencias de las proteínas VirB9.1 y VirB9.2 con un sitio de escisión entre los residuos 20-21 y 25-26, respectivamente. En VirB10, VirB11 y Ef-Tu no predijo péptido señal. El análisis de la estructura primaria realizado a través del TMpred identificó una HTM en el extremo N-terminal de VirB9.1 (residuos 4-22) y de VirB9.2 (residuos 7-27) y de dos HTM en VirB10 (residuos 33-51 y 343-361). En VirB11 y Ef-Tu no identificó HTM. La solubilidad inferida para las proteínas que contienen regiones hidrofóbicas, VirB9.1, VirB9.2 y VirB10, fue 38,7, 100 y 0 %, respectivamente. La solubilidad inferida de VirB9.1 se incrementó al 98,7% con la secuencia truncada (residuos 22-272). La eliminación de la región hidrofóbica de VirB9.2 y VirB10 no modificó la predicción del porcentaje de proteína soluble.

Las proteínas VirB10, VirB11 y Ef-Tu se expresaron con su secuencia completa, mientras que VirB9.1 y VirB9.2 se expresaron en forma truncada sin el péptido señal (VirB9.1t y VirB9.2t). VirB9.1t y Ef-Tu se lograron expresar en forma soluble en el citoplasma de *E. coli*. La cantidad de proteína purificada por litro de cultivo fue 20 y 15 mg, respectivamente. VirB9.2t, VirB10 y VirB11 se expresaron en cuerpos de inclusión en *E. coli* y, luego de su purificación en condiciones desnaturalizantes, el rendimiento fue 20, 10 y 12 mg por litro de cultivo, respectivamente.

Las proteínas purificadas evaluadas por SDS-PAGE mostraron un patrón de migración de bandas de 28, 29, 49, 38 y 44 kDa para VirB9.1t, VirB9.2t, VirB10, VirB11 y Ef-Tu, respectivamente. La migración de todas las proteínas coincidió con el peso molecular estimado para cada una (Figura 14A). Por WB todas las proteínas, a excepción de VirB9.1t que carece del epítopo His-tag, reaccionaron con el AcM anti-His-tag (Figura 14B).



**Figura 14.** Evaluación de las proteínas del T4SS de *A. marginale* purificadas. (A) SDS-PAGE teñido con *Coomassie Brilliant Blue R-250* (B) *Western blot* revelado con el AcM anti-His-tag. MW: marcador de peso molecular (kDa). Calle 1: VirB10, calle 2: VirB9.1t, calle 3: VirB11, calle 4: VirB9.2t, calle 5: Ef-Tu.

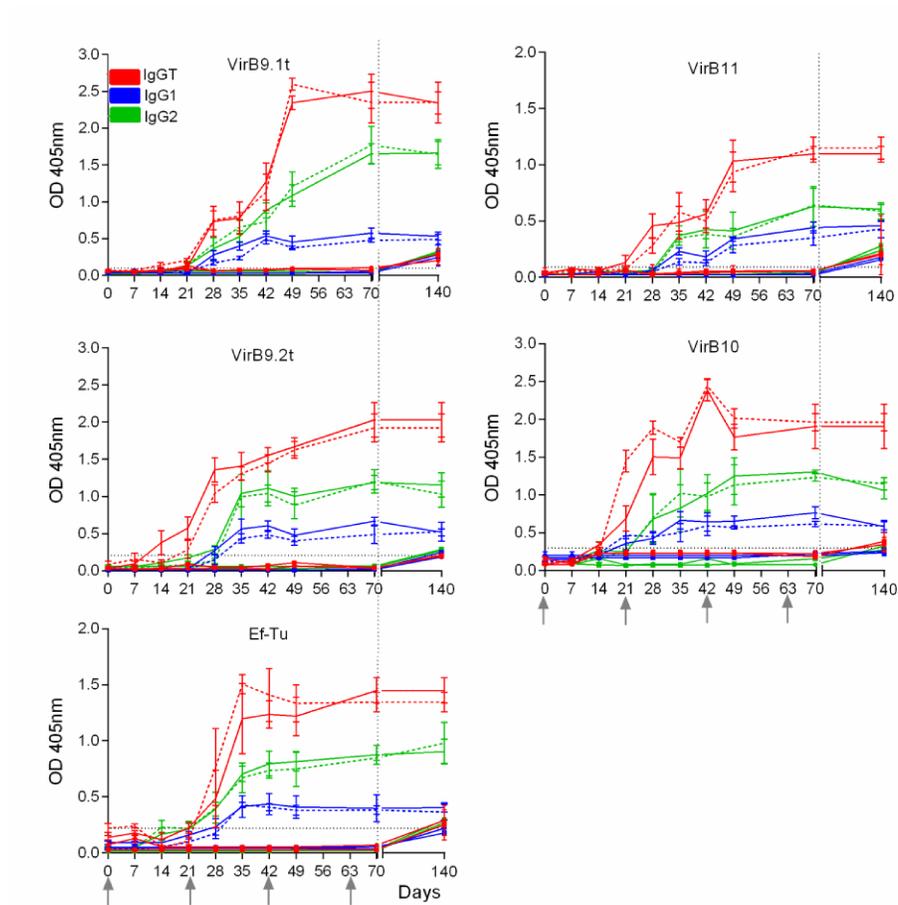
### 2.4.2 Evaluación de la respuesta inmune

Post vacunación los novillos de los grupos inmunizados (G1 y G2) generaron anticuerpos (IgGT, IgG1 e IgG2) contra VirB9.1t, VirB9.2t, VirB10, VirB11 y Ef-Tu, detectados por ELISAI y/o WB, mientras que los novillos de los grupos control (G3 y G4) permanecieron negativos hasta el desafío. La cinética de la respuesta de anticuerpos post vacunación y post desafío fue similar entre los grupos inmunizados (Figura 15). Los niveles de IgGT contra las cinco proteínas en los animales del G1 y G2, superaron el punto de corte por ELISAI a partir de los 28 días de la aplicación de la primera dosis de la vacuna. Ese día, los animales también resultaron positivos por WB (Figura 16). A partir de los 28 días, los niveles de IgGT entre los grupos inmunizados fueron similares ( $p > 0,05$ ) (Figura 15). Con respecto a los niveles de IgGT estimulados por cada antígeno individualmente, VirB9.1t y VirB9.2t indujeron mayores niveles que VirB10, VirB11 y Ef-Tu ( $p < 0,05$ ). Post desafío (a los 35 dpd), los grupos control mostraron un aumento en los niveles de IgGT ( $p < 0,05$ ) pero los valores alcanzados fueron menores a los grupos inmunizados (Figura 15).

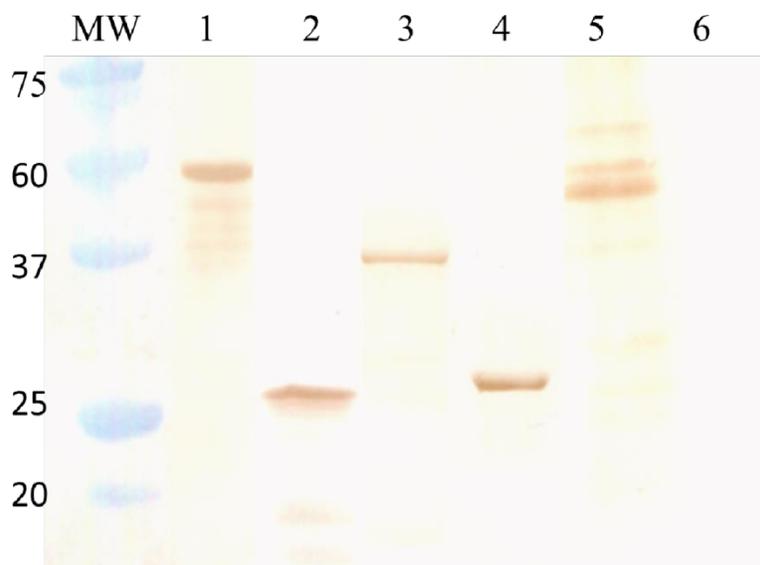
La respuesta de IgG2 inducida por las cinco proteínas fue mayor que la de IgG1 tanto post vacunación como post desafío ( $p < 0,05$ ). Post desafío (a los 35 dpd), los grupos control mostraron un aumento significativo en los niveles de IgG1 e IgG2 ( $p < 0,05$ ) pero los valores fueron menores a los grupos inmunizados ( $p < 0,05$ ) (Figura 15).

La expresión de IFN- $\gamma$  e IL-4 medida a través de la estimulación *in vitro* de las PBMC con la mezcla de proteínas recombinantes, no se detectó por ELISA. La expresión

de estas citocinas se detectó cuando las PBMC se estimularon con un mitógeno inespecífico (ConA), utilizado como control.



**Figura 15.** Niveles de anticuerpos (IgGT, IgG1 e IgG2) para cada proteína recombinante medidos por ELISAI. Grupo 1, proteínas recombinantes/Quil A (—); Grupo 2, proteínas recombinantes/Montanide (---); Grupo 3, PBS/Quil A (·-·) y Grupo 4, PBS/Montanide (-·-·). Cada punto representa la media  $\pm$  SEM del grupo a los días 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 55, 63 y 70 luego de la aplicación de la primera dosis de vacuna y a los 35 días post desafío (día 140). La línea de puntos horizontal indica el punto de corte calculado como la media de  $DO_{405nm}$  en el día 0 + 3 DE. Las flechas indican los días de aplicación de las dosis de vacuna y la línea de puntos vertical indica el día del desafío con *A. marginale* (día 105 luego del comienzo del experimento).



**Figura 16.** Reactividad por *Western blot* de los sueros de los novillos inoculados con proteínas recombinantes/Quil A (Grupo 1) y proteínas recombinantes/Montanide (Grupo 2), obtenidos a los 28 días luego de la aplicación de la primera dosis de la vacuna. Se muestra un animal representativo perteneciente al Grupo 1. MW: marcador de peso molecular (kDa), calle 1: VirB10; calle 2: VirB9.1t; calle 3: VirB11; calle 4: VirB9.2t; calle 5: Ef-Tu; calle 6: MSP5 (control negativo). La reacción se reveló con anti-bovino IgG-HRP.

### 2.4.3 Evaluación de la respuesta al desafío

Luego del desafío con una dosis de  $10^7$  eritrocitos parasitados con *A. marginale*, los novillos mostraron un significativo descenso del HTO e incremento del PEP ( $p < 0,05$ ) y requirieron tratamiento (20 mg/kg de oxitetraciclina) para evitar la muerte. Después de un período de prepatencia de  $20 \pm 1$  días, la infección por *A. marginale* se confirmó en todos los novillos mediante frotis de sangre teñidos con Giemsa. Al momento de la aplicación del tratamiento, no hubo diferencias en las medias de los parámetros clínicos entre los grupos ( $p > 0,05$ ). En la Tabla 7 se muestran los valores de dichos parámetros por novillo tratado. El tratamiento antibiótico aplicado entre los 23 y 30 dpd, atenúo el descenso del HTO y el aumento del PEP. Las medias de los valores máximos alcanzados en los parámetros clínicos evaluados fueron similares entre los grupos ( $p > 0,05$ ) (Tabla 8). El máximo descenso del HTO y el máximo PEP se registraron entre los 28 y 30 dpd en todos los animales.

Post desafío con *A. marginale*, la infección se confirmó en todos los novillos al día 14 por PCRn. Por ELISAhc-cm todos los novillos resultaron positivos al día 35. Al día 14, la

media de anticuerpos (% I) fue mayor en los grupos inmunizados respecto a los grupos control ( $p < 0,05$ ). Esto resultó en un mayor número de novillos positivos inmunizados (6/10) que de novillos positivos control (0/10). En la Tabla 9 se muestra el número de novillos por grupos positivos por ELISAhc-cm a diferentes días post desafío.

**Tabla 7.** Parámetros clínicos individuales al momento de la aplicación del tratamiento con oxitetraciclina (20 mg/kg) en novillos (n=20) vacunados con cuatro dosis de proteínas recombinantes/Quil A (Grupo 1), proteínas recombinantes/Montanide (Grupo 2), PBS/Quil A (Grupo 3) y PBS/Montanide (Grupo 4) y desafiados con  $10^7$  eritrocitos parasitados con *A. marginale*. En negrita se muestra la media  $\pm$ SEM de cada grupo.

Grupos	Animal ID	Tratamiento (día)	HTO (%)	PEP	T (°C)
Grupo 1	1	23	22	5	39,2
	6	30	19	6	39,0
	14	26	17	6	38,5
	16	30	15	5	39,1
	20	30	15	7	39,8
		<b>28 <math>\pm</math> 1</b>	<b>17,6 <math>\pm</math> 1,3</b>	<b>5,8 <math>\pm</math> 0,4</b>	<b>39,1 <math>\pm</math> 0,21</b>
Grupo 2	2	26	19	5	38,8
	8	27	18	5	39,4
	11	26	19	7	39,5
	19	21	22	6	39,7
	15	21	23	6	42,0
		<b>24 <math>\pm</math> 1</b>	<b>20,2 <math>\pm</math> 0,1</b>	<b>5,8 <math>\pm</math> 0,4</b>	<b>39,8 <math>\pm</math> 0,6</b>
Grupo 3	12	23	20	6	38,7
	3	23	20	6	38,6
	7	23	20	7	39,1
	17	25	19	6	40,1
	5	28	23	7	40,6
		<b>24 <math>\pm</math> 1</b>	<b>20,4 <math>\pm</math> 0,7</b>	<b>6,4 <math>\pm</math> 0,3</b>	<b>39,4 <math>\pm</math> 0,4</b>
Grupo 4	21	26	19	6	38,4
	9	28	23	6	40,0
	4	30	16	7	39,1
	10	28	16	7	39,1
	13	30	15	7	39,4
		<b>28 <math>\pm</math> 1</b>	<b>17,8 <math>\pm</math> 1,5</b>	<b>6,6 <math>\pm</math> 0,3</b>	<b>39,2 <math>\pm</math> 0,3</b>

Los valores entre los grupos no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

HTO = hematocrito.

PEP= porcentaje de eritrocitos parasitados.

T= temperatura corporal.

**Tabla 8.** Parámetros clínicos expresados como las medias ( $\pm$ SEM) por grupos de los valores máximos obtenidos luego del desafío con  $10^7$  eritrocitos parasitados con *A. marginale* en novillos (n=20) vacunados con cuatro dosis de proteínas recombinantes/Quil A (Grupo 1), proteínas recombinantes/Montanide (Grupo 2), PBS/Quil A (Grupo 3) y PBS/Montanide (Grupo 4).

Grupos	Máxima depresión del HTO (%)	Máximo PEP	T acumulada por encima de 39,5°C	Novillos tratados con OTC (n/n)
Grupo 1	48,4 $\pm$ 2,3	6,2 $\pm$ 0,4	1,2 $\pm$ 0,2	5/5
Grupo 2	44,4 $\pm$ 1,8	6,0 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,5	5/5
Grupo 3	45,7 $\pm$ 3,4	6,9 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,3	5/5
Grupo 4	45,7 $\pm$ 3,5	7,0 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,5	5/5

Los valores entre los grupos no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

HTO = hematocrito.

PEP = porcentaje de eritrocitos parasitados.

T = temperatura corporal.

OTC = oxitetraciclina.

**Tabla 9.** Respuesta inmune humoral al desafío con *A. marginale*. Número de novillos en los grupos inmunizados (Grupo 1 y Grupo 2) y en los grupos control (Grupo 3 y Grupo 4) con anticuerpos anti-MSP5 determinados por ELISAhc-cm a diferentes días post desafío.

Días post desafío	Grupos inmunizados			Grupos control		
	Grupo 1 (n=5)	Grupo 2 (n=5)	Total (n=10)	Grupo 3 (n=5)	Grupo 4 (n=5)	Total (n=10)
14	3	3	6*	0	0	0*
21	3	5	8	4	2	6
28	5	5	10	5	4	9
35	5	5	10	5	5	10

(\*) Indica diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

Punto de corte: 29% de inhibición.

## 2.5 DISCUSIÓN

En este trabajo se seleccionaron cinco proteínas subdominantes de la superficie de *A. marginale* pertenecientes al sistema de secreción de tipo IV (T4SS) para evaluarlas como inmunógenos en bovinos. Estas proteínas han sido postuladas como candidatas vacunales por otros autores, pero su eficacia protectora nunca fue evaluada (Lopez y col., 2007; 2008; Suttén y col., 2010; Morse y col., 2012). Las proteínas recombinantes VirB9.1t, VirB9.2t, VirB10, VirB11 y Ef-Tu no lograron inducir protección en bovinos contra el efecto patógeno de *A. marginale* luego del desafío experimental.

Las proteínas del T4SS son importantes para la supervivencia intracelular y la virulencia de las bacterias Gram negativas (O'Callaghan y col., 1999; Lopez y col., 2007). Muchas de ellas están expuestas a la superficie bacteriana, donde podrían ser atacadas por anticuerpos neutralizantes debido a la carencia de lipopolisacáridos en la familia Anaplasmataceae (Morse y col., 2011). Además, son proteínas altamente conservadas entre cepas geográficamente diferentes de *A. marginale* (Lopez y col., 2007). Los epitopes subdominantes son relevantes en la protección inmune, lo que se ha establecido claramente para varios patógenos virales cuya inmunidad protectora no se correlacionó con la inmunodominancia de los epitopes (Oukka y col., 1996; Gallimore y col., 1998;).

Tebele y col., (1991) y Brown y col., (1998a) demostraron que la inmunización de terneros con fracciones o con la membrana externa completa de *A. marginale* con el adyuvante Quil A, induce inmunidad protectora frente al desafío con una cepa homóloga. La inmunidad resultante incluye una fuerte respuesta de células T CD4+ y altos títulos de IgG2. Sin embargo, en este trabajo la inducción por el inmunógeno de una alta respuesta de anticuerpos con predominio del isotipo IgG2, no logró mitigar el curso de la infección por *A. marginale*. Se observaron resultados similares con otras proteínas subdominantes de la membrana externa de *A. marginale* que fueron probadas como inmunógenos. La vacuna con las proteínas AM854 y AM936 indujo una respuesta inmune comparable a la de la vacuna con la membrana externa, con altos niveles de IgG2, aunque no logró proteger contra el desafío (Deirdre y col., 2016). Albarrak y col., (2012) demostraron que la proteína subdominante AM779 tampoco pudo proteger a los terneros contra el desafío homólogo con machos adultos de *Dermacentor andersoni* infectados con *A. marginale* cepa St. Maries. Adicionalmente, en aquellos experimentos, los signos clínicos observados en los

animales luego del desafío con *A. marginale*, fueron similares a los observados en este trabajo (Albarrak y col., 2012; Deirdre y col., 2016).

La respuesta de anticuerpos anti-MSP5 al día 14 post desafío se observó en el 60% de los novillos inmunizados (G1 y G2), mientras que los novillos control (G3 y G4) permanecieron negativos. Esta diferencia podría atribuirse a la presencia de anticuerpos opsonizantes generados luego de la inmunización con las proteínas recombinantes. Se conoce que los anticuerpos son mejores opsoninas para el sistema inmune adaptativo que los factores del complemento del sistema inmune innato. Luego del desafío, en los novillos inmunizados, los anticuerpos dirigidos contra las proteínas de *A. marginale* expuestas a la superficie celular (VirB9.1t, VirB9.2t y VirB10) opsonizaron las bacterias y fueron reconocidos, a través de la región Fc de la IgG, por las células fagocíticas que procesaron las bacterias opsonizadas y las presentaron a las células T. Este proceso podría favorecer la secreción temprana de anticuerpos en los animales inmunizados.

La falta de inmunidad protectora en este ensayo podría atribuirse a la falla de las proteínas recombinantes para exponer sus epitopes críticos con la conformación correcta para generar anticuerpos protectores, ya que tres de ellas no se utilizaron en su estado nativo. Las proteínas expresadas en su estado nativo, utilizadas como antígenos en vacunas recombinantes, permiten incorporar estos epitopes que requieren estructuras conformacionales (Dormitzer y col., 2008; Zhao y col., 2016). Las características intrínsecas de las proteínas de la membrana externa de *A. marginale*, hacen que su expresión nativa sea dificultosa. En trabajos previos, las proteínas del T4SS se obtuvieron en condiciones desnaturalizantes (Sutten y col., 2010; Lopez y col., 2007, 2008; Morse y col., 2011). Zhao y col., (2016) lograron expresar VirB9.1 soluble como VirB9.1-GST y VirB9.2 insoluble como VirB9.2-SUMO y luego replegarla. Se ha reportado que la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* sin el péptido señal puede aumentar los niveles de expresión y solubilidad sin afectar la inmunogenicidad (Yang y col., 2014). En este trabajo, el análisis *in silico* mostró que la condición más favorable para expresar la proteína VirB9.1 soluble era sin el péptido señal. Así, VirB9.1t (residuos 22-272) se obtuvo en la fracción soluble en el citoplasma de *E. coli*. VirB9.2 sin el péptido señal (residuos 27-281), en cambio, se obtuvo en la fracción insoluble de *E. coli* y su plegamiento no fue posible, contrariamente a lo reportado por Zhao y col., (2016). Esta

diferencia podría ser explicada por el uso de la proteína de fusión SUMO. La chaperona SUMO podría mejorar el plegado de la proteína manteniendo los intermediarios de plegado en solución hasta adoptar la conformación correcta (Kong y Guo, 2011).

La incapacidad del inmunógeno para generar anticuerpos que bloqueen la entrada del parásito a la célula huésped, podría ser otra causa de la falta de inmunidad protectora en este ensayo. Las vacunas más exitosas se dirigen a epitopes altamente conservados necesarios para la entrada del microorganismo a la célula huésped (Telford, 2008). Adicionalmente, estudios previos han demostrado que las vacunas multi-antígeno son más efectivas para inducir una respuesta protectora en comparación con un antígeno individual (Willadsen; 2008). En este trabajo, las cinco proteínas evaluadas pueden haber resultado insuficientes para prevenir la invasión de los eritrocitos por *A. marginale*.

Los ensayos de inmunización con proteínas recombinantes son complejos debido a que diversas variables del plan de inmunización y del desafío pueden influir en el resultado. Las variables del plan de inmunización incluyen: el adyuvante; el tamaño molecular, la conformación y la concentración del antígeno; y el intervalo, la vía y el número de aplicaciones del inmunógeno. Las principales variables del desafío son la dosis y la vía de administración. Debido a que todos estos factores pueden influir en el éxito de una vacuna recombinante, aún con los resultados obtenidos es difícil descartar a las proteínas evaluadas en este ensayo como potenciales antígenos vacunales.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

A través de este trabajo se abordó la problemática de la anaplasmosis bovina en forma conjunta desde el diagnóstico y la prevención. El desarrollo de técnicas de diagnóstico serológico eficientes y de bajo costo que evalúen la situación epidemiológica de la anaplasmosis teniendo en cuenta que la vacunación con *A. centrale* se utiliza como método de prevención, y el desarrollo de un inmunógeno alternativo que resulte seguro y aplicable en animales adultos; son requerimientos para prevenir la aparición de brotes de anaplasmosis, prevenir la expansión de *A. marginale* y contribuir al control de la enfermedad.

Para abordar diagnóstico serológico de la anaplasmosis se trabajó en la producción de un antígeno que permita mejorar la performance del ELISA. La clonación y expresión soluble en *E. coli* de una forma truncada de las proteínas MSP5 de *A. marginale* y MSP5 de *A. centrale*, carentes de la región de transmembrana (residuos 28-210), permitió el desarrollo y optimización de dos diseños de ELISA (ELISAhc y ELISAdp). Ambos ELISA resultaron más específicos que el ELISA comercial disponible (VMRD inc.) al carecer de la chaperona molecular MBP, y más sensibles para la determinación de anticuerpos contra *A. centrale* al contener el antígeno homólogo. Con el ELISAdp, además, se evitó la utilización de AcM y se disminuyeron los costos de diagnóstico al utilizar reactivos de producción nacional. Ambos diseños se podrán aplicar para determinar de forma eficiente y a bajo costo el estatus epidemiológico de los rodeos de nuestro país y la región, donde la vacunación con *A. centrale* es una herramienta para la prevención de la anaplasmosis bovina.

Para abordar la prevención de la enfermedad se trabajó en el desarrollo de una vacuna recombinante para uso en animales adultos. Con este objetivo, se clonaron y expresaron en *E. coli* las proteínas VirB9.1, VirB9.2, VirB10, VirB11 y Ef-Tu pertenecientes al sistema de secreción tipo IV de *A. marginale*, y se probaron como inmunógenos en dos formulaciones con Quil A o Montanide como adyuvantes. Las dos formulaciones indujeron respuesta inmune humoral en bovinos, pero no lograron atenuar el efecto patógeno de *A. marginale*. Si bien el resultado del ensayo en cuanto a protección no fue exitoso, se determinó la capacidad protectora en bovinos de cinco antígenos postulados

en la bibliografía como candidatos vacunales. Con este antecedente se contribuye al diseño y ejecución de futuros experimentos-

La identificación del epitope específico para *A. marginale* que fue reconocido por los AcM evaluados en este trabajo y la utilización como antígeno en forma de péptido sintético, permitiría desarrollar un ELISAc para la detección de anticuerpos específicos contra *A. marginale*. Disponer de una técnica que permita conocer el origen de la infección en animales *Anaplasma* spp. positivos, es el desafío para futuros ensayos.

Por su parte, la identificación de los epitopes críticos de los antígenos seleccionados para vacunas recombinantes y su expresión como proteínas nativas, así como la determinación de las interacciones proteína-proteína requeridas para el desarrollo de inmunidad protectora, son puntos importantes que deberían ser estudiados en futuros ensayos orientados al desarrollo de una vacuna recombinante para *A. marginale*.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abbott JR, Palmer GH, Kegerreis KA, Hetrick PF, Howard CJ, Hope JC, Brown WC. 2005. Rapid and long-term disappearance of CD4+ lymphocyte responses specific for *Anaplasma Marginale* major surface protein 2 (MSP2) in MSP2 vaccinates following challenge with live *A. marginale*. *J. Immunol.* 174: 6702–6715.
- Abdala A, Pipano E, Aguirre D, Gaido A, Zurbriggen M, Mangold A, Guglielmone AA. 1990. Frozen and fresh *Anaplasma centrale* vaccines in the protection of cattle against *Anaplasma marginale* infection. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 43: 155–158.
- Aguirre DH, Bermudez AC, Mangold AJ, Guglielmone AA. 1988. Infección natural con *Anaplasma marginale* en bovinos de raza Hereford, Criolla and Nelore en Tucuman, Argentina. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 30: 37–42.
- Al-Adhami B, Scandrett WB, Lobanov VA, Gajadhar AA. 2011. Serological cross-reactivity between *Anaplasma marginale* and an Ehrlichia species in naturally and experimentally infected cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23: 1181–1188.
- Albarrak SM, Brown WC, Noh SM, Reif KE, Scoles GA, Turse JE, Norimine J, Ueti MW, Palmer GH. 2012. Subdominant antigens in bacterial vaccines: AM779 Is Subdominant in the *Anaplasma marginale* outer membrane vaccine but does not associate with protective immunity. *PLoS One.* 7: 1–7.
- Alleman AR, Barbet AF. 1996. Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen. *J. Clin. Microbiol.* 34: 270–276.
- Allred DR, McGuire TC, Palmer GH, Leib SR, Harkins TM, McElwain TF, Barbet AF. 1990. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 87: 3220–3224.
- Anziani O. Anaplasmosis en áreas libres de garrapatas. 1979. Memoria de la reunión anual de información técnica. *Inst. Nac. Tecnol. Agropecuaria Estac. Exp. Reg. Rafaela.* 63–68.

- Anziani O, Hadani A, Ford AC, Guglielmono AA, Bermudez AC, Mangold AJ, Suarez CM, Tarabla HA. 1981. Observaciones de campo y laboratorio sobre la inoculación de bovinos Holando Argentino con una cepa de *Anaplasma marginale* modificada y atenuada. Gac. Vet. 43: 962–974.
- Anziani O, Tarabla H, Ford C, Galletto C. 1987. Vaccination with *Anaplasma centrale*: response after an experimental challenge with *Anaplasma marginale*. Trop. Anim. Heal. Prod. 19: 83–7.
- Araújo FR, Costa CM, Ramos CAN, Farias TA, F de Souza II, Melo ESP, Elisei C, Rosinha GMS, Soares CO, Fragoso SP, Fonseca AH. 2008. IgG and IgG2 antibodies from cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* recognize the recombinant vaccine candidate antigens VirB9, VirB10, and elongation factor-Tu. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 103: 186–190.
- Aubry P, Geale WD. 2011. A review of bovine anaplasmosis. Transbound. Emerg. Dis. 58: 1–30.
- Aucouturier J, Ascarateil S, Dupuis L. 2006. The use of oil adjuvants in therapeutic vaccines. Vaccine. 24: 44–45.
- Backert S, Meyer TF. 2006. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. Curr. Opin. Microbiol. 9: 207–217.
- Baravalle ME, Thompson C, Valentini B, Ferreira M, de Echaide ST, Florín Christensen M, Echaide I. 2012. Babesia bovis biological clones and the inter-strain allelic diversity of the Bv80 gene support subpopulation selection as a mechanism involved in the attenuation of two virulent isolates. Vet. Parasitol. 190: 391–400.
- Barbet AF, Blentlinger R, Jooyoung Yi, Lundgren AM, Blouin EF, Kocan KM. 1999. Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture, tick salivary glands and cattle. Infect. Immun. 67: 102–107.
- Baumgartner W. 2005. Anaplasmosis bovina. En: Medicina interna y cirugía del bovino/Gerrit Dirksen; Hans-Dieter Gründer y Matthaeus Stöber. Vol 1. 4ta. ed. Editorial Inter-Médica S.A.I.C.I. 199–200.

- Berger BR, Christie JP. 1994. Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* virB operon: virB2 through virB11 are essential virulence genes. *J. Bacteriol.* 176: 3646–3660.
- Bock RE, de Vos AJ. 2001. Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Aust. Vet. J.* 79: 832–839.
- Bowie MV, de la Fuente J, Kocan KM, Blouin EF, Barbet AF. 2002. Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. *Gene.* 282: 95–102.
- Brayton KA, Palmer GH, Lundgren J, Yi A, Barbet AF. 2002. Antigenic variation of *Anaplasma marginale* msp2 occurs by combinatorial gene conversion. *Molecular Microb.* 43: 1151–1159.
- Brayton KA, Kappmeyer LS, Herndon DR, Dark MJ, Tibbals DL, Palmer GH, McGuire TC, Knowles DP Jr. 2005. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 844–849.
- Brayton KA, Palmer GH, Brown WC. 2006. Genomic and proteomic approaches to vaccine candidate identification for *Anaplasma marginale*. *Expert. Rev. Vaccines* 5: 95–101.
- Brizuela CM, Ortellado CA, Sanabria A, Torres A, Ortigosa D. 1998. The safety and efficacy of Australian tick-borne disease vaccine strains in cattle in Paraguay. *Vet. Parasitol.* 76: 27–41.
- Brown WC, Shkap V, Zhu D, McGuire TC, Tuo W, McElwain TF, Palmer GH. 1998a. 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 WC, Rice-Ficht AC, Estes DM. 1998b. Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 63: 45–55.

- Brown WC, Palmer GH, Lewin HA, McGuire TC. 2001. CD4 T lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* major surface protein 1 (MSP1), a heteromeric complex of MSP1a and MSP1b, preferentially recognize the MSP1a carboxyl terminus that is conserved among strains. *Infect. Immun.* 69: 6853–6862.
- Brown WC. 2012. Adaptive immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation: Implications for bacterial persistence. *Comp. Immunol. Microb.* 35: 241–252.
- Bundza A, Samagh BS. 1982. Acute Anaplasmosis in Imported Cattle. *Can. Vet. J.* 23: 337–339.
- Carelli G, Decaro N, Lorusso A, Elia G, Lorusso E, Mari V, Ceci L, Buonavoglia C. 2007. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. *Vet. Microbiol.* 124: 107–114.
- Cascales E, Christie JP. 2003. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 1: 137–149.
- Christie PJ, Atmakuri K, Krishnamoorthy V, Jakubowski S, Cascales E. 2005. Biogenesis, architecture and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 59: 451–85.
- Chung C, Wilson C, Bandaranayaka-Mudiyanselage CB, Kang E, Adams DS, Kappmeyer LS. 2014. Improved diagnostic performance of a commercial *Anaplasma* antibody competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5-glutathione S-transferase fusion proteins antigen. *J. Vet. Diagn. Invest.* 26: 61–71.
- Coetzee JF, Apley MD. 2006. Efficacy of enrofloxacin against severe experimental *Anaplasma marginale* infections in splenectomized calves. *Vet. Ther.* 7: 319–328.
- Coronado A. 2001. Is *Boophilus microplus* the main vector of *Anaplasma marginale*. Technical note. *Rev. Cient. FCV-LUZ.* 11: 408–411.
- de Echaide ST, Bono F, Farber M, Lugaesi C, Mangold A, Aguirre N, Vanzini V, Echaide I. 2004. Anaplasmosis bovina en rebaños lecheros de la provincia de Santa Fe, Argentina. 19 Congr. Panam. Cienc. Vet. Buenos Aires.

- de Echaide ST, Bono MF, Lugaresi C, Aguirre N, Mangold A, Moretta R, Farber M, Mondillo C. 2005. Detection of antibodies against *Anaplasma marginale* in milk using a recombinant MSP5 indirect ELISA. *Vet. Microbiol.* 106: 287–292.
- de la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Kocan KM. 2001. Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Int. J. Parasitol.* 31: 1705–1714.
- de la Fuente J, Van Den Bussche RA, Garcia-Garcia JC, Rodriguez, SD, Garcia MA, Guglielmone AA, Mangold AJ, Friche Passos LM, Barbosa Ribeiro MF, Blouin EF, Kocan KM. 2002. Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Anaplasmataceae) based on major surface protein sequences. *Vet. Microbiol.* 88: 275–285.
- de la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Kocan KM. 2003. Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells. *Vet. Microbiol.* 91: 265–283.
- de la Fuente J, Lew A, Lutz H, Meli ML, Hofmann- Lehmann R, Shkap V, Molad T, Mangold AJ, Alamazan C, Naranjo V, Gortazar C, Torina A, Caracappa S, García-Perez AL, Barral M, Oporto B, Ceci L, Carelli G, Blouin EF, Kocan KM. 2005. Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. *Anim. Health Res. Rev.* 6: 75–89.
- de la Fuente J, Ruybal P, Mtshali MS, Naranjo V, Shuqing L, Mangold AJ, S. Rodriguez SD, Jiménez R, Vicente J, Moretta R, Torina A, Almazán C, Bati PM, de Echaide ST, Farber M, Rosario-Cruz R, Gortazar C, Kocan KM. 2007. Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. *Vet. microbiol.* 119: 382–390.
- Decaro N, Carelli G, Lorusso E, Lucente MS, Greco G, Lorusso A, Radogna A, Ceci L, Buonavoglia C. 2008. Duplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection and quantification of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20: 606–611.

- Deirdre RD, Brown WC, Alperin DC, Brayton KA, Reif KE, Turse JE, Palmer GH, Noh SM. 2016. Subdominant outer membrane antigens in *Anaplasma marginale*: conservation, antigenicity, and protective capacity using recombinant protein. PLoS ONE 10(6): e0129309.
- del Cura A. 2003. Parásitos eritrocitarios del ganado vacuno. <http://www.scribd.com/doc/6280283/3-Parasitos>.
- Diaz AA, Tomba E, Lennarson R, Richard R, Bagajewicz MJ, Harrison RG. 2010. Prediction of protein solubility in *Escherichia coli* using logistic regression. Biotechnol. Bioeng. 105: 374–383.
- Dormitzer PR, Ulmer JB, Rappuoli R. Structure-based antigen design: a strategy for next generation vaccines. 2008. Trends in Biotechnol. 26: 659–667.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. 2001. Reorganization of the 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 “HGEagent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 2145–2165.
- Eriks IS, Stiller D, Palmer GH. 1993. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. J. Clin. Microbiol. 31: 2091–2096.
- Ewing SA. 1981. Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. In R. J. Hidalgo and E. W. Jones (ed.), Proceedings of the 7th National Anaplasmosis Conference. Mississippi State University, Mississippi State. 395–423.
- Foil LD. 1989. Tabanids as vectors of disease agents. Parasitol. Today 5: 88–96.
- French DM, McElwain TF, McGuire TC, Palmer GH. 1998. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. Infect. Immun. 66: 1200–1207.
- French DM, Brown WC, Palmer GH. 1999. Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. Infect. Immun. 67: 5834–5840.

- Gale KR, Dimmock CM, Gartside M, Leatch G. 1996. *Anaplasma marginale*: Detection of carrier cattle by PCR-ELISA. *Int. J. Parasitol.* 26: 1103–1109.
- Gallimore A, Hombach J, Dumrese T, Rammensee HG, Zinkernagel RM, Hengartner H. 1998. A protective cytotoxic T cell response to a subdominant epitope is influenced by the stability of the MHC class I/peptide complex and the overall spectrum of viral peptides generated within infected cells. *Eur. J. Immunol.* 28: 3301–3311.
- Ge M, Luo W, Jiang D, Li R, Zhao W, Chen G, Yang X, Yu X. 2012. Development and application of a double-antigen sandwich enzyme-linked Immunosorbent assay for detection of antibodies to porcine circovirus 2. *Clin. Vaccine Immunol.* 19: 1480–1486.
- Giardina S, Bretana A, Marquez Q. 1983. Ultrastructural aspects of intraerythrocytic development of a Venezuelan strain of *Anaplasma marginale*. *Tropenmed. Parasit.* 34: 7–10.
- Greiner M, Sohr D, Göbel P. 1995. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *J. Immunol. Methods.* 185: 123–132.
- Guglielmone AA. 1994. Epidemiología y prevención de los hemoparásitos (*Babesia* y *Anaplasma*) en la Argentina. En: Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Ed. por A. Nari y C. Fiel. *Hemisferio Sur.* 461–476.
- Guglielmone AA. 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.* 57: 109–119.
- Guglielmone AA, Vanzini VR. 1999. Analisis de fracasos en la prevención de la anaplasmosis y la babesiosis en bovinos inoculados con vacunas vivas. *Rev. Med. Vet.* 80: 66–68.
- He J, Xiu B, Wang G, Chen K, Feng X, Song X, Zhu C, Ling S, Zhang H. 2011. Double-antigen sandwich ELISA for the detection of anti-hepatitis C virus antibodies. *J. Virol. Methods.* 171: 163–168.
- Hofmann K, Stoffel W. 1993. TM base-A Database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem.* 374, 166.
- Hovell R. 2013. Reduction, refinement and replacement. *Vet. Rec.* 172: 691.1–691.

- Hu WP, Lu Y, Precioso NA, Chen HY, Howard T, Anderson D, Guan M. 2008. Double-antigen enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hepatitis E virus specific antibodies in human or swine sera. *Clin. Vaccine Immunol.* 15: 1151–1157.
- Jonsson NN, Reid SW. 2000. Global climate change and vector borne diseases. *Vet. J.* 160: 87–89.
- Kahn CM. 2007. Anaplasmosis. En: *Manual Merck de Veterinaria*. Vol I.6ta. ed. española. (Edición especial 50° aniversario) Editorial Océano. 18–20.
- Kapust RB, Waugh DS. 1999. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* 8: 1668–1674.
- Kenney RT, Edelman R. 2000. Adjuvants for the future. *New Generation Vaccines.* 2: 173–192.
- Kenney RT, Edelman R. 2003. Survey of human-use adjuvants. *Expert Rev. Vaccines.* 2: 167–188.
- Knowles D, Torioni de Echaide S, Palmer G, McGuire T, Stiller D, McElwain T. 1996 Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2225–2230.
- Kocan KM, Goff WL, Stiller D, Claypool PL, Edwards W, Ewing SA, Hair JA, Barron SJ. 1992a. Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible cattle. *J. Med. Entomol.* 29: 657–668.
- Kocan KM, Stiller D, Goff WL, Claypool PL, Edwards W, Ewing SA, McGuire TC, Hair JA, Barron SJ. 1992b. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from infected to susceptible cattle. *Am. J. Vet. Res.* 5: 499–507.
- Kocan KM, Blouin EF, Palmer GH, Ericks IS, Edwards WL. 1996. Strategies to interrupt the Development of *Anaplasma marginale* in Its Tick Vector. The effect of bovine-derived antibodies. *Ann. NY. Acad. Sci.* 791: 157–165.
- Kocan KM, Blouin EF, Barbet AF. 2000. Anaplasmosis control: past, present and future. *Ann. NY. Acad. Sci.* 916: 501–509.
- Kocan KM, de la Fuente J, Guglielmone AA, Melendez RD. 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 698–712.

- Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Garcia-Garcia JC. 2004. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*. 129: 285–300.
- Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA. 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.* 167: 95–107.
- Kong B, Guo GL. 2011. Enhanced in vitro refolding of fibroblast growth factor 15 with the assistance of SUMO fusion partner. *PLoS ONE* 6(5): e20307.
- Li A, Yuan Q, Huang Z, Fan J, Guo R, Lou B, Zheng Q, Ge S, Chen Y, Su Z, Yeo AET, Chen Y, Zhang J, Xia N. 2010. Novel double-antigen sandwich immunoassay for human hepatitis B core antibody. *Clin. Vaccine Immunol.* 17: 464–469.
- Lopez JE, Siems WF, Palmer GH, Brayton KA, McGuire TC, Norimine J, Brown WC. 2005. Identification of novel antigenic proteins in a complex *Anaplasma marginale* outer membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping. *Infect. Immun.* 73: 8109–8118.
- Lopez JE, Palmer GH, Brayton KA, Dark MJ, Leach SE, Brown WC. 2007. Immunogenicity of *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins in a protective outer membrane vaccine. *Infect. Immun.* 75: 2333–2342.
- Lopez JE, Beare AP, Heinzen R, Norimine J, Lahmers KK, Palmer GH, Brown WC. 2008. High-throughput identification of T-lymphocyte antigens from *Anaplasma marginale* expressed using in vitro transcription and translation. *J. Immunol. Methods.* 332: 129–141.
- Mason KL, Gonzalez MV, Chung C, Mousel MR, White SN, Taylor JB, Scoles GA. 2017. Validation of an improved *Anaplasma* antibody competitive ELISA for detection of *Anaplasma ovis* antibody in domestic sheep. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 29: 763–766.
- McCallon BR. 1973. Prevalence and economic aspects of anaplasmosis. In E. W. Jones (ed.), *Proceedings of the 6th national anaplasmosis conference*. Heritage Press, Stillwater, Okla. 1–3.
- McGarey DJ, Allred DR. 1994. Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. *Infect. Immun.* 62: 4587–4593.

- McGuire TC, Stephens EB, Palmer GH, McElwain TF, Leichtensteiger CA, Leib SR, Barbet AF. 1994. Recombinant vaccinia virus expression of *Anaplasma marginale* surface protein MSP-1a: effect of promoters, leader sequences and GPI anchor sequence on antibody response. *Vaccine*. 12: 465–471.
- Meeus PFM, Barbet AF. 2001. Ingenious gene generation. *Trends Microbiol*. 9: 353–355.
- Molad T, Mazuz ML, Fleiderovitz L, Fish L, Savitsky I, Krigel Y, Leibovitz B, Molloy J, Jongejan F, Shkap V. 2006. Molecular and serological detection of *A. centrale*- and *A. marginale*-infected cattle grazing within an endemic area. *Vet. Microbiol*. 113: 55–62.
- Molloy JB, Bowles PM, Knowles DP, McElwain TF, Bock RE, Kingston TG, Blight GW, Dalgliesh RJ. 1999. Comparison of a comparative inhibition ELISA and the card agglutination test for detection of antibodies to *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* in cattle. *Aust. Vet. J*. 77: 245–249.
- Morse K, Norimine J, Palmer GH, Suttan EL, Baszler TV, Brown WC. 2011. Association and evidence for linked recognition of type IV secretion system proteins VirB9-1, VirB9-2, and VirB10 in *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun*. 80: 215–27.
- Morse K, Norimine J, Hope JC, Brown WC. 2012. Breadth of the CD4+ T cell response to *Anaplasma marginale* VirB9-1, VirB9-2 and VirB10 and MHCclass II DR and DQ restriction elements. *Immunogenetics*. 64: 507–23.
- Morzaria SP, Katende J, Musoke A, Nene V, Skilton R, Bishop R. 1999. Development of sero-Diagnostic and molecular tools for the control of important tick-borne pathogens of cattle in Africa. *Parassitol*. 41: 73– 80.
- Noh SM, Brayton KA, Brown WC, Norimine J, Munske GR, Davitt CM, Palmer GH. 2008. Composition of the surface proteome of *Anaplasma marginale* and its role in protective immunity induced by outer membrane immunization. *Infection and Immunity*. 76: 2219–2226.
- Noh SM, Zhuang Y, Futse JE, Brown WC, Brayton KA, Palmer GH. 2010. The immunization-induced antibody response to the *Anaplasma marginale* major surface protein 2 and its association with protective immunity. *Vaccine*. 28: 3741–3747.

- O'Callaghan D, Cazevieille C, Allardet-Servent A, Boschioli ML, Bourg G, Foulongne V, Frutos P, Kulakov Y, Ramuz M. 1999. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol. Microbiol.* 33: 1210–1220.
- Oberle SM, Palmer GH, Barbet AF. 1993. Expression and immune recognition of the conserved MSP4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.* 61: 5245– 5251.
- OIE. 2015. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Bovine Anaplasmosis. Chapter 2.4.1.
- Oukka M, Manuguerra JC, Livaditis N, Tourdot S, Riche N, Vergnon I, Cordopatis P, Kosmatopoulos K. 1996. Protection against lethal viral infection by vaccination with nonimmunodominant peptides. *J. Immunol.* 157: 3039–3045.
- Palacios C, de Echaide ST, Mattion N. 2014. Evaluation of the immune response to *Anaplasma marginale* MSP5 protein using a HSV-1 amplicon vector system or recombinant protein. *Res. Vet. Sci.* 97: 514–520.
- Palmer GR, Barbet AF, Musoke AJ, Katende JM, Rurangirwa F, Shkap V, Pipano E, Davis WC, McGuire TC. 1988. Recognition of conserved surface protein epitopes on *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale* isolates from Israel, Kenia and Unites States. *Int. J. Parasitol.* 18: 33–38.
- Palmer GH, McElwain TF. 1995. Molecular basis for vaccine development against Anaplasmosis and Babesiosis. *Vet. Parasit.* 57: 233–253.
- Palmer GH, Rurangirwa FR, Kocan KM, Brown WC. 1999. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitology Today.* 15: 281–286.
- Palmer GH, Brown WC, Rurangirwa FR. 2000. Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Microbes Infect.* 2: 167–176.
- Palmer GH, Rurangirwa FR, McElwain TF. 2001. Strain composition of the ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a mammalian reservoir for tick transmission. *J. Clin. Microbiol.* 39: 631–635.

- Palmfjord M. 2015. Cross-sectional study of bovine anaplasmosis in South-western Uganda. The impact of wildlife-livestock interface. Second cycle, A2E. Uppsala: SLU, Dept. of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health. <https://stud.epsilon.slu.se/7711/>
- Pipano E, Mayer E, Frank M. 1985. Comparative response of Friesian milking cows and calves to *Anaplasma centrale* vaccine. Br. Vet. J. 141: 174–178.
- Potgieter FT, Stoltz WH. 2004. Bovine anaplasmosis. In: Infectious Diseases of Livestock. Vol I 2<sup>nd</sup> edition. Oxford University Press Southern Africa. 594–616.
- Primo ME, Thompson CS, Valentini BS, Sarli M, Novoa MB, Mangold AJ, T de Echaide S. 2019. Development of a novel fusion protein with *Anaplasma marginale* and *A. centrale* MSP5 improved performance of *Anaplasma* antibody detection by cELISA in infected and vaccinated cattle. PLoS ONE 14(1): e0211149.
- Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. 2002. Enfermedades causadas por Rickettsias. Medicina Veterinaria. Vol II. 9<sup>na</sup> ed. española. McGraw-Hill–Interamericana de España, S.A.U. 1495–1500.
- Ristic M. 1977. Bovine anaplasmosis. In J. Kreier (ed.), Parasitic Protozoa, vol. 4. Academic Press, Inc., New York. 235–249.
- Rodriguez Camarillo SD, Garcia Ortiz MA, Aboytes Torres R, Cantó Alarcón GJ, Barigye R. 2003-2004. Inmunología e inmunoprofilaxis de la anaplasmosis bovina. Ciencia Veterinaria. Vol. 9. Ed. Moreno Chan R. Editorial: UNAM. 124–164.
- Salmon DE, Smith T. 1896. Infectious diseases of cattle: southern cattle fever (Texas fever). In Special report on diseases of cattle and on cattle feeding. USDA Bureau of Animal Industry. Government Printing Office, Washington. 428–438.
- Schägger H, von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Analytical Biochemistry. 166: 368– 379.
- SENASA. 2005. Manual de procedimientos: anaplasmosis y babesiosis. [http://www.intranet.senasa.gov.ar/intranet/imagenes/archivos/dnsa/manuales\\_de\\_procedimiento/29%20Anaplasmosis.pdf](http://www.intranet.senasa.gov.ar/intranet/imagenes/archivos/dnsa/manuales_de_procedimiento/29%20Anaplasmosis.pdf). Consulta 02 de septiembre de 2019.

- Shkap V, Pipano E, McGuire TC, Palmer GH. 1991. Identification of immunodominant polypeptides common between *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 29: 31–40.
- Shkap V, Molad T, Brayton KA, Brown WC, Palmer GH. 2002a. Expression of major surface protein 2 variants with conserved T-cell epitopes in *Anaplasma centrale* vaccines. *Infect. Immun.* 70: 642–648.
- Shkap V, Molad T, Fish L, Palmer GH. 2002b. Detection of the *Anaplasma centrale* vaccine strain and specific differentiation from *Anaplasma marginale* in vaccinated and infected cattle. *Parasitol. Res.* 88: 546–552.
- Singh SM, Panda AK. 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.* 99: 303–310.
- Smith RD, Levy MG, Kuhlenschmidt MS, Adams JH, Rzechula DL, Hardt TA, Kocan KM. 1986. Isolate of *Anaplasma marginale* not transmitted by ticks. *Am. J. Vet. Res.* 47: 127–129.
- Smith T, Kilborne FL. 1893. Investigations into the nature, causation and prevention of southern cattle fever. In: 8th and 9th Am. Rep. Bur. An. Ind. pp 301.
- Sparg SG, Light ME, van Staden J. 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *J Ethnopharmacol.* 94: 219–43.
- Spath EJA, Guglielmone AA, Signorini AR, Mangold AJ. 1994. Estimación de las pérdidas económicas directas producidas por la garrapata *Boophilus microplus* y las enfermedades asociadas en la Argentina. *Therios*, vol. 23. 454–468.
- Strik NI, Alleman AR, Barbet AF, Sorenson HL, Wamsley HL, Gaschen FP. 2007. Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* major surface protein 5 and the extent of its cross-reactivity with *A. marginale*. *Clin. Vaccine Immunol.* 14: 262–268.
- Sun HX, Xie Y, Ye YP. 2009. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine.* 27: 1787–1796.
- Sutten EL, Norimine J, Beare PA, Heinzen RA, Lopez JE, Morse K, Brayton KA, Gillespie JJ, Brown WC. 2010. *Anaplasma marginale* Type IV secretion system proteins VirB2, VirB7, VirB11, and VirD4 are Immunogenic components of a protective bacterial membrane vaccine. *Infect. Immun.* 78: 1314–1325.

- Tebele N, McGuire TC, Palmer GH. 1991. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infect. Immun.* 59: 3199–3204.
- Telford JL. 2008. Bacterial genome variability and its impact on vaccine design. *Cell Host Microbe.* 3: 408–416.
- Theiler A. 1910. *Anaplasma marginale*. The marginale points in the blood of cattle suffering from a specific disease. *Govt. Vet. Bacteriol. Transvaal. South Africa.* 6–64.
- Theiler A. 1911. Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. In 1st Report of the Director of Veterinary Research, Department of Agriculture of the Union of South Africa. 7–64.
- Torioni de Echaide S, Knowles DP, McGuire TC, Palmer GH, Suarez CE, McElwain TF. 1998. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *J. Clin. Microbiol.* 36: 777–782.
- Vanzini VR, Ramirez LM. 1994. Babesiosis y anaplasmosis bovina. Diagnóstico, epidemiología y control. *RIA.* 25: 137–190.
- Vanzini VR, Mangold AJ, Guglielmone AA. 1999. Modelo técnico económico para la prevención de la babesiosis y la anaplasmosis de los bovinos en la ganadería de cría extensiva de la provincia de Corrientes. *Therios.* 28: 118–127.
- Vidotto MC, McGuire TC, McElwain TF, Palmer GH, Knowles JR. 1994. Intermolecular relationship of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.* 62: 2940–294.
- Visser ES, McGuire TC, Palmer GH, Davis WC, Shkap V, Pipano E, Knowles JR. 1992. The *Anaplasma marginale* msp5 gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infect. Immun.* 60: 5139–5144.
- Watcharatanyatip K, Boonmoh S, Chaichoun K, Songserm T, Woratanti M, Dharakul T. 2010. Multispecies detection of antibodies to influenza A viruses by a double-antigen sandwich ELISA. *J. Virol. Methods.* 163: 238–243.

- Willadsen P. Antigen cocktails: valid hypothesis or unsubstantiated hope?. 2008. Trends in Parasitol. 24: 164–167.
- Yang LM, Zhao LZ, Hu RL, Shi ZS, Liu WJ. 2006. A novel double-antigen sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of antibodies against rabies virus. Clin. Vaccine Immunol. 13: 966–968.
- Yang Z, Ahn HJ, Nam HW. 2014. High expression of water-soluble recombinant antigenic domains of *Toxoplasma gondii* secretory organelles. Korean J. Parasitol. 52: 367–376.
- Zhao L, Mahony D, Cavallaro AS, Zhang B, Zhang J, Deringer JR, Zhao CX, Brown WC, Yu C, Mitter N, Middelberg APJ. 2016. Immunogenicity of outer membrane proteins VirB9-1 and VirB9-2, a novel nanovaccine against *Anaplasma marginale*. PLoS ONE 11(4) e0154295.

**PUBLICACIONES**

- Primo ME, Thompson CS, Valentini BS, Sarli M, Novoa MB, Mangold AJ, T de Echaide S. 2019. Development of a novel fusion protein with *Anaplasma marginale* and *A. centrale* MSP5 improved performance of *Anaplasma* antibody detection by cELISA in infected and vaccinated cattle. PLoS ONE 14(1): e0211149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211149>
- Sarli M, Thompson CS, Novoa MB, Valentini BS, Mastropaolo M, Echaide IE, de Echaide ST, Primo ME. 2019. Development and evaluation of a double antigen sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to identify *A. marginale*-infected and *A. centrale*-vaccinated cattle. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1–7. <https://doi.org/10.1177%2F1040638719892953>
- Sarli M, Novoa MB, Mazzucco MN, Signorini ML, Echaide IE, de Echaide ST, Primo ME. 2020. A vaccine using *Anaplasma marginale* subdominant Type IV Secretion System recombinant proteins was not protective against a virulent challenge. PLoS ONE 15(2): e0229301. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229301>