

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
COLEGIO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**



TESIS:

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS GENES DE LA
MEMBRANA EXTERNA DEL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO IV DE
*Anaplasma marginale***

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

PRESENTA:

ALBERTO IRIBE ZAZUETA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

CO-DIRECTORA:

DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

ASESORES:

MC. NOHEMÍ CASTRO DEL CAMPO

DR. JAVIER ALONSO ROMO RUBIO

CULIACÁN ROSALES, SINALOA MÉXICO, A AGOSTO DEL 2015

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **ALBERTO IRIBE ZAZUETA**, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTORA

DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

CO-DIRECTOR

DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

ASESORA

MC. NOHEMÍ CASTRO DEL CAMPO

ASESOR

DR. JAVIER ALONSO ROMO RUBIO

CULIACÁN ROSALES, SINALOA, AGOSTO DEL 2015

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres Heriberto Iribé Cazares y Manuela Zazueta Peñuelas por haberme apoyado de manera incondicional para poder lograr esta meta.

A mis hermanos Heriberto Iribé Zazueta y Manuel Antonio Iribé Zazueta, por poder contar con ellos en todo momento.

A mi novia Liliana Estefanía Lugo Espinoza, por estar a mi lado durante más de 8 años y que también es parte de este logro.

A la Dra. Idalia Enríquez Verdugo, pues además de brindarme su gran amistad, ella fue la que me inició y me ha acompañado en todo momento para poder cumplir este paso más en mi carrera profesional.

A mi Co- directora de tesis la Dra. Soila Marible Gaxiola Camacho y mis asesores la MC. Nohemí Castro del Campo y el Dr. Javier Alonso Romo Rubio, por dedicar de su tiempo para poder concluir con la maestría.

Le doy las gracias al equipo de trabajo del laboratorio de parasitología Claudia Leonor Barraza Tizoc y Daniel Carrasco Solís.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1 Generalidades	2
2.2 Anaplasmosis bovina	3
2.3.Taxonomía	3
2.4 Ciclo de vida	4
2.5 Trasmisión	6
2.6 Signos clínicos	7
2.7 Diagnóstico	8
2.7.1 Frotis sanguíneo	8
2.7.2 Ensayo Inmunoenzimático competitivo (ELISAc)	9
2.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	9
2.8 Genoma	10
2.9 Diversidad genética	12
2.10 Proteínas de superficie mayoritarias (MPSs del Inglés: major surface proteins)	12
2.11 Proteínas de membrana externa (OMPs del Inglés: Outer membrane proteins)	13
2.12 Sistema de secreción tipo	14
2.12.1 Sistema de secreción tipo I	15
2.12.2 Sistema de secreción tipo II	15
2.12.3 Sistema de secreción tipo III	15
2.12.4 Sistema de secreción tipo IV	16
2.12.5 Sistema de secreción tipo V	17

2.12.6 Sistema de secreción tipo VI	17
2.12.7 Sistema de secreción tipo IV en el orden <i>Rickettsial</i>	18
2.12.8 <i>virB1</i>	20
2.12.9 <i>virB2</i>	20
2.12.9 <i>virB4</i>	21
2.12.10 <i>virB6</i>	21
2.12.11 <i>virB7</i>	21
2.12.12 <i>virB9</i>	21
2.12.13 <i>virb10</i>	22
2.12.14 <i>virb11</i>	22
2.13 Sistema homólogo de secreción tipo IV en <i>A. marginale</i>	22
2.14 Mecanismos inmunológicos	23
2.15 Antecedentes directos	25
III. HIPÓTESIS	26
IV. OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo general	27
4.1.2 Objetivos específicos	27
V. MATERIAL Y MÉTODOS	28
5.1 Localización	28
5.2 Tamaño de muestra	28
5.3 Extracción de ADN	28
5.4 <i>Anaplasma marginale</i>	29
5.4.1 <i>virB9</i> de <i>Anaplasma marginale</i>	29
5.4.2 <i>virB10</i> de <i>Anaplasma marginale</i>	30
5.5 Purificación de genes	30
5.6 Secuenciación	30
5.7 Análisis <i>In Silico</i>	30
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
6.1 Amplificación del gen <i>msp5</i> de <i>A. marginale</i>	32

6.2 Amplificación del gen <i>virB9</i> de <i>Anaplasma marginale</i>	33
6.3 Amplificación del gen <i>virB10</i> de <i>Anaplasma marginale</i>	33
6.4 Caracterización del gen <i>virB9</i> de <i>Anaplasma marginale</i>	34
6.5 Caracterización del gen <i>virB10</i> de <i>Anaplasma marginale</i>	35
VII. CONCLUSIÓN	37
VIII. LITERATURA CITADA	38

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. características generales del genoma de <i>A. marginale</i>	11
Cuadro 2. Concentración y pureza de ADN de sangre de bovino positivos a <i>A. marginale</i> .	32

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>A. marginale</i> en eritrocito de bovino	2
Figura 2. Cuerpos de inclusión de <i>A. marginale</i> en eritrocito	5
Figura 3. Ciclo de vida de <i>A. marginale</i>	5
Figura 4. garrapata <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	6
Figura 5. Instrumental por el cual se puede transmitir <i>A. marginale</i>	7
Figura 6. Bovino con signología de anaplasmosis	8
Figura 7. Mapa genético de <i>A. marginale</i> .	10
Figura 8. Islas de patogenicidad del sistema de secreción tipo IV en la Familia Rickettsiae	18
Figura 9. Islas de patogenicidad del sistema de secreción tipo IV de <i>A. phagocytophilum</i>	19
Figura 10. Funcionamiento del sistema de secreción tipo IV de <i>A. phagocytophilum</i>	20
Figura 11. Gel de Agarosa al 1%. Carril: 1 y 14 marcadores de 1Kb, del 2 al 13 y del 15 al 21 ADN de sangre de bovino	31
Figura 12. Amplificación del gen <i>msp5</i>	32
Figura 13. Electroforesis del producto de PCR <i>virB9</i>	33
Figura 14. Electroforesis del producto de PCR <i>virB10</i>	34

RESUMEN

Alberto Iribe Zazueta

Anaplasma marginale es una bacteria Gram-negativa del genogrupo II de las *Ehrlichias* del orden *Rickettsiales*, pertenece a la familia *Anaplasmataceae*, género *Anaplasma* y especie *marginale*. Son bacterias intracelulares obligadas que parasitan los eritrocitos de los vertebrados. *A. marginale*, tiene forma esférica, tamaño de 0.2 a 1 μm y se transmite por garrapatas de distintos géneros, tiene la capacidad de multiplicarse en la sangre de rumiantes y hemolinfa de garrapatas. Es causante de la Anaplasmosis bovina, la cual es la enfermedad clínica más notable en dicha especie. Además causa pérdidas económicas significativas en las áreas tropicales y subtropicales del mundo. Este microorganismo tiene alto grado de diversidad genética. Se han identificado 949 proteínas en el genoma de 30 cepas de *A. marginale*, de las cuales se identificaron 62 proteínas de membrana externa (OMPs). También se han estudiado ampliamente seis proteínas de superficie mayoritarias (MPSs). El Sistema de secreción de tipo IV (T4SS) es un transportador de membrana que abarca múltiples componentes presentes en muchas bacterias Gram-negativas, está presumiblemente utilizado por muchas especies para el intercambio de material genético, sin embargo, ha ganado una considerable atención por su papel en la patogénesis, en calidad de jeringas que inyectan factores de virulencia en las células huésped eucariotas. Estos factores de virulencia son translocados a través de "moléculas efectoras" (ADN, proteínas o complejos de nucleoproteína). Las cuales son necesarias para mantener el ciclo de vida bacteriano. Este microorganismo tiene un alto grado de diversidad genética. Entre los que se encuentran los genes de la membrana externa del Sistema de Secreción tipo IV (T4SS), los cuales son *virB9* y *virB10* que codifican para sus respectivas proteínas. Utiliza la variación antigénica como método de evasión del sistema inmune, lo que dificulta su control por medio de vacunas. Por lo cual es necesario realizar estudios de los genes que codifican para probables proteínas inmunogénicas.

PALABRAS CLAVE: *Anaplasma marginale*, gen *virB9*, gen *virB10*, Bovinos.

ABSTRACT

Anaplasma marginale is a Gram-negative bacterium of Genogroup II of the Ehrlichias of the order Rickettsiales, it belongs to the Anaplasmataceae family, genus *Anaplasma* and species *marginale*. They are obligate intracellular bacteria that parasitize vertebrate erythrocytes. *A. marginale*, has a spherical shape, size 0.2 to 1 μm and is transmitted by ticks of different genera, has the ability to multiply in the blood of ruminants and tick hemolymph. It is the cause of bovine Anaplasmosis, which is the most notable clinical disease in this species. It also causes significant economic losses in the tropical and subtropical areas of the world. This microorganism has a high degree of genetic diversity. 949 proteins have been identified in the genome of 30 *A. marginale* strains, of which 62 outer membrane proteins (OMPs) were identified. Six major surface proteins (MPSs) have also been extensively studied. Type IV Secretion Systems (T4SS) is a membrane transporter that encompasses multiple components present in many Gram-negative bacteria, it is presumably used by many species for the exchange of genetic material, however it has gained considerable attention for its role in pathogenesis, as syringes that inject virulence factors into eukaryotic host cells. These virulence factors are translocated through "effector molecules" (DNA, proteins, or nucleoprotein complexes). Which are necessary to maintain the bacterial life cycle. This microorganism has a high degree of genetic diversity. Among them are the genes of the outer membrane of the Type IV Secretion System (T4SS), which are *virB9* and *virB10* that encode their respective proteins. It uses antigenic variation as a method of evading the immune system, making it difficult to control by means of vaccines. Therefore, it is necessary to carry out studies of the genes that encode probable immunogenic proteins.

KEY WORD: *Anaplasma marginale*, gene *virB9*, gene *virB10*, Bovine.

I. INTRODUCCIÓN

Anaplasma marginale es una bacteria Gram-negativa del genogrupo II de las *Ehrlichias* del orden *Rickettsiales*, pertenece a la familia *Anaplasmataceae*, género *Anaplasma* y especie *marginale*. Son bacterias intracelulares obligadas que parasitan los eritrocitos de los vertebrados (Dumler *et al.*, 2001; Rymaszewska *et al.*, 2008). *A. marginale*, tiene forma esférica, tamaño de 0.2 a 1 μm y se transmite por garrapatas de distintos géneros (Corona *et al.*, 2004).), tiene la capacidad de multiplicarse en la sangre de rumiantes y hemolinfa de garrapatas (de la Fuente *et al.*, 2006b). *A. marginale* es causante de la Anaplasmosis bovina, es la enfermedad clínica más notable (Aubry y Geale, 2011). Además causa pérdidas económicas significativas en las áreas tropicales y subtropicales del mundo (Inokuma, 2007). La enfermedad presenta 4 estadios: Incubación, Desarrollo, Convalecencia y Crónico (Stokka *et al.*, 2000). Puede ser transmitida por dos métodos, biológico y mecánico (León *et al.*, 2000). Tanto el ganado como la garrapata se convierten en reservorios al estar infectados de *A. marginale* (De La Fuente *et al.*, 2007). Los signos clínicos dependen en el estadio en que se encuentre la enfermedad (Aubry y Geale, 2011; Hofmann-Lehmann *et al.*, 2004; Zivkovic *et al.*, 2007). Existen métodos de diagnóstico para la identificación de la Anaplasmosis bovina como el frotis sanguíneo, cELISA y PCR (Potgieter y Stoltsz, 1994; Knowles *et al.*, 1996; Molad *et al.*, 2006). Se han identificado 949 proteínas en el genoma de 30 cepas de *A. marginale*, el análisis promueve una identificación del proteoma y los candidatos a vacunas potenciales, de esas proteínas se identificaron 62 OMPs, donde solo diez son candidatas a vacunas en animales (Brayton *et al.*, 2005). Por lo cual el objetivo de este trabajo es caracterizar los genes de la membrana externa del sistema de secreción tipo IV de *A. marginale* en aislados de Culiacán.

II. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades

Anaplasma marginale es una bacteria Gram-negativa del genogrupo II de las *Ehrlichias* del orden *Rickettsiales*, pertenece a la familia *Anaplasmataceae*, género *Anaplasma* y especie *marginale*. Existen otras especies dentro de este género como *A. bovis*, *A. ovis*, *A. centrale*, *A. phagocytophilum* y *A. platys*. Son bacterias intracelulares obligadas que parasitan los eritrocitos de los vertebrados (Dumler *et al.*, 2001; Rymaszewska y Grenda, 2008). *A. marginale*, tiene forma esférica, tamaño de 0.2 a 1 μm y se tiñe de azul púrpura con coloración Giemsa, como se muestra en la figura 1, es patógena en mamíferos principalmente rumiantes y se transmite por garrapatas de distintos géneros (Corona *et al.*, 2004). Su clasificación sistemática se realizó sobre la base de características morfológicas, ecológicas, epidemiológicas y clínicas, sin embargo, el desarrollo de métodos moleculares en los últimos años ha permitido el reconocimiento parcial del genoma de esta bacteria y por ende el cambio en su clasificación sistemática (Rymaszewska y Grenda, 2008), tiene la capacidad de multiplicarse en la sangre de hospederos vertebrados y hemolinfa de garrapatas (de la Fuente *et al.*, 2006b).

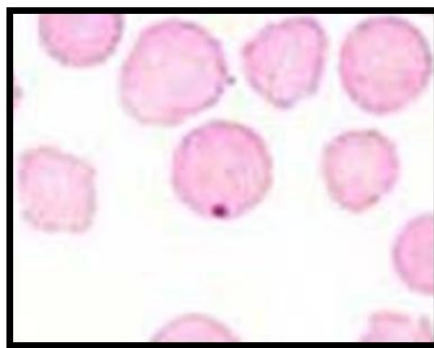


Figura 1. *A. marginale* en eritrocito de bovino

2.2 Anaplasmosis bovina

Es la enfermedad clínica más notable en bovinos, pero en otros rumiantes como búfalos, bisontes, antílopes africanos y algunas especies de venados presentan una infección persistente (Aubry y Geale, 2011). Además causa pérdidas económicas significativas en las áreas tropicales y subtropicales del mundo (Inokuma, 2007), este padecimiento es producido por el agente causal *Anaplasma marginale*, el cual se une a los eritrocitos de los bovinos (Kocan *et al.*, 2009; Shebish *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2011; Ybanez *et al.*, 2012). La enfermedad presenta 4 estadios: incubación (1), ocurre cuando la infección de los eritrocitos es del 1%, desarrollo (2), es cuando se da la destrucción de glóbulos rojos, entre 35 – 50%. Los bovinos afectados mueren o empiezan la recuperación de 1 a 4 días después de los primeros signos. Convalecencia (3), se presenta un 70% de eritrocitos infectados. Crónico (4), el animal es portador durante toda su vida (Stokka *et al.*, 2000).

2.3.Taxonomía

A.marginale ha tenido diversas clasificaciones a lo largo del tiempo por ser la primera rickettsia en ser identificada, se le consideró equivocadamente como virus y como parasito protozoario hasta la séptima edición del manual de Bergey 1957 (Brayton *et al.*, 2009), Dumler *et al.*, (2001), unificaron la nomenclatura de la familia anaplasmataceae, donde pasa a *A.marginale* y bacterias relacionadas dentro de ellas.

(Reino) Bacteria
 (Filo) Proteobacteria
 Alfa-
 (Clase) proteobacteria
 (Orden) Rickettsiales
 (Familia) Anaplasmataceae
 (Género) Anaplasma
 (Especie tipo) *A.marginale*
A.marginale ss centrale
A.bovis
A.ovis
A.phagocytophilum
A.platy
A.equis

2.4 Ciclo de vida

En la garrapata *Anaplasma marginale*, ingresa en forma reticular a las células del intestino medio, se divide por fisión binaria y se transforma a forma densa, que es su forma patógena, después la bacteria pasa a las glándulas salivales y otros tejidos, lo que permite la transmisión a hospederos susceptibles durante su alimentación (Kocan *et al.*, 2008). En el bovino, la bacteria se adhiere a los glóbulos rojos y por invaginación de la membrana celular se forma una vacuola y penetra; el microorganismo se divide por fisión binaria para formar un cuerpo de inclusión que contiene hasta ocho cuerpos unidos entre sí, como se ilustra en la figura 2 (Kocan *et al.*, 2004), provocando así el padecimiento denominado anaplasmosis bovina (figura 3), el cual está dividido en 4 etapas. La primera etapa oscila entre 3 – 8 semanas, en la segunda etapa dura de 4 – 9 días después, en la

tercera etapa dura de semanas a meses y la cuarta etapa puede durar años (Stokka *et al.*, 2000).

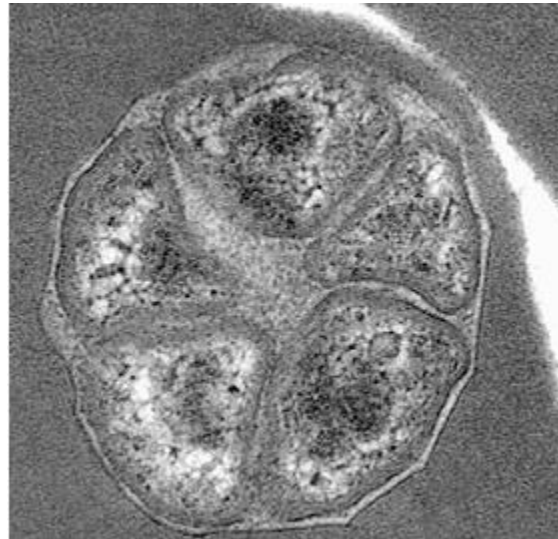


Figura 2. Cuerpos de inclusión de *A. marginale* en eritrocito (kocan *et al*; 2004).

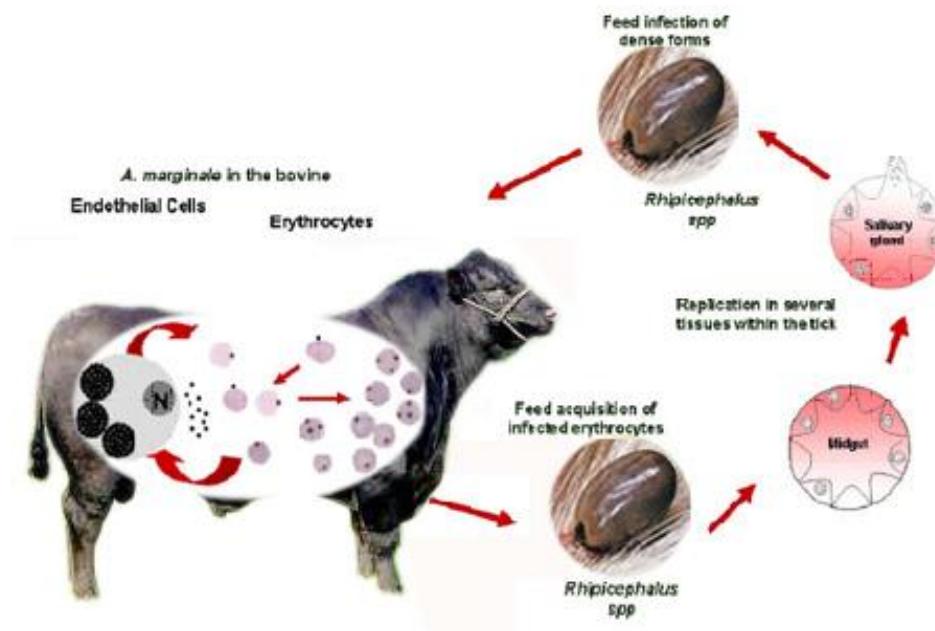


Figura 3. Ciclo de vida de *A. marginale* (Rodríguez *et al*; 2009).

2.5 Trasmisión

Anaplasma marginale puede ser transmitida por dos métodos: (1) biológico: los eritrocitos infectados son ingeridos por las garrapatas (figura 4), posteriormente se transmite a través de saliva de la garrapata en los rumiantes no infectados (Aubry y Geale, 2011). (2) mecánico: se han identificado varios vectores en los que se incluye insectos picadores como la mosca brava (*Stomoxys calcitrans*), mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*), tábanos y mosquitos. Instrumental contaminado con sangre de un animal que sea portador de *Anaplasma* como agujas, navajas etc, como se ilustran en la figura 5. Tanto el ganado como la garrapata se convierten en reservorios al estar infectados de *A. marginale* (Scoles *et al.*, 2008).



Figura 4.garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.



Figura 5. Instrumental por el cual se puede transmitir *A. marginale*.

2.6 Signos clínicos

En el primer estadio, al animal le provoca fiebre (superior a 39.5°C), depresión, anemia hemolítica progresiva e ictericia, disminución de la producción de leche y carne, debilidad, baja de apetito, estreñimiento, pérdida de peso, anorexia, letargo taquipnea, taquicardia, dificultad de mantenerse en pie y disminuye el hematocrito (figura 6). Las vacas preñadas pueden abortar, mientras que los toros pueden desarrollar infertilidad temporal (Aubry y Geale, 2011; Hofmann-Lehmann *et al.*, 2004; Zivkovic *et al.*, 2007). En la segunda fase, el ganado desarrolla atonía gastrointestinal, estasis del rumen y estreñimiento, que se asocian a la deshidratación y la pérdida de peso, ictericia. Algunos animales presentan déficit neurológico, que se han atribuido a los episodios de anoxia cerebral (Aubry y Geale, 2011). En la tercera fase, el bovino pierde peso, aborto y se da la recuperación lentamente, en la necropsia se presenta anemia severa, ictericia, esplenomegalia y hepatomegalia, hemorragias petequiales en las superficies serosas del corazón y el pericardio (Coetzee *et al.*, 2005; Aubry y Geale, 2011). La cuarta fase, se presenta el animal asintomático y sirve como reservorio para la transmisión del microorganismo (Kocan *et al.*, 2010).



Figura 6. Bovino con signología de anaplasmosis.

2.7 Diagnóstico

Para confirmar el diagnóstico clínico de la Anaplasmosis bovina, se requieren pruebas de laboratorio como los análisis por frotis de sangre teñida, serológicos y moleculares (Kocan *et al.*, 2010).

2.7.1 Frotis sanguíneo

Es el método más común para el diagnóstico de bovinos infectados por *Anaplasma*, donde se tiñe con Wright o Giemsa y se diagnostica por medio de microscopía óptica, pero cuando el ganado portador presenta baja parasitemia es difícil la diferenciación, por lo que este método no es recomendado para la caracterización de *Anaplasma spp* de los bovinos infectados persistentemente (Carelli *et al.*, 2007; Kocan, *et al.*, 2010), aún así, una de las razones por la que es confiable es para cuando los animales presentan anemia severa (Potgieter y Stoltsz, 1994).

2.7.2 Ensayo Inmunoenzimático competitivo (ELISAc)

La prueba de ELISAc, se utiliza actualmente para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina causada, por *A. marginale* en los rumiantes, desarrollado por dos grupos Visser *et al.*, 1992 y Knowles *et al.*, 1996, la cual se basa en el uso de un anticuerpo monoclonal (Mab) ANAF16C1 que reconoce MSP5 recombinante de *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis*. Sin embargo esta prueba (ELISAc MSP5), disponible comercialmente en VMRD, Inc. (Pullman, WA, EE.UU.), reconoce anticuerpos de *A. phagocytophilum* en el ganado infectado (Dreher *et al.*, 2005). En consecuencia, el ELISAc MSP5 no diferencia las especies de *Anaplasma* en las que la co-infección con *A. phagocytophilum*, *A. marginale* y *A. centrale* se producen (Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2004; Lin, *et al.*, 2004). El ELISAc basado en MSP5r para la detección indirecta de anticuerpos de *A. marginale* desarrollado por Morzaria *et al.*, 1999, y está disponible comercialmente a través de Svanova Biotech AB (Uppsala, Suecia), pero el ensayo no se ha evaluado en la reactividad cruzada con otras especies de *Anaplasma*.

2.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los métodos de diagnóstico basados en el ADN (ácido desoxirribonucleico) que se han desarrollado para identificar las infecciones de *Anaplasma marginale*, destaca el de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés polymerase chain reaction), la cual presenta un alto grado de sensibilidad y especificidad (mayor al 99%) y se basan en la amplificación de los genes 16S ARNr y el groEL (Molad *et al.*, 2006). El PCR para la identificación del gen 16S ARNr ha sido muy valioso para la detección de *Anaplasma* spp., porque son bacterias patógenas difíciles de aislar y crecer en el laboratorio, por lo que ha contribuido en gran medida a la diferenciación de las especies en el género *Anaplasma* (Dumler *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005), ya que *A. marginale* es lo suficientemente divergente para ser considerado una especie distinta, pero, teniendo así que las secuencias del gen 16S ARNr de las cepas de *A. marginale*,

A. ovis y *A. centrale*, a excepción de una cepa japonesa, son casi idénticos ($99 \pm 1\%$ de similitud) (Dumler *et al.*, 2001).

En algunos trabajos, el ADN extraído de células de la sangre de bovinos ha sido analizada por PCR anidado y PCR-RFLP (polimorfismos de fragmentos de restricción), método basado en la detección del gen 16S ARNr para la identificación específica de *A. marginale* utilizando los oligonucleótidos derivados del gen 16S ARNr y endonucleasa de restricción Bst1107 I (Noaman y Shayan, 2010b).

2.8 Genoma

El primer reporte de secuenciación del genoma completo de *A. marginale* fue publicado por Brayton *et al.*, 2005. Utilizando la cepa St Maries (Figura 7); el genoma en este aislado consiste de 1,197,687 pares de bases (pb); asimismo, se reportó la cantidad de G+C que fue de 49.8%.

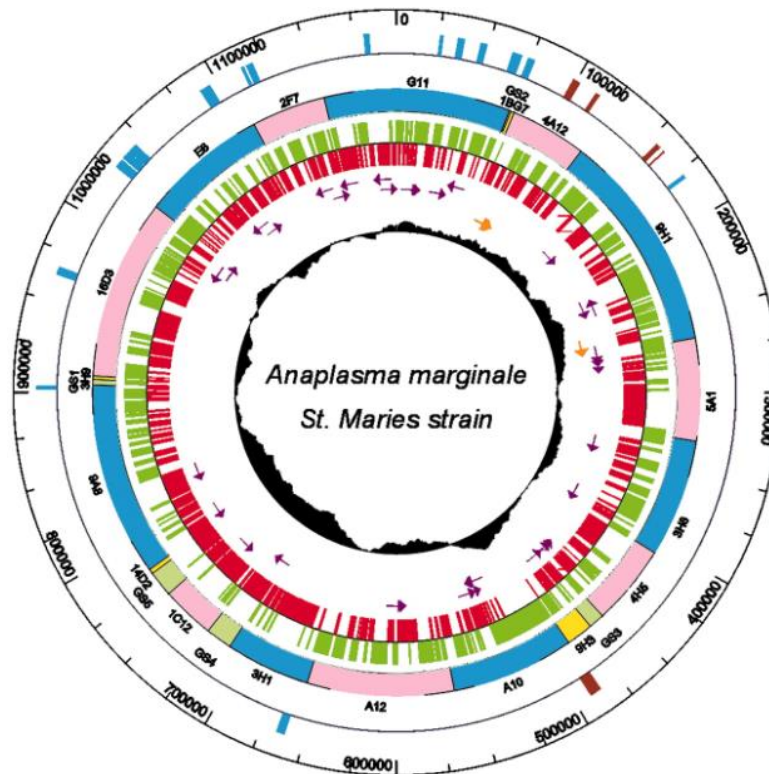


Figura 7. Mapa genético de *A. marginale*. El círculo interior representa la proporción GC (G-C/+C). El segundo y tercer círculo muestran la posición y la orientación de los genes RNAr (flechas naranjas) y RNAt (flechas moradas). El cuarto y quinto círculo muestran las posiciones de las secuencias codificantes predichas en su orientación hacia adelante (rojo) y de reserva (verde) el sexto círculo muestra la posición de los BACs completos en azul y rosa; parciales en amarillo) y en verde fragmentos de PCR que han sido secuenciados. El séptimo círculo muestra las posiciones de las superfamilias genéticas *msp1* (azul) y *msp2* (café), (Brayton *et al.*, 2009).

Actualmente se encuentran en el banco de genes (Gene Bank) los genomas de las cepas Mississippi, Florida, Virginia, y Puerto Rico (NCBI <http://ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). *A. marginale* es la especie tipo y hace algunos años se ha incluido en la familia *Anaplasmataceae* al agente de la ehrlichiosis granulocítica en humanos, *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum*, *Anaplasma (Ehrlichia) equi*, *Anaplasma (Ehrlichia) bovis* y *Anaplasma (Ehrlichia) platys* además de comprender a *A. centrae* y *A. ovis* (Dumler *et al.*, 2001).

Cuadro 1. características generales del genoma de *A. marginale*

Tamaño del genoma	1,197,687pb
G+C	49%
Codificación de proteínas (%)	86%
Asignación funcional	567
Asignación funcional conservada	107
Conservadas Hipotéticamente	126
Hipotéticos	151
Pseudogenes funcionales	16
Dominios truncados	8
Densidad de genes	0.79
Longitud media de los genes	1077
ARN ribosomal	3
ARN transferencia	37

Modificado de Brayton *et al.*, 2005.

2.9 Diversidad genética

Las bacterias secretan o translocan proteínas a la membrana celular al medio exterior incluyendo toxinas, adhesinas, enzimas etc., estas son necesarias para mantener el ciclo de vida bacteriano (Pei *et al.*, 2008).

Diferentes aislados de *A. marginale* han sido caracterizados alrededor del mundo de acuerdo a su morfología, secuencias proteínicas, características antigénicas y su habilidad para infectar y ser transmitidas por garrapatas (Rodríguez *et al.*, 2004). *A. marginale* es un organismo que utiliza la variación antigénica como método de evasión del sistema inmune, lo que dificulta su control por medio de vacunas, este microorganismo tiene un alto grado de diversidad genética (Palmer *et al.*, 2000).

La relación de la rickettsia, vector y huésped es compleja ya que tiene la interacción con las células endoteliales y eritrocitos (Carreño *et al.*, 2007). Una serie de proteínas de la bacteria y el sistema inmunológico de la especie bovina se han estudiado en detalle, sin embargo, aún cuando la vacunación es la forma idónea de control para esta enfermedad, hasta el momento no se cuenta con vacunas inactivadas efectivas y sólo algunos países usan cepas de *A. marginale* de baja virulencia (Bock *et al.*, 2003).

2.10 Proteínas de superficie mayoritarias (MPSs del Inglés: major surface proteins)

En el genoma de *A. marginale*, se encuentran seis genes ampliamente estudiados, de importancia para estudios moleculares (*msh1*, *msh2*, *msh3*, *msh4* y *msh5*), que codifican para las correspondientes proteínas de la superficie de la membrana (MSPs), los cuales son blancos de la respuesta inmune del hospedero contra el patógeno y sirven para explicar los posibles mecanismos de la persistencia de la bacteria en la naturaleza y su transmisión a nuevos huéspedes (Palmer y McGuire, 1984; Brayton *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2009).

En todo el mundo, la diversidad filogenética de cepas de *Anaplasma* en ganado bovino se ha caracterizado por estudios de las proteínas de la superficie de la membrana (MSPs), MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 y MSP5, estas proteínas son responsables de la interacción de *A. marginale* con las células del hospedero ya que son proteínas de adhesión (Palmer *et al.*, 1999; Kokan *et al.*, 2010; Palmer y McGuire, 1984; de la Fuente *et al.*, 2004c; de la Fuente *et al.*, 2007), pero sólo tres (MSP1a, MSP4 y MSP5) están codificados por genes únicos (*mSP1 α* , *mSP4* y *mSP5*). La *mSP1a* y *mSP4* se han utilizado para caracterizar la diversidad genética de las especies de *Anaplasma* y los resultados confirman que *mSP1a* no es buen marcador para la caracterización geográfica de los aislamientos de *A. marginale*, mientras el uso de *mSP4* proporciona información filogeográfica útil (de la Fuente *et al.*, 2004c). En *A. marginale* las proteínas MSP1a, MSP4 y MSP5 tienen regiones conservadas sugiriendo su uso potencial como componentes de vacunas con proteínas recombinantes contra la anaplasmosis (Kano *et al.*, 2002).

En una investigación realizada en México, se caracterizaron 4 cepas de *Anaplasma marginale*, procedentes de los estados de México, Morelos, Veracruz y Yucatán, en base a la virulencia, tiempo que tardan en producir signos clínicos y la capacidad para inducir anticuerpos específicos, mismos que se han caracterizado en términos de la secuencia de las proteínas de la superficie de la membrana (MSPs) (García *et al.*, 2000; Jiménez *et al.*, 2008). Mientras que Almazán *et al.*, 2008, describió cuatro nuevas cepas de *A. marginale* en un brote de anaplasmosis bovina en el estado de Tamaulipas, México, caracterizadas éstas por las *mSP1a* y *mSP4*.

2.11 Proteínas de membrana externa (OMPs del Inglés: Outer membrane proteins)

Se han identificado por medio de un Análisis *in silico* 949 proteínas, predichas en el genoma completo de 30 cepas de *A. marginale*, este análisis promueve una identificación acelerada del proteoma y los candidatos a vacunas potenciales; de esas proteínas se identificaron 62 OMPs, donde solo diez son candidatas a

vacunas en animales por que elevan la respuesta inmune de las IgG2 o bien por el complejo de proteínas de la superficie de la bacteria (Brayton *et al.*, 2005). De estos candidatos sólo cinco OMPs (Am779, Am854, Omp7, Omp 8 y Omp9) inducen una respuesta inmune al producir anticuerpos IgG2, sin embargo tres proteínas son codificadas por tres genes conjuntos en la cepa de *A. marginale* St. Maries, las cuales presentan un 70-75% de identidad (Brayton *et al.*, 2005; Noh *et al.*, 2006). Este locus es unido como una sola OMP 7/8/9 en una proteína la cual retiene entre un 64-70% de identidad, por lo que los candidatos a vacunas identificados se reduce a tres (Am779, Am854, Omp7/8/9) (Palmer *et al.*, 2012).

Albarrak *et al.*, 2012, demostraron que la proteína de membrana externa AM779, no puede ser considerada como una vacuna viable, debido a que a pesar de que se encuentra en pequeñas cantidades en la bacteria, la proteína recombinante no eleva los títulos de la IgG2, así mismo cuando fueron inmunizados animales con la proteína recombinante e infectados con el 2% de eritrocitos positivos a *A. marginale*, aumentó el porcentaje de eritrocitos infectados al 16%, por lo que se observó que esta proteína no protege contra la enfermedad en el animal.

2.12 Sistema de secreción tipo

Muchas especies bacterianas utilizan sistemas especializados para la transferencia y secreción de macromoléculas a través de las membranas, estos sistemas de secreción se agrupan en seis grandes grupos llamados tipo I, II, III, IV, V, VI (Juhás *et al.*, 2008). Las bacterias secretan o traslocan una gran cantidad de proteínas a la membrana celular y al medio exterior incluyendo resistencia a antibióticos o metales pesado, toxinas, adhesinas y enzimas, muchas de estas sustancias secretadas son necesarias para mantener el ciclo de vida bacteriano (Rances *et al.*, 2009). Específicamente, las bacterias Gram negativas han evolucionado con múltiples estrategias para transportar proteínas a través de la membrana, cada estrategia incluye diferentes complejos moleculares especializados conocidos como sistemas de secreción y se han clasificado en sec-dependiente y sec-independientes; las primeras utilizan secuencia señal en el extremo amino terminal usualmente de 20 a 25 aminoácidos y las sec-independientes traslocan desde el citosol al exterior celular sin intermediarios. Las

proteínas atraviesan las barreras lipídicas, membrana interna y membrana externa, separadas por el espacio periplásmico y peptidoglicano (Pei *et al.*, 2008; Filloux, 2009).

2.12.1 Sistema de secreción tipo I

Es un sistema sec-dependiente para la translocación, es decir se trata de un sistema de un solo paso, no hay intermediarios en el periplasma, está constituido de tres componentes, un canal en la membrana externa denominado PME (proteína de membrana externa), y un transportador ABC (de sus siglas en inglés ATP binding cassette) en la membrana interna (MI) y una proteína periplásmica que también está anclada a la MI y se denomina PF (proteína de fisión). El prototipo para ejemplificar este sistema de la secreción de la toxina α -hemolisina, toxina que se produce principalmente en cepas de *E.coli* que causan infecciones del tracto urinario (*E.coli* uropatógena), y es un factor de virulencia importante debido a su actividad citolítica y citotóxica (Hollan *et al.*, 2005).

2.12.2 Sistema de secreción tipo II

Este sistema es el responsable de secretar una gran cantidad de enzimas hidrolíticas y toxinas, como por ejemplo la toxina del cólera. Esta vía también es conocida como sistema general de secreción. Ocurre en dos etapas, primero, la maquinaria se transloca, el sustrato con el péptido líder a través de la membrana plasmática, porque este sistema es una vía sec-dependiente. El péptido es generalmente una secuencia corta de aproximadamente 30 aminoácidos, de los cuales uno o varios presentan carga positiva, y una secuencia de 10 a 20 aminoácidos de esta secuencia son hidrofóbicos. En la segunda etapa de translocación, la proteína pierde el péptido señal y adquiere su conformación nativa en el espacio periplásmico, para posteriormente ser secretada a través de la membrana externa por un complejo sistema multiprotéico llamado tipo II o secreción (Sandkvist, 2001).

2.12.3 Sistema de secreción tipo III

Este sistema constituye un área de estudio que ha sido intensamente investigada en los últimos años. Es una vía sec-independiente en la que la secreción ocurre en un sólo paso desde el citosol hasta las células del huésped, desempeña un papel

central en la patogenicidad de muchas bacterias Gram-negativas. Este sistema ha sido identificado en una gran variedad de patógenos de humanos, animales y plantas, incluyendo especies de *Bordetella*, *Chlamydia*, *Erwinia*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhizobia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Xanthomonas* y *Yersinia*. El mecanismo se asemeja a una jeringa, de ahí que este sistema sea conocido también como inyectisoma. Este sistema tiene una estructura macromolecular constituida por más de 20 proteínas, que forma un canal continuo de secreción y permite la "inyección" o "translocación" de diferentes proteínas (efectores de virulencia), directamente al citoplasma de la célula hospedera. Dichas proteínas efectoras afectan diversas vías de transducción de señales, alternando múltiples funciones celulares, lo que facilita la infección bacteriana (He *et al.*, 2004).

2.12.4 Sistema de secreción tipo IV

El sistema de secreción tipo IV es un aparato de transportación ampliamente distribuido en bacterias Gram negativas y Gram positivas, es una vía ya identificada, homóloga a los a los sistemas de conjugación y al sistema VirB de *Agrobacterium tumefaciens* que facilitan la translocación de ADN y proteínas. La exportación de la toxina pertussis (agente causal de la tos ferina) por *Bordetella pertussis* se lleva a cabo a través de esta vía y se han identificado sistemas homólogos en diferentes patógenos (Gonzales-Pedrajas y Dreyfus, 2003). Este sistema de secreción fue primeramente descrito para *Agrobacterium tumefaciens* consistiendo de 12 componentes denominados VirB1 a VirB11 y VirD4 que transfieren el complejo proteína-ADN en un solo paso desde el citoplasma hasta la célula eucarionte (Pei *et al.*, 2008). El papel del SSTIV en los mecanismos de patogénesis se ha descrito en diferentes organismos incluyendo *A. tumefaciens*, *L. pneumophila*, *H. pylori*, *B. pertussis* y *B. suis* (Yeo y Wwaksman 2004; Baron *et al.*, 2002), donde VirB3 a VirB6 y VirB8 a VirB11 son esenciales para mediar la presencia de estas bacterias en células del sistema retículo endotelial de los hospederos (den Harttigh *et al.*, 2008). Los datos obtenidos por su precisión de estos genes ha demostrado que disminuye su capacidad de crecimiento en la línea celular J774a.1 y cuando el gen suprimido es restablecido, el crecimiento *in*

vitro es parcialmente restaurado (Pei *et al.*, 2008). Las proteínas del SSTIV VirB también se cree que participan en la citotoxicidad hacia macrófagos infectados con mutantes rugosos de *Brucella melitencis* en lo que el antígeno O de superficie esta acortado, por lo que el SSTIV está más expuesto y puede traslocar proteínas de citotoxicidad más fácilmente (de Hartigh *et al.*, 2008; Zhong *et al.*, 2009). Se ha reportado también de ejercer un papel en la patogénesis en *Bartonella*, donde VirB se requiere para el establecimiento de la infección intraeritrocítica, mientras que una cepa carece de VirB4 se ha demostrado no ser virulenta (Gonzales y Dreyfus, 2003). En *A. marginale* se han reportado proteínas homólogas del sistema de secreción tipo IV. Se han realizado estudios con las proteínas VirB2, VirB7, VirB9, VirB10, VirB11, VirD4 y CTP (Brayton *et al.*, 2005, López *et al.*, 2007; Araújo *et al.*, 2008). En un estudio se renombró a la CTP como VirB9-1 y la proteína VirB9 como VirB9-2 en la concordancia con los receptores para *A. phagocytophilum* (Sutten *et al.*, 2010).

2.12.5 Sistema de secreción tipo V

El sistema de secreción tipo V es Sec-dependiente formado por tres vías distintas que comparten una serie de características comunes. La vía tipo V (A) comprende la vía clásica de los autotransportadores, la vía tipo V (B) comprende la forma dimérica y la forma trimérica de los autotrasportadores forma la secreción tipo V (C). las tres diferentes vías del sistema de secreción tipo V comparten dos etapas del mecanismo de translocación, en donde las proteínas son translocadas a través de la membrana interna en una forma Sec-dependiente, mientras que la secreción a través de la membrana externa en una forma depende de un β -barril. La simplicidad mecánica de este sistema puede explicar porque la secreción tipo V es el mecanismo más frecuente para la translocación de proteínas en bacteria Gram-negativas (Junker *et al.*,2006)

2.12.6 Sistema de secreción tipo VI

Este sistema de secreción se ha descrito recientemente en bacterias Gram-negativas tanto en las especies patógenas como mutualistas, (Bingle *et al.*, 2008). Igual que los sistema de secreción tipo III y IV el sistema de secreción tipo VI es

sec-independiente y probablemente coloca directamente su substrato dentro del citoplasma de las células del huésped (Bingle *et al.*, 2008).

2.12.7 Sistema de secreción tipo IV en el orden *Rickettsial*

En el orden Rickettsial en la familia Rickettsiaceae se han descrito los genes del aparato de secreción tipo IV en el género de las Rickettsias, estos genes se dividen en cinco islas de patogenicidad distribuyéndose de la siguiente manera: 1 (virB3, virB4a, virB6a-virB6e), 2 (virB2), 3 (virB9a, virB8a, virB7, virB8b, virB9b, virB10, virB11, virD4), 4 (virB1) e isleta 5 (virB4b) como se ilustra en la figura 7 (Gillespie *et al* 2009).

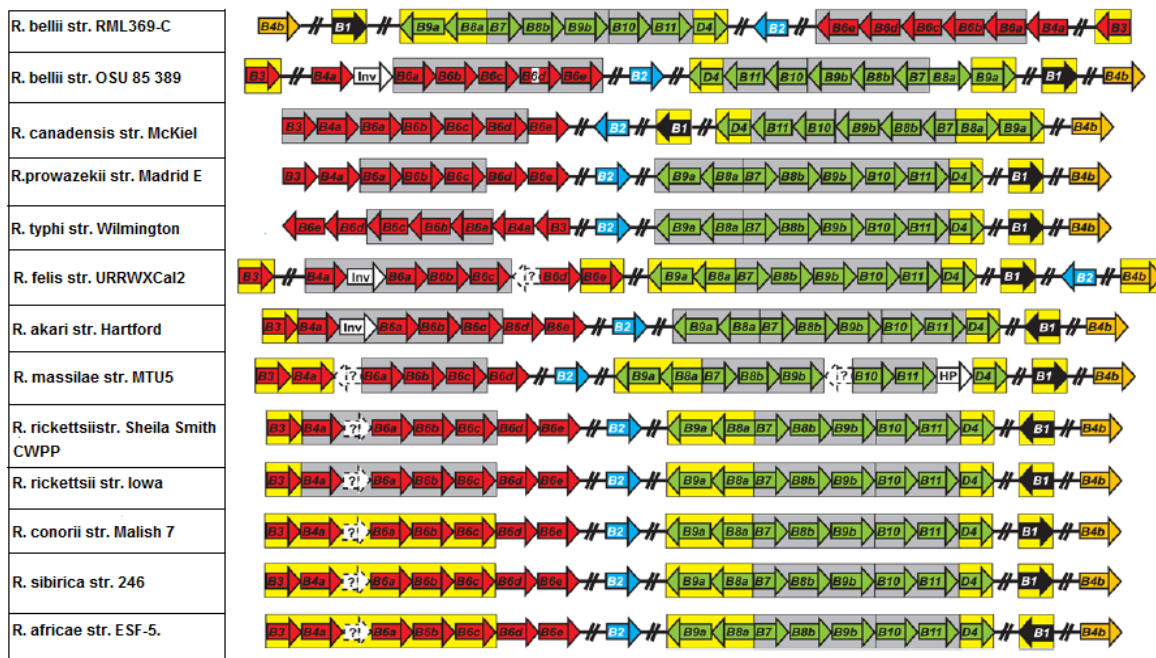


Figura. 8. Islas de patogenicidad del sistema de secreción tipo IV en la Familia Rickettsiae (Gillespie *et al.*, 2009).

En la familia Anaplasmataceae se han descrito los genes del sistema de secreción tipo IV de *Anaplasma phagocytophilum*, pero éste a diferencia del de Rickettsias se compone de tres islas de patogenicidad y se distribuyen de la siguiente manera: 1 (virB3-virB4-virB6-1-virB6-2-virB6-3-virB6-4), 2 (virB8-1-virB9-1-virB10-virB11- virD4), 3 (virB2- 1-virB2-2-virB2-3-virB2-4-virB2-5-virB2-6-virB2-7-virB2-8-virB4-2.) como se ilustra en la figura 9 (Rikihisa *et al.*, 2010).

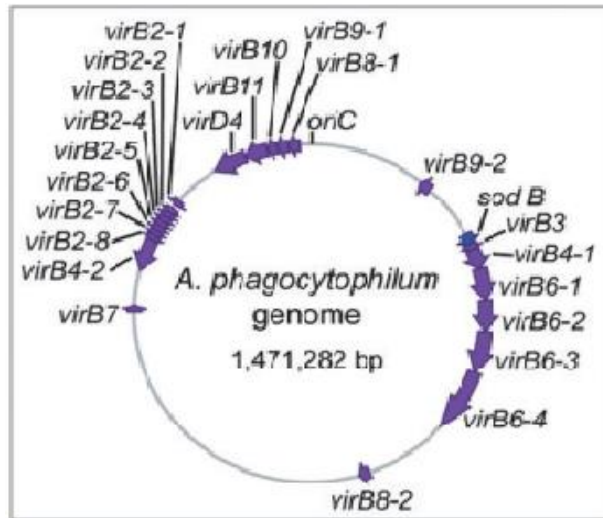


Figura 9. Islas de patogenicidad del sistema de secreción tipo IV de *A. phagocytophilum* (Rikihisa *et al.*, 2010).

Estos genes codifican para las proteínas del SSIV, cuando las proteínas de este sistema se incrustan en la membrana de la bacteria se abre el canal de SSIV por donde se hace el traspaso de las proteínas AnkA (tirosina quinasa) y Ats-1 (substrato traslocador de *Anaplasma*). La primera se dirige directamente al núcleo del neutrófilo para hacer la regulación de genes, la segunda pierde el grupo amino-terminal y se trasloca a la mitocondria a través de los complejos de membrana interna y externa de transporte e inhibe la apoptosis mitocondrial de la célula blanco como se observa en la figura 10 (Rikihisa *et al.*, 2010).

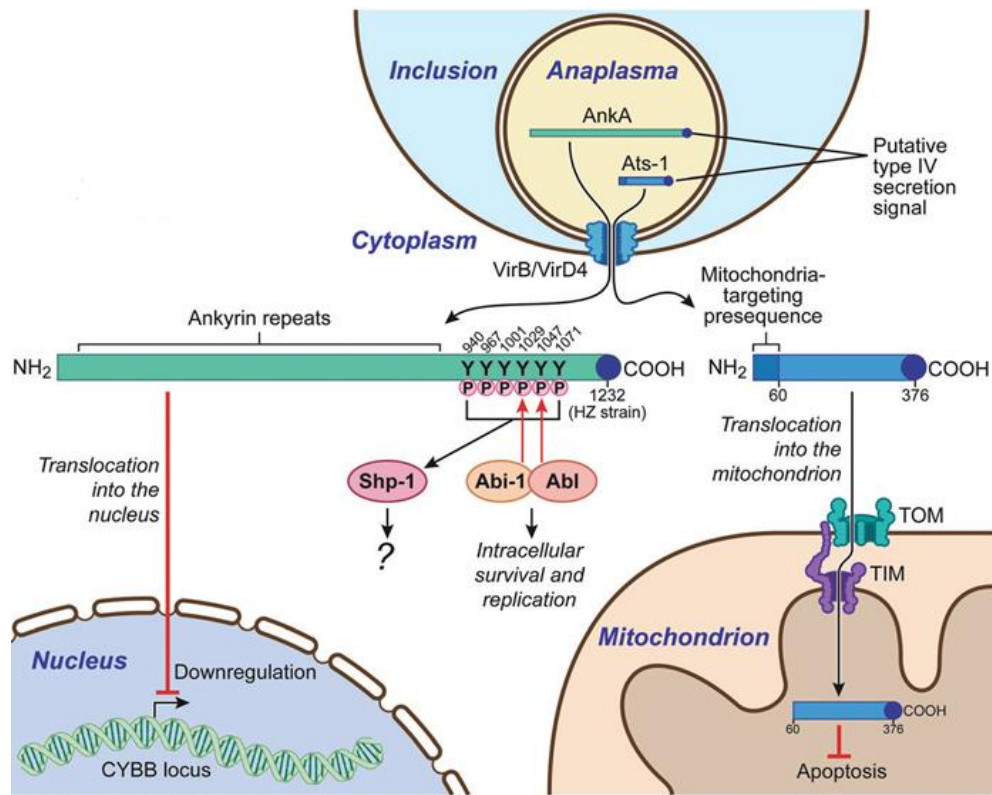


Figura 10. Funcionamiento del sistema de secreción tipo IV de *A. phagocytophilum* (Rikihisa *et al.*, 2010).

2.12.8 *virB1*

El gen *virB1* codifica para una proteína que posee en su parte aminoterminal dominios homólogos a transglicosilasas líticas bacterianas. A raíz de esta observación se postuló que una de las posibles funciones de VirB1 sería la de degradar al péptidoglicano de la pared para permitir el ensamblaje del sistema de secreción completo (Berger y Christie, 1994).

2.12.9 *virB2*

El gen *virB2* codifica para un polipéptido de 121 aminoácidos que es procesado por proteólisis, sufriendo luego una ciclación por unión de los aminoácidos Gln48 y Gly121. Este proceso, que es independiente del resto de los genes *virB*, produce una proteína madura cíclica de 74 aminoácidos. La forma procesada de VirB2 cumple una función estructural, siendo la subunidad cíclica que compone el pilus del aparato de secreción de *A. tumefaciens*. Para el ensamblaje de VirB2 y la

formación esquemática de un modelo del sistema de secreción tipo IV VirB. (Lai y Kado, 2000).

2.12.9 *virB4*

VirB4 forma parte de complejos multiméricos, cuya función es impedida por la incorporación de la proteína mutante que carece de actividad ATPasa (Berger y Christie, 1993). Las proteínas VirB3 y VirB4 poseen una alta similitud de secuencia con las TraL y TraC de *E. coli* (codificadas por el plásmido F), las cuales son proteínas accesorias necesarias para la formación del pilus F pero que no son componentes estructurales del mismo, *virB4* participa en el ensamblaje del sistema de secreción (Zupan *et al.*, 1998).

2.12.10 *virB6*

Es una proteína de membrana interna que posee cinco dominios transmembrana, y cumple un rol estructural formando parte del canal de secreción del sistema. Posee dominios funcionales involucrados en la interacción de VirB6 con el sustrato (T-DNA) y con la transferencia del mismo a otros componentes estructurales del canal (VirB8, VirB2 y VirB9), participando así en interacciones entre distintas subunidades del sistema necesarias para la secreción del T-DNA (Jakubowski, *et al.*, 2004).

2.12.11 *virB7*

Es una lipoproteína que se encuentra asociada a la membrana externa. Es capaz de formar homodímeros y heterodímeros con VirB9 mediante puentes de disulfuro. Se observó que la localización de VirB7 en la membrana externa se produce aún en ausencia de otras proteínas VirB, lo que sugiere que podría participar en eventos tempranos del ensamblaje del sistema de secreción. Mutantes *virB7* mostraron reducción en los niveles celulares, de VirB4, 5, 8, 9, 10 y 11, indicando que la síntesis, o bien la estabilidad de estos factores, depende de la presencia de VirB7 (Fernández *et al.*, 1996).

2.12.12 *virB9*

Es dispensable para el sistema de secreción tipo IV, consta de 840 pares de bases y codifica para una proteína de 279 aminoácidos, la proteína está asociada a la membrana celular y no se encuentra anclada a la membrana del

microorganismo pero se encuentra asociada a otras proteínas que conforman el SSTIV (Jiménez, *et al.*, 2009).

2.12.13 *virb10*

Interacciona con varias proteínas VirB tanto de la membrana interna como de la membrana externa. Estudios sobre VirB10 mostraron que sufre cambios estructurales en respuesta a la utilización de ATP por parte de VirB11 y VirD4, y se propuso que mediante este proceso VirB10 actúa, en forma dependiente de energía, como un “puente” que vincularía los componentes de membrana interna y externa del canal de secreción (Cascales y Christie, 2004b).

2.12.14 *virb11*

VirB11 se agrupa formando hexámeros y actúa tanto en el ensamblaje del sistema como en la secreción del sustrato en reacciones ATP dependientes (Yeo,*et al.*, 2000).

2.13 Sistema homólogo de secreción tipo IV en *A. marginale*

El análisis del genoma de *A. marginale* y *E. ruminatum* ha mostrado que genes homólogos del SSTIV están anotados en sus genomas (Brayton *et al.*, 2005; Collins, 2005), están compuestos por un operón conteniendo *sodB*, *VirB3*, *VirB4* y *VirB6* y un segundo operón más distante que contiene *VirB8*, *VirB9*, *VirB10*, *VirB11* y *VirD4*, mientras que en *ruminantium*, existen dos clusters de genes adicionales (*Erum5210*, *Erum5220*, y *Erum 5230*) que probablemente codifican para proteínas del SSTIV.

En estudios con *A. marginale*, se ha encontrado que *VirB9*, *VirB10* y la proteína conyugal de transferencia CTP son reconocidos por linfocitos B y T en respuesta a la inmunización con membranas de la *Rickettsia* en el ganado; así *VirB9* recombinante es reconocida en forma intensa y específica por linfocitos CD4+. En estos estudios sugieren que *VirB9* podría ser usada para el desarrollo de vacunas contra la anaplasmosis ya que presenta una homología del 99% para la secuenciación de nucleótidos y 100% para la secuencia de aminoácidos para los aislados de *A. marginale* estudiados en Brasil y Estados Unidos mostró alta respuesta inmunogénica (Vidotto *et al.*, 2008; López *et al.*, 2007). Sin embargo hasta la fecha solo se conocen las secuencias de los aislados PR1 de Brasil, Pto

Rico, St Maries, Virginia, Missisipi y Florida de Estados unidos (López *et al.*, 2007; Vidotto *et al.*, 2008; GenBank).

2.14 Mecanismos inmunológicos

Las bacterias del género *Anaplasma* así como otros patógenos intracelulares permanecen fuera del alcance del sistema inmune mientras que se encuentran dentro de la célula hospedera, sin embargo los animales que se recuperan a partir de una infección natural o con cepas de baja virulencia, pueden alcanzar protección sólida y duradera. La infección con *Anaplasma* induce la producción de anticuerpos IgG de diferentes subclases los cuales son asociados con funciones diferentes y resultados también diferentes en la resolución del cuadro clínico. En los bovinos la IgG1 está asociada con una respuesta inmune tipo Th2 (Humoral), mientras que IgG2, está asociada a una respuesta inmune tipo Th1 (Celular). La protección contra Anaplasmosis se asocia en una respuesta de tipo Th2, que se inicia a partir del reconocimiento de los cuerpos iniciales de *A.marginale* cuyos antígenos son procesados y reducidos a fragmentos pequeños los cuales son presentados a receptores de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad, a linfocitos T cooperadores CD4+ los cuales responden con citosinas como el IFN- γ , interleucinas 2 y 12 (IL-2IL-12) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) (Brown *et al.*, 1998). El interferón gama estimula linfocitos B los cuales empiezan a diferenciarse dando células plasmáticas, produciendo anticuerpos específicos de tipo IgG2 que van dirigidos a los epítomos correspondientes en los antígenos de *A. marginale* brindando especificidad favoreciendo la fagocitosis por los macrófagos y la producción de óxido nítrico que participa en la destrucción de bacterias (Brown *et al.*, 1998; Barrigye *et al.*, 2004). Este modelo propone una colaboración íntima entre la inmunidad humoral (IgG2) e inmunidad celular (CD4+) dicho modelo fue descubierto por Brown *et al.*, (1998) y verificado por Barigye *et al.*, (2004), explicando la respuesta inmune de los animales protegidos; estos animales sin embargo, bajo condiciones de estrés o que induzcan inmunosupresión, pueden padecer recidivas (Barbet *et al.*, 2001). Estas recidivas se explican por un fenómeno de variabilidad antigénica de los genes *msp2* y *msp3*. En este sentido, dichos genes sufren procesos de recombinación en mosaico, donde una serie de

genes truncados funcionales que componen el dominio hipervariable, se fusionan con el gen principal (dominio conservado), induciendo una respuesta inmune específica contra cada variante en cada ciclo de rickettsemia (Brown *et al.*, 2003;). Sin embargo, en experimentos inmunizados con antígenos en forma de ADN o recombinantes y posterior desafío de los animales inmunizados se ha observado que puede haber un decremento en los títulos de anticuerpos específicos, este fenómeno no parece deberse al efecto de las células Th reguladoras sino más bien a la desaparición de las células Th CD4+ específicas presentes, al menos las proteínas Msp2 (Abbott *et al.*, 2005) y Msp1 (Han *et al.*, 2008). Esta desaparición de células CD4+ parece ser inducida por una sobrecarga de antígeno debida a la replicación masiva del patógeno,, aunque se han reportado en otras bacterias. Los mecanismos inducidos en las células Th que hacen que estas desaparezcan (mueran) no se conocen bien, pero se ha postulado la apoptosis (Finlay *et al.*, 2006).

En el caso de *Anaplasma marginale* López et al., 2005, identificaron 21 proteínas de membrana externa de la cepa St. Maries por el método de espectrofotometría de masas, AM197 (producto no identificado), AM366 (producto no identificado), AM854 (producto no identificado), AM387 (producto no identificado), AM127 (producto no identificado), AM1142 (OpAG2), AM1164 (OMP4), AM1220 (OMP7), AM1223 (OMP10), AM075 (OMP14),AM097 (proteína de transferencia de conjugación), AM254 (factor Tu de Elongacion), AM1096(OMA87), AM956 (PepA citosol amino peptidasa), AM878 (*Anaplasma* proteína apéndice asociada), AM879 (proteína de *Anaplasma* asociada al apéndice), AM880 (proteína de *Anaplasma* asociada al apéndice), entre ellas AM1315 (VirB9) y AM1314 (VirB10) que pertenecen al SSIV. López *et al.*, 2007, compararon los genes de VirB9 y VirB10 de *A. marginale* cepas St. Maries y Florida encontrando 100% de identidad, pero al compararla con VirB9 de *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*, *E. canis* hubo 55%, 53%, y 54% de identidad y al comparar VirB10 obtuvieron el 60%, 51%, y 51% de identidad, respectivamente.

Vidotto *et al.*, 2008, amplificaron, secuenciaron, clonaron y compararon la clona del gen *virB9* de *A. marginale* cepa St. Maries. El análisis de la región que codifica *virB9* de la cepa clonada mostró el 98% de identidad en nucleótidos además, compararon la secuencia de aminoácidos de la proteína VirB9 donde encontraron 99% de similitud.

Sutten *et al.*, 2010 encontraron las proteínas VirB2, VirB7, VirB11 y VirD4 del SSIV de *Anaplasma marginale* de la cepa St. Maries por el método de RT-PCR

2.15 Antecedentes directos

Gillespie *et al.*, 2009, hicieron una comparación genómica del sistema de secreción tipo IV de Rickettsias, y obtuvieron como resultados que en *R. bellii* cepa. RML369-C, *R. bellii* str. OSU 85 389, *R. Canadensis* cepa. McKiel, *R. prowazekii* cepa. Madrid E, *R. typhi* cepa. Wilmington, *R. felis* cepa. URRWXCal2, *R. akari* cepa. Hartford, *R. massilae* cepa. MTU5, *R. rickettsii* cepa. Sheila Smith CWPP, *R. rickettsii* cepa. Iowa, *R. conorii* cepa. Malish 7, *R. sibirica* cepa. 246 y *R. africae* cepa. ESF-5 presentan el gen *virB10*. Por otra parte López y colaboradores en el 2005 compararon el gen *virB10* de *A. marginale* cepa St. Maries y Florida por el método de por el método de espectrofotometría de masas, encontrando 100% de identidad, pero al comparar *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*, *E. canis* obtuvieron el 60%, 51%, y 51% de identidad, respectivamente.

López *et al.*, 2007 secuenciaron *virB10*, e infectaron bovinos de la raza holstein de forma experimental con *A. marginale* y obtuvieron como resultados que el gen *virB10* reconoce proteínas y otros antígenos sub-dominantes, los cuales estimulan la producción de la IgG2, la proliferación de linfocitos T y la secreción del interferón gama, por lo cual sugieren la inclusión de esa proteínas en el desarrollo de vacunas contra *A. marginale*. En otro trabajo, realizado por Araújo *et al.*, 2008 aislaron *A. marginale* de eritrocitos de bovinos infectados, extrajeron el ADN, lo purificaron por espectrofotometria, identificaron y clonaron el gen *virB9*, *virB10* y *ef-tu*, obteniendo fragmentos de 840, 1338 y 1118 pb respectivamente.

III. HIPÓTESIS

Los genes de la membrana externa del sistema de secreción tipo IV de *Anaplasma marginale* están presentes en aislados de bovinos de Culiacán, Sinaloa y son conservados a los ya descritos en Gen Bank.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar los genes de la membrana externa del sistema de secreción tipo IV de *Anaplasma marginale* en aislados de Culiacán, Sinaloa.

4.1.2 Objetivos específicos

- Identificar *A. marginale* por PCR
- Amplificar el gen *virbB* de *A. marginale* por PCR.
- Amplificar el gen *virB10* de *A. marginale* por PCR.
- Purificar los genes *virB9* y *virB10* por columnas de afinidad.
- Secuenciar los genes *virB9* y *virB10*
- Analizar *in silico* los genes *virB9* y *virB10*.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Localización

El trabajo se realizó en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa (FMVZ/UAS). Culiacán se localiza a 24° 48' latitud Norte, 107° 23' longitud Oeste y 60 msnm de altitud; el clima se clasifica como semiseco muy cálido (BS1 (h')), con temperatura media anual de 24.9°C con máximas de 45°C en los meses de julio y agosto y mínimas de 7°C en diciembre y enero, la precipitación pluvial es de 671.4 mm con precipitaciones máximas en los meses de julio, agosto y septiembre (INEGI, 2011).

5.2 Tamaño de muestra

El tamaño de muestra se determinó mediante selección intencionada o muestreo por conveniencia siendo esta una técnica de muestreo no probabilístico, quedando el tamaño de la muestra a consideración del investigador (Thrusfield *et al.*, 1990).

5.3 Extracción de ADN

Se obtuvo el ADN por medio de la técnica fenol-cloroformo, utilizando 300µl de sangre completa de bovino, se agregó amortiguador de lisis (TE: tris 100mM y EDTA 10mM), dodecilsulfato de sodio (SDS) al 20%, se incubaron a 37°C con calor seco y a 56°C a calor húmedo por una hora respectivamente. Se agregó fenol (1:1), se centrifugó por dos minutos a 12,000 RPM, se obtuvo el sobrenadante y se añadió cloroformo (1:1), se centrifugó por dos minutos a 12,000 RPM se obtuvo el sobrenadante y se agregó etanol, se congeló a -20°C. Se centrifugó por 20 minutos, a 12,000 RPM y se decantó. A la pastilla obtenida se le agregó 50 µl de agua inyectable estéril. El ADN se observó en un gel de agarosa al 1% teñido con gel red con luz ultravioleta (Sambrook, *et al.*, 1989).

5.4 *Anaplasma marginale*

La amplificación se realizó con oligonucleótidos específicos del gen *msp5* para *A. marginale* internos: F´-5'gcatagcctccgcgtctttc

R´-5'cacgaaactgtaccactgcc. El PCR se realizó a un volumen de reacción final de 25 µl (1 µl del producto final del PCR, 25 ng de cada oligonucleótido, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 10 µl de amortiguador de reacción, 1.25 U de DNA polymerasa). La reacción se llevó a cabo en un termociclador (BioRad), por 35 ciclos. El proceso se llevó a cabo precalentando la mezcla por 3 min a 94°C, las temperaturas de desnaturalización son de 94°C por 30 seg, la alineación a 54°C por 30 seg y la extensión a 72°C por 1 min, con una extensión final de 72°C por 10 min (donados por DR. Mosqueda).

El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, observando el tamaño del fragmento amplificado (458-bp) por comparación con control positivo (ADN de sangre de bovino infectado experimentalmente con *A. marginale*) marcadores de tamaño (1 Kb DNA ladder), (donados por DR. Mosqueda).

5.4.1 *virB9* de *Anaplasma marginale*

La amplificación se realizó con oligonucleótidos internos: directo:5'-atgaatttctataaaaacttgcttgcg inverso:5'-ctaaagcaccgtattcactacttgcg

.El PCR se realizó a un volumen de reacción final de 25 µl (25 nM de cada oligonucleótido, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 10 µl de amortiguador de reacción, 1.25 U de DNA polymerasa). La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Bio Rad), programado con un paso inicial de 94°C por 30 s, alineamiento 52°C por 45 s y un paso final de extensión de 72° por 15 minutos.

El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, observando el tamaño del fragmento amplificado (859-pb) por comparación con marcadores de tamaño (1 Kb DNA ladder) (Vidotto *et al.*, 2008).

5.4.2 *virB10* de *Anaplasma marginale*

La amplificación del gen *virB10* se realizó con oligonucleótidos internos: F (5'-ttgagtttagggatgtcagacg 3') y r (5' ctacctacgcaccgcctc 3'). El PCR se realizó a un volumen de reacción final de 25 µl (25 nM de cada oligonucleótido, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 10 µl de amortiguador de reacción, 1.25 U de DNA polimerasa). La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Bio Rad), programado con un paso inicial de 94°C por 1 minuto, alineamiento 53.1°C por 1 minuto y un paso final de extensión de 72° por 15 minutos.

El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, observando el tamaño del fragmento amplificado (1300-pb) por comparación con marcadores de tamaño (1 Kb DNA ladder) (Araujo *et al.*, 2008).

5.5 Purificación de genes

Los productos amplificados se purificaron a través de columnas (QIAquick Gel Extraction kit, QUIAGEN) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (empresa MacroGen Corporation 1330 Piccard Dr. STE 205 Rockville, MD 20850 USA).

5.6 Secuenciación

Las muestras positivas se secuenciaron en la empresa MacroGen inc., Seul, Korea.

5.7 Análisis *In Silico*

El análisis *In Silico* se realizó con las secuencias genéticas obtenidas comprobándose con el software Chromas lite v.2.1.1 y comparadas con las secuencias disponibles en el Gen Bank, utilizando el BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), los alineamientos de las distintas secuencias se realizaron con el programa en línea clustal W2 (European Molecular Biology Laboratory EMBL-EBI 2015).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por el método de fenol-cloroformo obtuvimos 30 muestras de ADN, este método resultó adecuado ya que al ser observadas por luz ultravioleta las bandas demuestran un ADN íntegro, debido a que no exhiben degradación, sin embargo presentan proteína y no se observa ARN, como se detalla en las 19 muestras de ADN en la figura 11, además se obtuvo excelente concentración de ADN (como se observa en el cuadro 2). Estos resultados coinciden con el trabajo que realizaron Fraga *et al.*, 2004, donde indican que el método fenol-cloroformo presenta pureza de 1.96% y concentración de 100 mg/kg. En otros estudios realizados por Molad *et al.*, en el 2006, y Jiménez *et al.*, en el 2009, utilizaron el kit de extracción QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, USA), en donde utilizan el ADN obtenido directamente para el PCR sin comprobar su pureza, sin embargo Betina *et al.*, en 2000, describieron que la pureza del kit comercial es de 0.84 ± 0.4 .

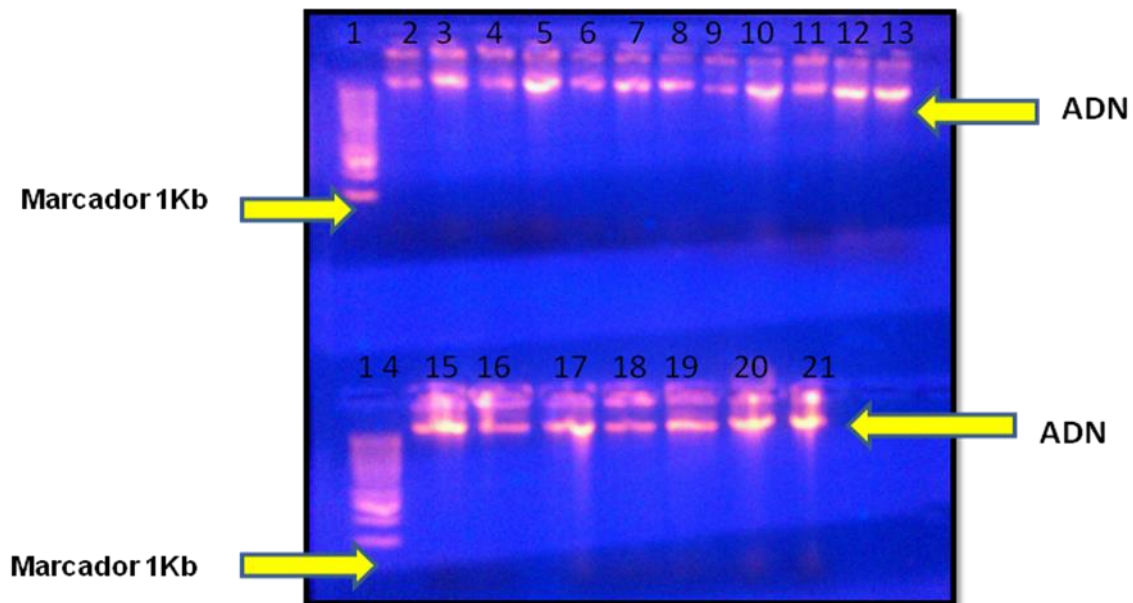


Figura 11. Gel de Agarosa al 1%. Carril: 1 y 14 marcadores de 1Kb, del 2 al 13 y del 15 al 21 ADN de sangre de bovino.

Cuadro 2. Concentración y pureza de ADN de sangre de bovino positivos a *A. marginale*.

Muestra	Concentración ng/μl	Pureza
1	320.9	1.58
2	157.7	1.39
3	30.4	1.8
4	40.6	1.38

6.1 Amplificación del gen *msp5* de *A. marginale*

La amplificación del gen *msp5* de *Anaplasma marginale* se observó aproximadamente a 458 pb como se observa en la figura 12. El amplicón del gen coincide en el tamaño descrito por otros autores como Corona *et al.*, 2011; Elizalde *et al.*, 1998; Reyna *et al.*, 1998 y Palmer *et al.*, 1984. Lo cual confirma que *msp5* es un gen altamente conservado en *A. marginale*.

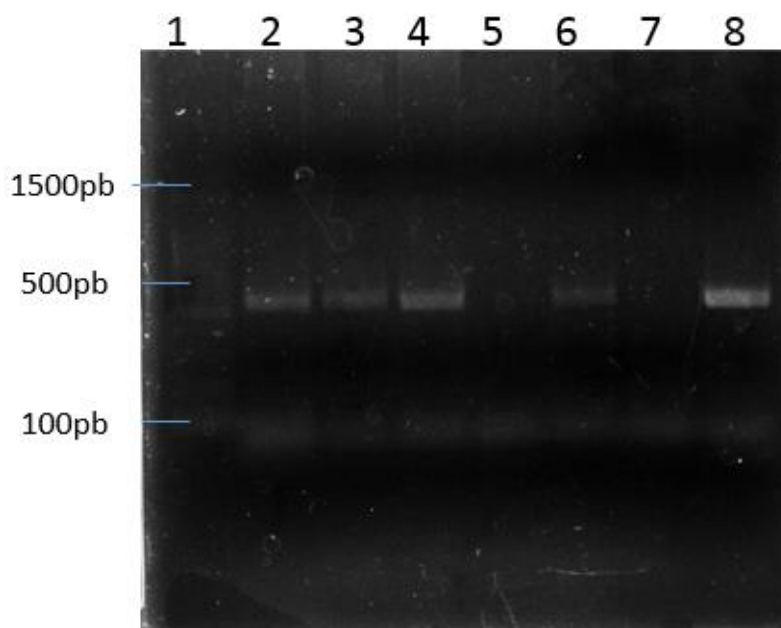


Figura 12. Gel de Agarosa al 1.5%. Carril:1.Marcador de 100pb. 2. Testigo (+), 3,4,6 y 8. Se observa la amplificación del gen *msp5* de *A. marginale* aproximadamente a 458 pb. Carril 5 y 7 muestras (-).

6.2 Amplificación del gen *virB9* de *Anaplasma marginale*

La amplificación del gen *virB9* de *Anaplasma marginale* se mostró aproximadamente a 859 pb como se observa en la figura 13. En un trabajo realizado por López *et al.*, en el 2005, identificaron 21 proteínas de membrana externa entre ellas Virb9, utilizando la técnica de espectrofotometría de masas. Otro trabajo realizado por Araujo *et al.*, (2008), amplificó *virB9* a un tamaño de 840 pb lo cual indica que es un gen conservado en distintas regiones geográficas. López *et al.*, en el 2007, compararon los genes de *virB9* y *virB10* de *A. marginale* cepas St. Maries y Florida encontrando 100% de identidad, pero al comparar *virB10* de *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*, *E. canis* obtuvieron el 60%, 51%, y 51% de identidad.

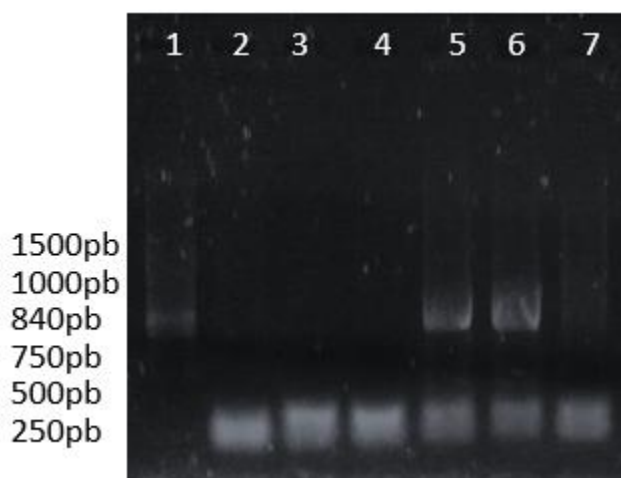


Figura 13. Electroforesis del producto de PCR *virB9*, Carril 1: marcador de 1kb, carril 5,6: Amplificación del gen aproximadamente a 859 pb.

6.3 Amplificación del gen *virB10* de *Anaplasma marginale*

La amplificación del gen *virB10* de *Anaplasma marginale* se observó aproximadamente a 1268 pb como se observa en la figura 14. En un trabajo realizado por López *et al.*, en el 2005, identificaron 21 proteínas de membrana externa entre ellas Virb 9 y 10. En otro trabajo también realizado por López *et al.*,

en el 2007, compararon los genes de *virB9* y *virB10* de *A. marginale* cepas St. Maries y Florida encontrando 100% de identidad, pero al comparar *virB10* de *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*, *E. canis* obtuvieron el 60%, 51%, y 51% de identidad. Araujo *et al.*, en el 2008, amplificó *virB10* en una cepa de Brasil a 840 pb.

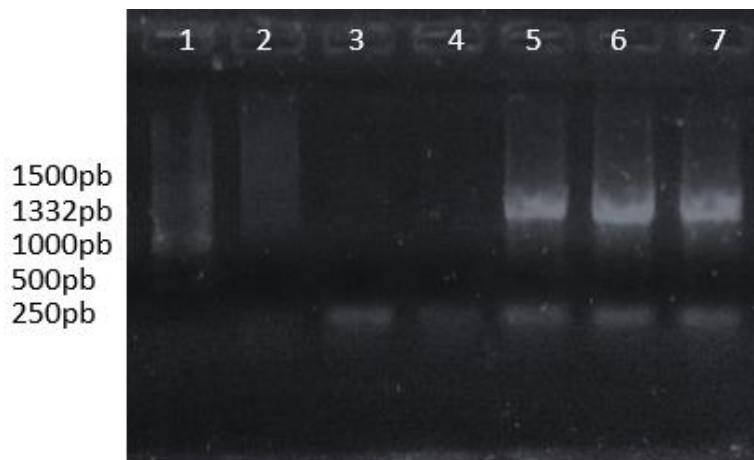


Figura 14. Electroforesis del producto de PCR *virB10* en agarosa al 1%. Carril 1: marcador de 1kb, carriles:5,6,7 amplificación del gen a 1268pb aproximadamente.

6.4 Caracterización del gen *virB9* de *Anaplasma marginale*

Se obtuvo la secuencia del gen *virB9* en aislados de bovinos de Culiacán como se muestra: ::

```
TCCCCTAGCAATACTTAACGGAGTGTTTTACGGGATGTGTGGCACAGTC
TGCCGTAAGCGGTGGTGCACCTGTGTCTGTAGACAGTAGGATCAAACCT
TTGTATACAGCCCGAACGAGATATTTACCGTTGTGTTTAACCACGGGTAT
CACTCGTTTATAGAGTTCTCCAAAGGTGAGACCATAAAAGTGATGGCTAT
GGGAGACAGCGTTCACTGGAAGGTAAAGCCCGTAGATAACAACTGTTCA
TTATGCCACTGGAGAGGGAAGGCAAGACAAATATGCTGGTATAAACCAAC
AAAGGCAGGACCTACCCTTTTGATCTTGTTTCATCGACTGCTGGGCCTGA
TGCCGCGGGTGATAAAGAAAAGGCGGAGCCCCGGGCAGGGGGGAACCCC
CCCCTGGAGAATATCCCCTGCTTCTTCTTTTCACCCGCCGGTAAGTAACA
ACAACTTTAAATAAATAGGAACGTTTGGCAGACTATTGGGCTTTTCCACG
```

ATAAGATTGCTCAGATTGCCTAGCGCGTGTAACAGAGTGTCTTGCCAGA
ATACTTGATTCATCAGATGCTTTGAGCAGAACTAACCCCTTGACCCCTT
GGCTGAGAAAACCTCTAGAGGAGACCTGTCTGAGACATAATCAGTTTAACT
ATTGTCTTCTGTTAATCAAAATGTTAAACTGTCTTCTCCGAATCCGGTC
TTCCCGCGTAGCTGAAAAGTCGCGACCTCCTGGTTACCATGTTATTTTT
GCGGAACGCTGCCCACTTTTTAACTCCTCCTAAAGTCCTCGCGTTCCTTC
GCCTGTGCGGCTGGCTCTGGGGCTTTATGAGTTCAGAAGCAAGTCATTCT
GTTGTAAGG, de 859 pb.

Se hizo el análisis *In Silico* en el programa computacional Blast y se obtuvo que presenta una homología del 95% con *A. marginale* de las cepas Str.Dawn, Gypsy, Habana, Florida, PR1, St. Maries. Pero al compararlas con *A. centrale* de Israel y la cepa clonada ANAADT-L10 mostró 87% y 88% respectivamente.

6.5 Caracterización del gen *virB10* de *Anaplasma marginale*

Se obtuvo la secuencia del gen *virB10* en aislados de bovinos de Culiacán, Sinaloa como se muestra:

GGTCGAGAGACGACGGGTAAAATTCCTTCTTACGTTCCCCGGGCCAAATA
ATGGGTAGGCTGGCGGGTATCTACGTCCTTCTTAACCAAACCCTTCAAAA
ATCCAAAAAATTCCTTTACGGCACCAAAAACAACCTTACCCGGAAGGGAA
AATAACTTTCCCTCTTTCTTCTTCCCCCTTTCCCCCGGAAGTGTCTTT
AATTTCAAACGGCAAAGCAGGTTTTTTTTGAGGCCACAAAACCAGGGCCCA
GGAAACCCCGGCAACCAAACCGGGAACGTAAGGACTTCCCCCTTTTGG
GGGCCAAAAACCCCGGCCCTACCGTCCCAACCCAGCTCATCAGTCCCGGC
TGATTTAATTTGAATGTCTATCCCAGGAGGCAGGATGACCCTAAACCAAC
TCCCAGCCCCCGCGTATTATTGCCGGAGGCGTCAAAAAATTACCTACCT
ATCACCTAAAGCCTTTTCGGAAGCAGGACAATATTGCCCGCTCCCGCGAA
TACATCCCTAGATACTATTGCCCGAAACACTCCGGAAATATCGGAGTTTA
TAGCGGCCCTAAAACCTGCACCAACCAGGTGTCCCTGAAAAACACAAATC
CAGGAGCGCCTCCAGGGTTGCGTAAACCCGGGGGAGAAATTCCCCCCA
CGGGCTCCCCACAAAAGAAGGCGGCCAGGAAGGTGTCCCCACCAATCTT
GGGAGCCGTTTTACCCCTCCCCAAAACAAAAATTCCCGACGGTTTTTTC

TATCCCCCCCCGGAAGAACGCGGCAGCTCAGAATGCCCCCACCCGAAAGGC
TAGGGAAGAAAGAGCGCCGGTCGCAACCCCCCAAAAAACGTGTCAACT
GGAATAAAAACTTCCCCGCAGAGGAAAACATCTGGATTCCCCCCCCGGG
TCTCATATTTGATATAACGTCCCGCCGGTTTGGGACCCAAGGGGGATGTT
CTCCGCCAGATCCCGTCGGGTGTTGAGAGACCAATTTTGGACCAAAAAAG
GGGGGTGGTAAAAACTTAAAAATTTGAAAAAAGTGTA AAAAAGGAGGGG
ACCCCCACTCCGGGGAACCACCCCAAAAAGAAAATTCCTTCTAATACGG
CACAAAAA AAAAAAACC GCGTCTACCTACAACAGAGGACTTCACGCCT
TACAACAATTTTGCTAGGGACGCCAAAAA AAAAAAATTGCGTTCGTCC
CCGCCTCTCCGCTCCGTCGTGGCGGCCTTCGGTCGCGTCCCGCGGCCGGC
CGTACGCCGGGTAGCGTT de 1268 pb.

El análisis *In Silico* no muestra homología con lo descrito en GENBANCK.

Los genes de la membrana externa del SSTIV (*virB9* y *virB10*) de *A. marginale* se pueden postular como candidatos vacúnales ya que han demostrado ser homólogos en distintas regiones geográficas y en trabajos anteriores activan la respuesta inmune específicamente las IgG2 en animales vacunados.

Estudios recientes buscan antígenos inmunorelevantes que se centran en proteínas conservadas, y que sean codificados por genes únicos, que tengan un papel de virulencia y supervivencia de los patógenos dentro del hospedero.

VII. CONCLUSIÓN

La identificación y caracterización de los genes de la membrana externa del sistema homólogo de secreción tipo IV de *Anaplasma marginale* se logró mediante análisis *in vitro* e *in silico*. Siendo el primer trabajo que se reporta en la región norte del país.

VIII. LITERATURA CITADA

- Abbott JR, Palmer GH, Kegerreis KA, Hetrick PF, Howard CJ, Hope JC, Brown WC 2005. Rapid and long-term disappearance of CD4+ T 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
- Albarrak Saleh M, Wendy C. Brown, Susan M. Noh, Kathryn E. Reif, Glen A. Scoles, Joshua E. Turse, Junzo Norimine, Massaro W. Ueti, Guy H. Palmer. 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 (9). Disponible en www.plosone.org.
- Almazán, C., Medrano, C., Ortiz, M. y de la Fuente, J. 2008. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains from an outbreak of bovine anaplasmosis in an endemic area. *Vet. Parasitol.* (158), 103–109.
- Araújo FR, Costa CM, Ramos CAN, Farias TA, De Souza IIF, Melo ESP. 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(2): 186-190. PMID:18425271. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000200010>.
- Aubry, P., Geale, D.W. 2011. A review of bovine anaplasmosis. *Transbound Emerg Dis.* 58 (1): 1 – 30.
- Barbet AF, Yi J, Llundgren A, McEwen BR, Blouin EF, Kocan KM. 2001. Antigenic variation of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 diversity during cyclic transmission between ticks and cattle. *Infect. Immun.* 69:3057-3066.
- Barigye R, Garcia-Ortiz MA, Rojas REE, Rodriguez SD. 2004. Identificación de antígenos IgG2 específicos en tres cepas mexicanas de *Anaplasma marginale*. *Tec. Pecu. Méx.* 42:219-236.
- Baron C, O' Callaghan D, Lanka E. 2002. Bacterial secrets of secretion: EuroConference on the biology of type IV secretion processes. *Mol. Microbiol.* 43:1359-1365.

- Berger, B. R., and P. J. Christie. 1993. The *Agrobacterium tumefaciens virB4* gene product is an essential virulence protein requiring an intact nucleoside triphosphate-binding domain. *J. Bacteriol.* 175:1723- 1734.
- Berger, B. R., and P. J. Christie. 1994. Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens virB* operon: *virB2* through *virB11* are essential virulence genes. *J. Bacteriol.* 176:3646-3660.
- Bettina L., Aguirre M., Gorodner J. 2000. Comparación de técnicas de extracción de ADN para la detección de tripanosoma cruzi mediante la técnica de PCR. Comunicaciones científicas y tecnológicas.
- Bingle LE, BaileyCM, Pallen MJ. 2008.Type secretion: a beginner's guide. *Curr. Opin. Microbiol.* 11:3-8.
- Bock RE, deVos AJ, Kingston TG, Carter PD. 2003. Assessment of a low virulence Australian isolate of *Anaplasma marginale* for pathogenicity, immunogenicity and transmissibility by *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* 118: 121-131.
- Brayton KA, Dark MJ, Palmer GH. 2009. Anaplasma in genome mapping and genomics In *Animal-Associated Microbes*. V. Nene, C. Koles (Eds.) Springer- Verlag Berlin Heidelberg. 85-116.
- 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. USA* 102(3), 844–849.
- Brown WC, Brayton KA, Styer CM, Palmer GH. 2003. The hypervariable region of anaplasma marginale major surface protein 2 (MSP2) contains multiple immunodominant CD4+ T lymphocyte epitopes that elicit variant-specific proliferative and INF- γ responses in MSP2 vaccinates. *J. Immunol.* 170:3790-3798.
- Brown WC, zhu D, Shkap V, McGuire TC, Blouin EF, Kocan KM, Palmer GH.1998. The repertoire of anaplasma marginale antigens recognized by CD4+ T lymphocyte

clones from protectively immunized cattle is diverse and includes major Surface protein 2 (MSP2) and MSP3 . *Infect. Immun.* 66:5414-5422.

- 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. *Veterinary Microbiology.* 124: 107–104.
- Carreño, A.D., Alleman, A.R., Barbet, A.F., Palmer, G.H., Noh, S.M., Johnson, C.M. 2007. In vivo endothelial cell infection by *Anaplasma marginale*. *Vet. Pathol.* 44: 116–118.
- Cascales, E. & P. J. Christie. 2004b. *Agrobacterium* VirB10, an ATP energy sensor required for type IV secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 101: 17228-17233.
- Coetzee, J.F., Apley, M.D., Kocan, K.M., Rurangirwa, F.R., Van Donkersgoed, J. 2005. Comparison of three oxytetracycline regimens for the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infections in beef cattle. *Vet. Parasitol.* 127: 61–73.
- Collins, N.E., Liebenberg, J., de Villiers, E.P., Brayton, K.A., Louw, E., Pretorius, A., *et al.* 2005. The genome of the heartwater agent *Ehrlichia ruminantium* contains multiple tandem repeats of actively variable copy number. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 838–843.
- Corona, B. Rodriguez, M. Martinez, S. 2004. Anaplasmosis Bovina. *Revista Electronica de Veterinaria REDVET.*
- De la Fuente, J., Atkinson, M.W., Naranjo, V., Fernandez de Mera, I.G., Mangold, A.J., Keating, K.A., Kocan, K.M. 2007. Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma ovis* strains. *Vet Microbiol.* 119: 375-381.
- De la Fuente, J., Passos, L.M., Van De Bussche, R.A., Ribeiro, M.F., Facury-Filho, E.J., Kocan, K.M. 2004c. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol* 121: 307-16.
- De la Fuente, J., Torina, A., Naranjo, V., Nicosia, S., Alongi, A., La Mantia, F., Kocan, K.M. 2006b. Molecular characterization of *Anaplasma platys* strains from dogs in Sicily, Italy. *BMC Vet Res* 2, 24.

- Den Hartigh AB, Rolán HG, de Jong MF, Tsolis RM. 2008. VirB3 to VirB6 and VirB8 to VirB11, but not VirB7, are essential for mediating persistence of brucella in the reticuloendothelial system. *J. Bacteriology*. 1990: 4427- 4436.
- Dreher, U.M., Hofmann-Lehmann, R., Meli, M.L., Regula, G., Cagienard, A.Y., Stärk, K.D.C., Doherr, M.G., Filli, F., Hässig, M., Braun, U., Kocan, K.M., Lutz, H. 2005. Seroprevalence of anaplasmosis among cattle in Switzerland in 1998 and 2003: no evidence of an emerging disease. *Vet Microbiol* 107, 71 – 9.
- Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., Rikihisa, y. & Rurangirwa, f. r. 2001. Reorganization of genera in the families rickettsiaceae and anaplasmataceae in the order rickettsiales: unification of some species of ehrlichia with anaplasma, cowdria with ehrlichia and ehrlichia with neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of ehrlichia equi and 'hge agent' as subjective synonyms of ehrlichia phagocytophila. *int j syst evol microbiol*, 51, 2145-65.
- Fernandez, D., T. A. Dang, G. M. Spudich, X. R. Zhou, B. R. Berger, and P. J. Christie. 1996. The *Agrobacterium tumefaciens virB7* gene product, a proposed component of the T-complex transport 70 apparatus, is a membrane-associated lipoprotein exposed at the periplasmic surface. *J. Bacteriol.* 178:3156-3167.
- Filloy A. 2009. The type VI secretions system: a tubular story. *EMBO. J.* 28: 309-310.
- Finlay BB, McFadden G. 2006. Anti-immunology: Evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell.* 124:767-782.
- Fraga, N.J., Rodríguez, J., Fuentes, O., Castex, M., Fernández, C. 2004. Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de tiratomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar. *Rev. Cubana med trop.* 56 (3). 2008 – 13.
- García, O.M.A., Aboytes, T.R., Hernández, S.G., Cantó, A.G.J., Rodríguez, C.S.D. 2000. *Anaplasma marginale*: Diferentes grados de virulencia en dos aislados mexicanos. *Vet. Mex.* 31 (2):157 – 160.

- Gillespie Joseph J., Nicole C. Ammerman, Sheila M. Dreher-Lesnick, M. Sayeedur Rahman, Micah J. Worley, Joao C. Setubal, Bruno S. Sobral, Abdu F. Azad. 2009. An Anomalous Type IV Secretion System in Rickettsia Is Evolutionarily Conserved. PLOS ONE :4 (3). Disponible en www.plosone.org.
- Gonzales- Pedrajo y Dreyfus G. 2003. Sistema de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: Biogénesis flagelar y traslocación de factores de virulencia. Mensaje bioquímico. XXVII:45-63.
- Han S, Norimine J, Palmer GH, mwangi W, Lahmers KK, Brown WC. 2008. Rapid deletion of antigen-specific CD4+T cells following infection represents a strategy of immune evasion and persistence for anaplasma marginale. J. Immunol. 181:7759-7769
- He SY, Nomura K, Whittam TS. 2004. Type III protein secretion mechanism in mammalian and pathogens. Biochem. Biophys. Acta. 1694:181-206.
- Hofmann-Lehmann, R., Meli, M.L., Dreher, U.M., Gonczi, E., Deplazes, P., Braun, U., Engels, M., Schupbach, J., Jorger, K., Thoma, R., Griot, C., Stark, K.D., Willi, B., Schmidt, J., Kocan, K.M., Lutz, H. 2004. Concurrent infections with vector-borne pathogens associated with fatal hemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland. J Clin Microbiol. 42: 3775-80.
- Holland IB, Schmitt L, Young J. 2005. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway. Mol. Membr. Biol. 22:29-39.
- Inokuma H. 2007. Vectors and reservoir hosts of Anaplasmatataceae. In: Raoult D, Parola P, eds. Rickettsial Diseases. Taylor & Grancis Group LLC, New York; 199–212.
- Jakubowski, S. J., V. Krishnamoorthy, and P. J. Christie. 2004. Agrobacterium tumefaciens VirB6 domains direct the ordered export of a DNA substrate through a type IV secretion system. J. Mol. Biol.. 341:961-977.
- Jiménez O.R., Mosqueda G.J.J., Sahagún R.A., Rojas R.E.E., Oviedo O.N. y Rodríguez S.D. 2009. ANALISIS “IN SILICO” DE LA PROTEÍNA VIRB9 en cepas mexicanas de *Anaplasma marginale*. VIII Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria Mérida, Yucatán, México.

- Jiménez, O.R., Rodríguez, C.S.D., Rosario, C.R., Orozco, V.L.E., de la Fuente, J. 2008. *Anaplasma marginale*: Análisis de las secuencias del fragmento variable del gen *msp1a* y del gen *msp4* de cuatro nuevas cepas Mexicanas. *Téc Pecu Méx* 46: 69-78.
- Juhas M, Crook DW, Hood DW. 2008. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell. Microbiol.*10: 2377-2386.
- Kano FS, Vidotto O, Pacheco RC, Vidotto MC. Antigenic characterization of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. *Vet Microbiol.* 2002. 87(2): 131-138. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00051-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00051-2).
- Knowles, D.P., Torioni de Echaide, S., Palmer, G.H., McGuire, T.C., Stiller, D., McElwain, T.F. 1996. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identified persistently infected cattle. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2225–2230.
- Kocan KM, De la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol.* 2010. 167(2-4): 95-107. PMID:19811876. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.012>.
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Blouin, E.F. 2008. Advances toward understanding the molecular biology of the *Anaplasma*-tick interface. *Front Biosci* 13, 7032-7045.
- Kocan, K.M., Zivkovic, Z., Blouin, E.F., Naranjo, V., Almazan, C., Mitra, R., de la Fuente, J. 2009. Silencing of genes involved in *Anaplasma marginale*-tick interactions affects the pathogen developmental cycle in *Dermacentor variabilis*. *BMC Dev Biol.* 9: 42.
- Kocan, KM, De la fuente J, Blouin E. F and. Garcia-Garcia J. C. 2004. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales : Anaplasmataceae): recent advances in defining host pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. Cambridge University Press: S286.
- Lai, E-R., and C. I. Kado. 2000. The T-pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *Trends. Microbiol.* 8:361-369.
- León A. M, Ribera C. H, Villegas, F.2000. *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* EN BOVINOS (Municipios de Roboré y San José de Chiquitos del Departamento de Santa Cruz). Tesis de Grado presentada por León, A. Marlene.

- Lin, Q., Rikihisa, Y., Massung, R.F., Woldehiwet, Z., Falco, R.C. 2004. Polymorphism and transcription at the p44-1/p44-18 genomic locus in *Anaplasma phagocytophilum* strains from diverse geographic regions. *Infect Immun.* 72: 5575 – 81.
- Liu, Z., Luo, J., Bai, Q., Ma, M., Guan, G., Yin, H. 2005. Amplification of 16S rRNA genes of *Anaplasma* species in China for phylogenetic analysis. *Veterinary Microbiology*, 107: 145–148.
- López JE, Palmer GH, Brayton KA, Dark MJ, Dark MJ, Leach SE, et al. Immunogenicity of *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins in a protective outer membrane vaccine. *Infect Immun* 2007. 75(5): 2333-2342. PMID:17339347 PMCID:1865776. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00061-07>.
- López JE, Siems WF, Palmer GH, Brayton KA, McGuire TC, Norimine J, et al. Identification of novel antigenic proteins in a complex *Anaplasma marginale* outer membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping. *Infect Immun* 2005. 73(12): 8109- 8118. PMID:16299305 PMCID:1307060. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.12.8109-8118.2005>.
- Molad, T., Mazuz, M.L., 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. *Veterinary Microbiology* 113: 55–62.
- Morzaria, S.P., 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. *Parassitologia* 41 Suppl. 1: 73 – 80.
- Noaman, V., Shayan, P. 2010b. A new PCR – RFLP method for detection of *Anaplasma marginale* based on 16S Rna. *Vet Res Commun.* 34: 43 – 50.
- Noh SM, Brayton KA, Knowles DP, Agnes JT, Dark MJ, Brown WC, Baszler TV y Palmer GH. 2006. Differential expression and sequence conservation of the *Anaplasma marginale* msp2 gene superfamily outer membrane proteins. *Infect Immun* 74: 3471–3479.

- Palmer G.H, Wendy C. Brown, Susan M. Noh & Kelly A. Brayton. 2012. Genome-wide screening and identification of antigens for rickettsial vaccine development. *F.E.M.S. Immunol Med Microbiol* 64: 115–119.
- Palmer GH, Rurangirwa FR, Kocan KM, Brown WC. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitol Today*. 1999; 15(7): 281-286. [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01469-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01469-6).
- Palmer GH., Brown WC., Rurangirwa FR. 2000. Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Microbes. Infect.* 2 (2):167-176.
- Palmer, G.H., McGuire, T.C. 1984. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *J. Immunol.* 133. 1010-1015.
- Pei J, Wu Q, Kahl-McDonagh M, Ficht TA. 2008. Cytotoxicity in macrophages infected with rough *Brucella mutants* is type IV secretion system dependent. *Infect. Immun.* 76:30-37.
- Potgieter, F.T., Stoltsz, W.H. 1994. Anaplasmosis. In: Coetzer, J.A.W., Thompson, G.R., Tustin, R.C. (Eds.), *Infectious Diseases of Livestock- With Special Reference to Southern Africa*. Oxford University Press, Cape Town, South Africa, pp. 408–430.
- Rances E, Voronin D, Tran- Van V, Mavingui P. 2008. Genetic and functional characterization of the type IV secretion system in *Wolbachia*. *J. Bacteriol.* 190:5020-5030.
- Rikihisa Yasuko, Mingqun Lin y Hua Niu. 2010. Type IV secretion in the obligatory intracellular bacterium *Anaplasma phagocytophilum*. *Cellular microbiology*: 12: 1213–1221.
- Rodríguez, S.D., García, O.M.A., Jiménez, O.R., Vega, C.A., Murguía. 2009. Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in México. *Infect Genet Evol.* 9: 1092-101.
- Rodriguez-Vivas, R.I., Mata-Mendez, Y., Perez-Gutierrez, E., Wagner, G. 2004. The effect of management factors on the seroprevalence of *Anaplasma marginale* in *Bos indicus* cattle in the Mexican tropics. *Trop Anim Health Prod.* 36: 135-143.

- Rymaszewska, A., Grenda, S. 2008. Bacteria of the genus *Anaplasma* – characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. *Veterinarni Medicina*. 53. (11): 573 – 584.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. En: *Molecular cloning. Laboratory manual*. 2da. edition. Cold spring Harbor laboratory press.
- Sandkvist M. 2001. Biology of type II secretion. *Mol. Microbiol.* 40:2771-283.
- Scoles GA, Miller JA, Foil LD. 2008. Comparison of the efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: ixodidae) with mechanical transmission by the horse fly, *Tabanus fuscicostatus* Hine (Diptera: Muscidae). *J. Med. Entomol.* 45:109-114.
- Shebish, E., Vemulapalli, R., Oseto, C. 2012. Prevalence and molecular detection of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from Puntarenas Province, Costa Rica. *Vet Parasitol.* 188 (1 -2): 164 – 7.
- Singh H., Jyoti, Haque M, Singh N.K., Rath S.S. 2011. Molecular detection of *Anaplasma marginale* infection in carrier cattle. *Ticks and Tick – borne Diseases* 3: 55 – 58.
- Stokka, G.L., Falkner, R., Van Boening, J. 2000. *Anaplasmosis*. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service. Obtenido en Enero del 2013 en <http://www.ksre.ksu.edu/bookstore/pubs/MF2212.pdf>.
- Sutten Eric L., Junzo Norimine, Paul A. Beare, Robert A. Heinzen, Job E. Lopez, Kaitlyn Morse, Kelly A. Brayton, Joseph J. Gillespie and Wendy C. Brown. 2010. *Anaplasma marginale* Type IV Secretion System Proteins VirB2, VirB7, VirB11, and VirD4 Are Immunogenic Components of Protective Bacterial Membrane Vaccine *Infect. Immun.* 78:(3).1314.
- Thrusfield, M. 1990. *Epidemiología veterinaria*. ACRIBA, S.A. Zaragoza, España. 192-193.
- Vidotto, E.J. Venâncio and O. Vidotto. 2008. Cloning, sequencing and antigenic characterization of rVirB9 of *Anaplasma marginale* isolated from Paraná State, Brazil. *Genet. Mol. Res.* 7 (2): 460-466.

- Visser, E.S., McGuire, T.C., Palmer, G.H., Davis, W.C., Shkap, V., Pipano, E., Knowles, D.P. 1992. The *Anaplasma marginale* msp5 gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infect. Immun.* 60, 5139–5144.
- Ybanez, A.P., Sivakumar, T., Ybanez, R.H., Ratilla, J.C., Perez, Z.O., Gabotero, S.R., Hakimi, H., Kawazu, S.I., Matsumoto, K., Yokoyama, N., Inokuma, H. 2012. First Molecular Characterization of *Anaplasma marginale* in Cattle and *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* Ticks in Cebu, Philippines. *J Vet Med Sci.* 5: 1347-7439.
- Yeo HG y Waksman, G. 2004. Unveiling molecular scaffolds of type IV secretion system. *J. Bacteriol.* 186:1919-1926.
- Yeo., H. J., S. N. Savvides, A. B. Herr, E. Lanka, and G. Waksman. 2000. Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Mol. Cell.* 6:1461- 1472.
- Zhong Z, Wang Y, Qiao F, Wang Z, Du X, Xu J, ZHAO j, Qu Q, Dong S, Sun Y, Huang L. Huang K, Chen Z. 2009. Cytotoxicity of brucella smooth strain for macrophages is mediated by increased secretion of the type IV secretion system. *Mycrobiology.* 155:3392-402.
- Zivkovic, Z., Nijhof, A.M., de la Fuente, J., Kocan, K.M., Jongejan, F. 2007. Experimental transmission of *Anaplasma marginale* by male *Dermacentor reticulatus*. *BMC Vet Res.* 3: 32.
- Zupan J. R., D. Ward, and P. Zambryski. 1998. Assembly of the VirB transport complex for DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Curr. Op. Microbiol.* 1:649-655.