

TESIS
ED 2001
T3

República Bolivariana de Venezuela
Universidad Católica Andrés Bello
Facultad de Humanidades y Educación
Escuela de Educación
Departamento de Ciencias Biológicas



ESTUDIO PRELIMINAR DE LA ANAPLASMOSIS OVINA EN VENEZUELA
TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Tutor: M.V., M.Sc. Armando Reyna Bello

Lucinda Mra. Tavares Marques.

Caracas, Octubre de 2.001

AGRADECIMIENTOS

Ante todas las cosas, quiero agradecer a Dios por ponerme en el camino la oportunidad de hacer este trabajo porque no solamente me ha ayudado a crecer profesionalmente sino también a hacerme más fuerte en lo personal.

Quiero agradecerle a mis padres por todo el esfuerzo que han hecho para que yo pudiese llegar a escribir estas líneas, por su paciencia y el apoyo que me cuando las cosas no salían tan bien y por compartir mis alegrías ante mis éxitos como al igual a mis demás familiares.

A Armando por ser más que mi tutor, por ser mi amigo incondicional dentro y fuera del laboratorio, por nuestras largas conversaciones con café de todo y de nada pero sobre todo de la MSP5, por la paciencia que ha tenido conmigo al explicarme, y enseñarme tantas técnicas que desconocía y por enamorarme del “mundo de la ciencia”. Gracias por ayudarme a formar parte de tu equipo, ya me he convertido en una “anplasmosa”, estoy segura que seguiremos siendo el mismo buen equipo y que llegaremos a tener muchísimos éxitos en este campo que me inspiró.

Debo agradecer también a la profesora Iselen por haberme abierto las puertas del IDECYT, sin ella dudo mucho que pudiese realizar este trabajo.

También debo darle las gracias a Sta. Rita por haberme tendido la mano cuando las cosas se mostraban muy difíciles. A mis amigos que me han ayudado y a todas las personas que han estado vinculadas con la realización de este trabajo.

A todos, muchas GRACIAS.....

Lucinda Tavares.

“Si en verdad amas la vida, no derroches tu tiempo porque éste es la materia prima de la cual la vida está hecha”.

Tanto el triunfador, como el fracasado, cuentan con 24 horas en sus días.

La única diferencia entre ellos, radica en la forma como utilizan su tiempo...”

Benjamín Franklin

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE DE FIGURAS	7
CONFORMIDAD DEL TUTOR	9
INTRODUCCIÓN	10
JUSTIFICACIÓN.....	10
PROBLEMA.....	11
INVESTIGACIÓN.....	11
OBJETIVOS.....	12
GENERAL.....	12
ESPECÍFICOS.....	12
MARCO TEÓRICO	13
MATERIALES Y MÉTODOS	23
A) Inóculo de Anaplasma.....	24
B) Infección experimental.....	24
Síntomas clínicos observados:.....	25
Hematología:.....	25
Hematocrito:.....	26
Técnica de acridina-bromuro de etidium:.....	26

C) Sueros Ovinos experimentales.....	27
D) Cultivo de la bacteria recombinante. (Sambrok S. y col, 1.989)	27
E) Aislamiento de una colonia simple de E. coli portadora del plásmido pAR1903 que contiene el gen <i>mSP5</i> . (Reyna-Bello y col, 1.998)	28
F) Purificación de la MSP5. (Reyna-Bello y col, 1.998).....	29
1.- Preparación de las E. coli	30
2.- Elusión a través de la columna	31
G) Determinación de la cantidad de proteínas utilizando el método de Lowry.....	33
H) Migración de proteínas por electroforesis.....	37
I) Transferencia del gel de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa. (Cloackaert y col, 1.996).	39
J) Inmunotinción para el reconocimiento la MSP5 de <i>Anaplasma marginale</i> en sueros ovinos (Cloackaert y col., 1.996).	41
CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES	64
BIBLIOGRAFÍA	69
ANEXOS	76

ÍNDICE DE FIGURAS

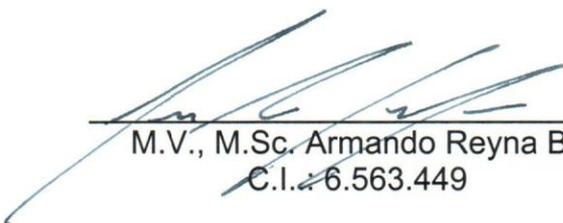
No. de figura	Descripción	No. de página
1	<i>A. marginale</i> bajo microscopio	14
2	Árbol filogenético del <i>A. marginale</i>	16
3	Ciclo intraeritrocítico del <i>A. marginale</i>	21
4	Diagrama experimental	23
5	Diagrama de purificación	30
6	Tabla de determinación de proteínas	36
7	Gel SDS-PAGE de comparación de JM 109 y pAR 1903	46
8	Gel SDS-PAGE con pAR 1903, estimulada con IPTG	50
9	Concentraciones resultantes de la purificación	51
10	Análisis por SDS-PAGE de los eluatos de la columna de purificación	53
11	Inmunotinción de 14 sueros ovinos provenientes de la estación experimental "Zambrano".	55
12	Resultados de los análisis hechos del ovino, tomando en cuenta su temperatura corporal	58

13	Resultados de los análisis hechos del ovino, tomando en cuenta hematocrito	59
14	Resultados de los análisis hechos del ovino, tomando en cuenta rikettsemia	60
15	Inmunotinción de sueros de ovinos infectados experimentalmente	63

CONFORMIDAD DEL TUTOR

En mi carácter de Tutor del Trabajo Especial de Grado titulado: **"ESTUDIO PRELIMINAR DE LA ANAPLASMOSIS OVINA EN VENEZUELA"** realizado por Lucinda María Tavares Marques para optar al título de Licenciado en Educación, Mención Ciencias Biológicas, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a su defensa oral y evaluación por parte del Jurado examinador designado.

En Caracas, a los ocho días del mes de Octubre de 2.001.



M.V., M.Sc. Armando Reyna Bello
C.I. 6.563.449

INTRODUCCIÓN

JUSTIFICACIÓN

En Venezuela, la proteína de origen animal es casi exclusivamente de origen bovino, por lo que es importante buscar nuevas alternativas para la alimentación. Por ello, se desea trabajar con ovinos como especie alterna para el aporte nutricional.

Por otra parte, la anaplasmosis conjuntamente a la babesiosis y la tripanosomiasis constituyen uno de los principales obstáculos para el desarrollo de las ganaderías tropicales. Afectando no únicamente los animales nativos sino también impidiendo la importación de animales de alto valor genético, puesto que estos generalmente son de zonas libres de estas enfermedades y por ende altamente susceptibles a ellas (Uuilenberg, 1.995; Rivera, 1.996).

Específicamente en Venezuela, el 47,6% de su ganadería bovina se encuentra afectada por la anaplasmosis y se estima que ocasiona un alto porcentaje de pérdida de producción bovina e incluso de muertes especialmente en animales bajo condiciones de stress (García y Giardina, 1.990).

Curiosamente, esta enfermedad no ha sido debidamente estudiada en ovinos de Venezuela, por lo que no se conoce ni los aspectos clínicos de esta enfermedad ni su posible impacto en la ganadería.

Una de las maneras para determinar la posible presencia de una enfermedad en una población, es a través de la detección de anticuerpos específicos que reconozcan al agente causal (métodos serológicos). Por esta razón, se usará la técnica serológica de inmunotinción para detectar anticuerpos anti-*Anaplasma marginale* con la finalidad de identificar la posible presencia esta enfermedad en ovinos de Venezuela.

PROBLEMA

Desarrollo de un método de diagnóstico para determinar la presencia de la anaplasmosis ovina en Venezuela.

INVESTIGACIÓN

Tipo de investigación: Exploratoria según la clasificación de Dankhe (citado por Hernández y col., 1.998).

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la presencia de la anaplasmosis ovina en Venezuela con la técnica de inmunotinción.

ESPECÍFICOS

- Purificar la proteína recombinante MSP5 de *Anaplasma marginale*.
- Estandarizar la técnica de inmunotinción para la detección de anticuerpos ovinos.
- Determinar la presencia de anticuerpos anti-MSP5 en sueros ovinos

MARCO TEÓRICO

La anaplasmosis es una enfermedad infecciosa y trasmisible del ganado, que se manifiesta por una anemia progresiva asociada con la presencia de cuerpos intraeritrocíticos denominados *Anaplasma sp* (ver figura 1). Theiler (1.910) denominó este parásito con el término *Anaplasma* que indica que el agente es desprovisto de citoplasma.

Esta enfermedad fue observada por primera vez en conjunto con el estudio de la piroplasmosis en el ganado por Smith y Kilborne (1.893), citado por Ristic (1.960). Estos investigadores registraron la incidencia de “cuerpos intra-corporales”, los cuales también llamaron “cuerpos parecidos a coccus o “puntos marginales”, en los glóbulos rojos de la sangre del ganado afectado. Para ese entonces, estos cuerpos intracorporales fueron considerados como un estado del ciclo de vida del *Piroplasma bigemicum*, actualmente *Babesia bigemina*.

Theiler (1.910) en el transcurso de sus estudios de inmunidad cruzada, demostró que la anaplasmosis es una enfermedad distinta a la

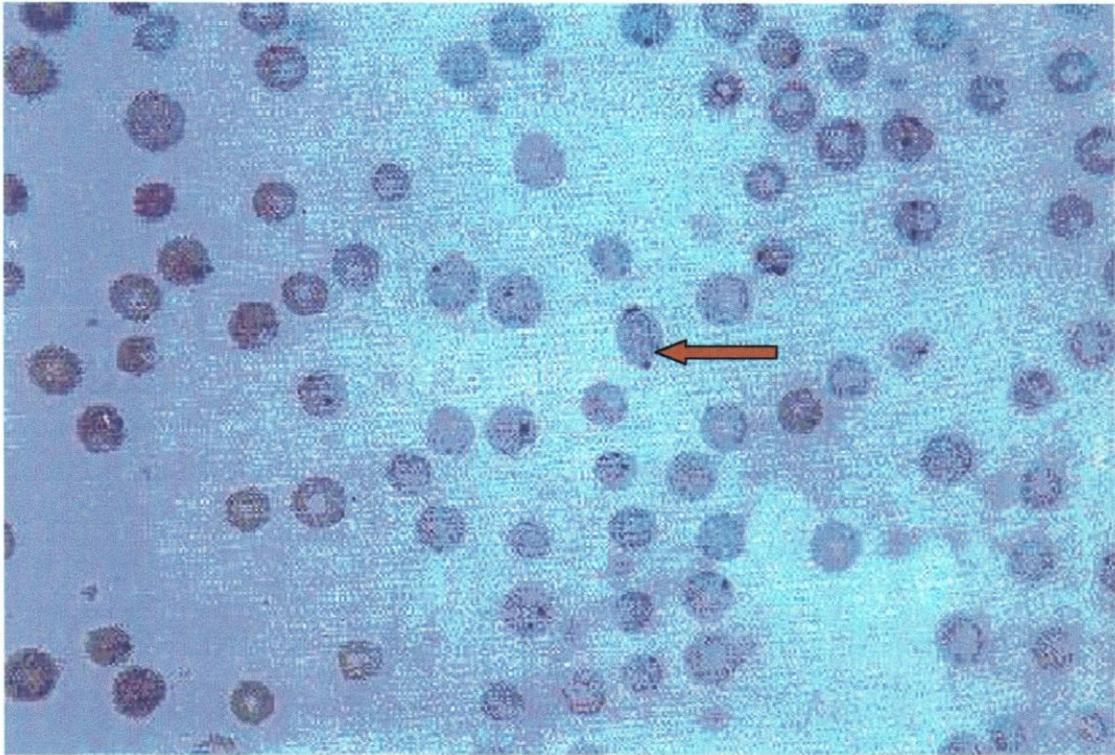


Fig.1. *Anaplasma marginale*. Frotis delgado de sangre en coloración Giemsa bajo microscopio a 1000X.

piroplasmosis. Por ello, él concluyó que los “cuerpos cromáticos” o también llamados “puntos marginales” presentes en los eritrocitos de animales afectados, representaban un nuevo género de protozoarios –El *Anaplasma*–.

Anteriormente, el género *Anaplasma* estaba clasificado dentro de la Familia Anaplasmataceae perteneciente al Orden de las Rickettsias (Ristic y Kreier, 1.984), pero a partir de estudios más recientes de 16S RNA, el género *Anaplasma* se clasificó dentro de las α -proteobacterias, genogrupo II de las Ehrlichias perteneciente al orden de las Rickettsias (Walker y Dumler, 1.996; Gray, 1.998; Inokuma y col, 2.001).

Desde lo anunciado por Theiler en 1.910, la anaplasmosis ha sido reportada en los países tropicales y sub-tropicales de todo el mundo, siendo reconocida como una entidad específica e infecciosa que amenaza la industria ganadera de estas regiones (Ristic 1.960).

Ristic (1.960), describió que esta enfermedad febril ocurría a finales de verano y principios de otoño y que atacaba frecuentemente al ganado adulto. Además, señaló los siguientes síntomas: elevación de la temperatura de 104-105 °F, disminución en la cantidad de leche,

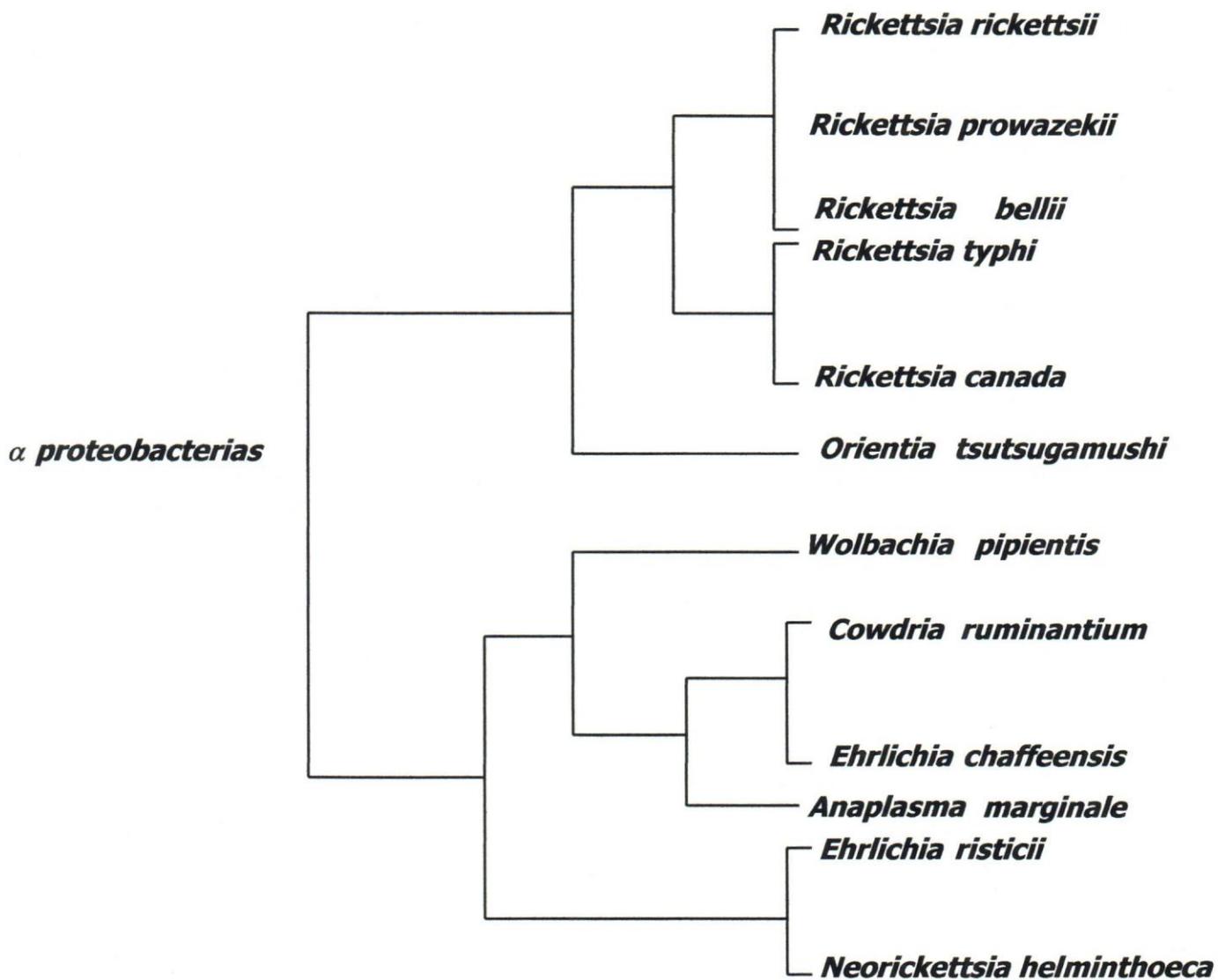


Fig. 2. Árbol filogenético de *Anaplasma marginale* según Walker y Dumler, 1.996; Gray, 1.998; Inokuma y col, 2.001.

constipación o diarrea, pérdida de peso, taquipnea y temblores musculares. Otros autores indican que la anaplasmosis causa una anemia rápida y progresiva llegando a perder desde el 60%-65% de los glóbulos rojos (Jones y Brock, 1.966). La clínica de esta enfermedad está relacionada directamente con la edad y generalmente se presenta en bovinos de 1-2 años o a mayor edad. Incluso, es frecuente en vacas sobre los 3 años, preñadas o en lactación (Rivera, 1.996).

En ovinos, esta enfermedad se caracteriza igualmente por una anemia que puede variar de ligera a severa. Incluso, en algunos casos la anaplasmosis ovina puede conllevar a la muerte de los animales afectados. Esta enfermedad en ovinos ha sido reportada principalmente en África, aunque también en el sureste de Europa se han observado algunos brotes. Así mismo, a mediados del siglo pasado, fue reportada la enfermedad en Estados Unidos, Rusia y en China (Ristic, 1.960).

Curiosamente, los ovinos no son clínicamente afectados de manera severa por al *Anaplasma marginale* pero si por el *Anaplasma ovis*. En cambio, los bovinos presentan una resistencia natural al *Anaplasma ovis* (Ristic, 1.960).

La anaplasmosis puede ser transmitida de un rumiante a otro de dos maneras diferentes: biológicamente por garrapatas o mecánicamente por objetos contaminados con sangre o a través del aparato bucal de los

mosquitos (Kocan, 1.995). Rivera (1.996), señala que las principales formas de transmisión, corresponden a la transferencia mecánica de eritrocitos parasitados en las piezas bucales de insectos hematófagos o a la transmisión biológica del parásito por garrapatas, durante su fase de alimentación. Estas garrapatas principalmente del género *Dermacentor sp*, pueden alimentarse de la sangre parasitada de un animal enfermo y posteriormente, cambiar de hospedero a un rumiante sano, transmitiendo así el *Anaplasma sp*.

En las garrapatas, el desarrollo de *Anaplasma*, tiene lugar dentro de las vacuolas parasitarias donde experimentan un ciclo de desarrollo que da lugar a dos formas morfológicas. La primera, es la forma reticular donde ocurre la multiplicación y división por fisión binaria, para tomar la segunda forma morfológica llamada "forma densa" donde crece el organismo. La infección inicial y desarrollo del *A. marginale* en las garrapatas ocurre en las células epiteliales del intestino medio y termina en las glándulas salivales. Por lo que, los principales sitios de infección son las glándulas salivales y las células que conforman su intestino (Kocan, 1.995).

En bovinos, el ciclo eritrocítico de *A. marginale* se inicia con la adherencia del *Anaplasma* al glóbulo rojo, en segundo lugar el eritrocito invagina a la bacteria en una estructura vesicular. Posteriormente, esta ehrlichia comienza a dividirse por fisión binaria, induciendo cambios en la

membrana eritrocítica y en la densidad citoplasmática, lo que trae como consecuencia la formación de poros por donde se liberan los parásitos para, a su vez, infectar a otras células (ver figura 3) (Giardina y col, 1.983).

El conocimiento sobre la prevalencia e incidencia de la anaplasmosis bovina en una finca o área en particular, es de singular relevancia, puesto que es una ayuda importante para el médico veterinario en la conducción del diagnóstico de esta enfermedad. Para facilitar el diagnóstico, es necesario considerar si la presentación de brotes es estacional o no y si posiblemente se incrementan al inicio del período de lluvia o a finales del mismo, por aumento de la población de vectores, o bien luego de la movilización o exposición de animales en áreas enzoóticas, o de la realización de ciertas prácticas de manejo como vacunaciones, descorne, desparasitaciones, etc. (Rivera, 1.996).

Por esto, el diagnóstico de esta enfermedad es vital y puede realizarse usando diferentes metodologías. Estas, las pudiéramos reunir en tres grupos, el diagnóstico clínico de la enfermedad, métodos parasitológicos directos y métodos parasitológicos indirectos. El diagnóstico clínico de la enfermedad, se basa en determinarla a través de los diferentes signos y síntomas que presenta esta enfermedad, tales como la fiebre, anemia, taquipnea, pérdida de peso y temblores musculares. El problema de usar esta metodología consiste en que es muy imprecisa y tiende a confundirse

con otras enfermedades causadas por hemoparásitos (tripanosomiasis o babesiosis) (Giardina y García, 1.990).

Para un diagnóstico más preciso, se ofrecen las técnicas parasitológicas directas e indirectas. Los diagnósticos parasitológicos directos, son aquellos que detectan directamente al parásito a través de estudios postmortem (usando frotis de órganos, exudados, etc) o por procedimientos de laboratorio tales como sondas de ADN, frotis coloreados con acridina-naranja, PCR, Giemsa, etc. (Caballero, 1.993; Rivera, 1.996). Los métodos parasitológicos indirectos son aquellos que detectan, indirectamente, la presencia del parásito tales como Western Blot (inmunotinción), fijación de complemento, aglutinación en placas, ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) (Ristic, 1.960; Ndung'u y Col, 1.995; Rivera, 1.996; Visser y Col, 1.992).

Han sido identificados varios polipéptidos de superficie de membrana de *A. marginale* como antígenos inmunodominantes denominados MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 y MSP5 (Palmer y Mc.Guire, 1.984; Tebele y Col, 1.991).

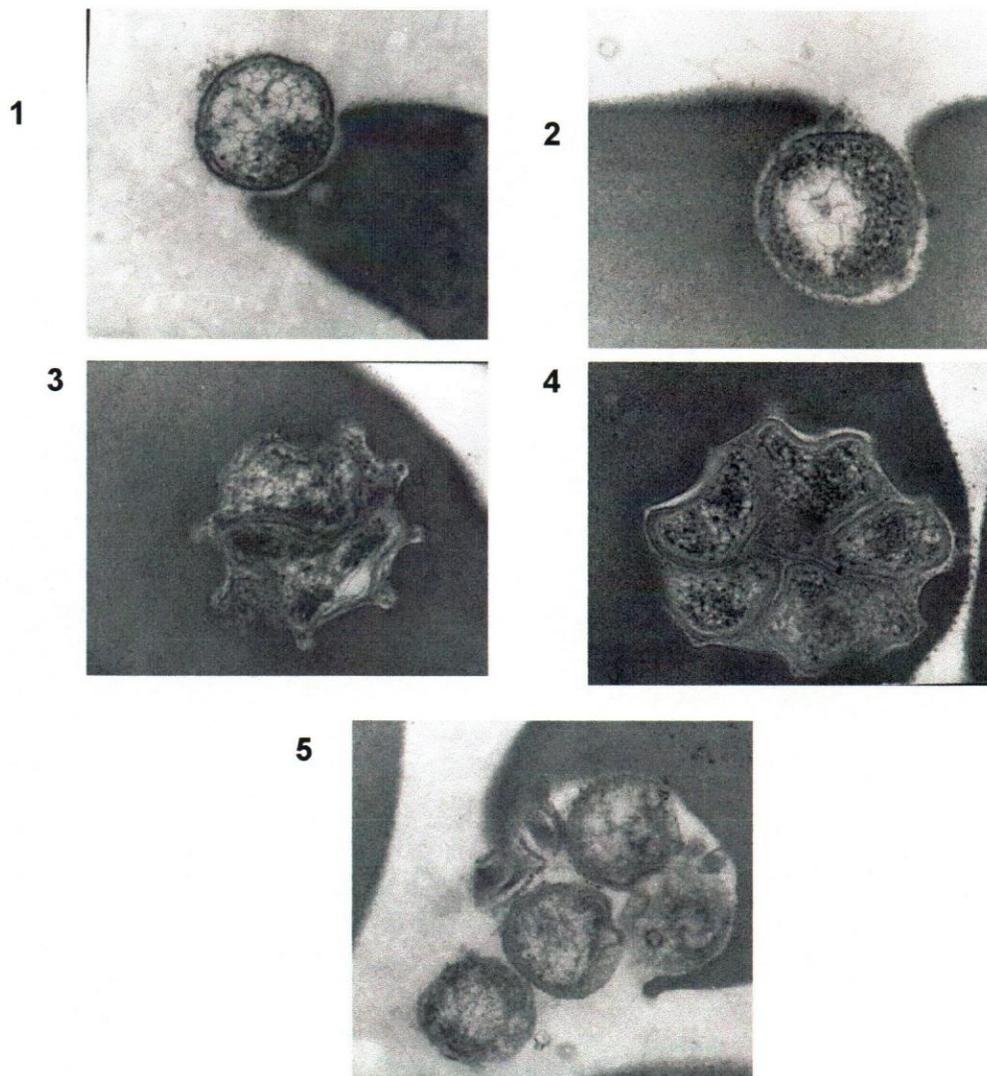


Figura 3. Microscopía electrónica del ciclo de *A. marginale* en el eritrocito. 1. Adhesión de la unidad infecciosa al eritrocito. 2. Eritrofagocitosis. 3 y 4. División por fisión binaria. 5. Proceso inverso a la eritrofagocitosis. (Fotos gentilmente cedidas por Antonio Bretaña y Salvador Giardina).

El último que ha sido descubierto, la MSP5 (Tebele y Col, 1.991; Visser y Col, 1.992) es un dímero muy conservado en todas las cepas de *Anaplasma marginale* estudiadas hasta el presente e incluso en *A. central* y *A. ovis*. (Visser y col, 1.992; Knowles y col, 1.996; Ndung'u y Col, 1.995; Reyna-Bello y col, 1.998). Este péptido, ha sido señalado como una excelente herramienta diagnóstica en la anaplasmosis bovina, ovina y caprina, tanto en los Estados Unidos como Brasil, Australia, África e incluso Venezuela (Visser y Col, 1.992; Ndung'u y Col, 1.995; Vidotto y Col, 1.998; Reyna-Bello, 1.998; Molloy y Col, 1.999). Tal es el caso de un estudio realizado en Oregon, E.U.A. donde la MSP5 fue utilizada en un ELISA competitivo y los resultados se contrastaron con la técnica de PCR, en zonas libres de *A. marginale* y donde es endémica la anaplasmosis. Como resultado, se demostró que había una gran homología entre ambas técnicas (Torioni y col, 1.998).

Debido a estos trabajos aquí descritos que demuestran la capacidad inmunogénica de la proteína MSP5 en Venezuela y el mundo, escogimos esta proteína clonada y expresada en *E. coli* para iniciar un trabajo preliminar en el diagnóstico de la anaplasmosis ovina en Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diagrama experimental



Fig. 4. Diagrama experimental

La metodología que será utilizada para la realización del trabajo especial de grado, consta de los siguientes pasos:

A) Inóculo de Anaplasma

Con un tubo al vacío que contenía anticoagulante EDTA (etilenodiaminotetraacetato), se realizó una punción intravenosa y se sustrajo 2 ml de sangre de un becerro infectado experimentalmente con *A. marginale* que presentaba una parasitemia del 8%. Este becerro fue inoculado previamente con una cepa de *A. marginale* obtenida por la Universidad Simón Bolívar, localizado en la localidad de Yaracal, Estado Falcón. Nos referiremos a esta cepa a continuación con el nombre de "cepa Yaracal".

B) Infección experimental

Un cordero de aproximadamente 4 meses de edad mantenido en el bioterio de la Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez con alimento y agua *ad libitum*, fue infectado, por vía intravenosa, con 2 ml de

sangre proveniente de un becerro inoculado con la cepa Yaracal, utilizando para ello una jeringa esterilizada.

Previamente a la infección experimental la presencia de hemoparásitos fue controlada por ELISA, inmunotinción y frotis, encontrándose libre de anaplasmosis, babesiosis y tripanosomiasis.

Síntomas clínicos observados:

Se observó diariamente la condición del animal prestando especial atención al consumo del alimento, agua, temperatura y respiración.

Hematología:

Periódicamente, se tomaban de la vena yugular ayudado con una aguja Vacutaner 2 tubos de sangre, uno en presencia de EDTA como anticoagulante y el otro sin anticoagulanete. El tubo sin presencia de anticoagulante, se dejó en reposo por 1 hora y luego se centrifugó a 2000 Xg por 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se descartó el coágulo y finalmente se trasvasó el suero a un tubo limpio para su preservación a -20°C hasta su uso.

El tubo con EDTA conteniente de sangre, se utilizó para realizar hematocrito y frotis coloreado con acridina-naranja-bromuro de ethidium (quien tiñe la superficie celular).

Hematocrito:

Se llenó $\frac{3}{4}$ de dos tubos capilares con sangre (se hizo por duplicado) y se tapó uno de sus extremos con plastilina. Luego, se centrifugaron los tubos capilares a 3600 Xg por 5 minutos y se midieron los hematocrito con la ayuda de una tabla porcentual.

Técnica de acridina-bromuro de etidium:

Siguiendo el protocolo de Caballero (1.996), se mezclaron 95 μ l de sangre del tubo con EDTA y 5 μ l de la mezcla de acridina naranja-bromuro de ethidium en tubo de centrífuga de 1ml y se agitó. Se tomó 20 μ l de la mezcla y se dejó correr en forma de gota, a través de un portaobjeto con el fin de hacer un frotis. Este se hizo por duplicado y se dejaron secar.

Luego, estos frotis se observaron en un microscopio de luz ultravioleta y se realizó el conteo de eritrocitos infectados con *A. marginale* con la ayuda de un contador de células, determinando así, el porcentaje de ricketsemia.

C) Sueros Ovinos experimentales

Se usaron 14 sueros ovinos que tenían sintomatología característica de enfermedades causadas por hemoparásitos, provenientes del estado Falcón de la estación experimental "Zambrano" de la Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda.

D) Cultivo de la bacteria recombinante. (Sambrok S. y col, 1.989)

Usando el cloruro de Sodio (5 grs.), Triptofano (10 grs.), extracto de levadura (5 grs.) y agua destilada hasta completar un litro, se realizó el medio de cultivo LB (Luria Bertani). Este medio se esterilizó en el equipo automático de esterilización por 20 minutos alcanzando una temperatura de 121°C a 1,5 atmósferas. Luego de enfriarse, se añadió a este medio esterilizado ampicilina hasta alcanzar 50 µg/ml y por último se inoculó el criopreservado de la *E. coli* recombinante. Se colocó en una incubadora a 37° C por 24 horas en agitación vigorosa.

E) Aislamiento de una colonia simple de *E. coli* portadora del plásmido pAR1903 que contiene el gen *msp5*. (Reyna-Bello y col, 1.998)

Se tomó 100 ml de LB medio, se le añadió 1,5 grs. de agarosa y 100 μ l de ampicilina preparada en una concentración de 50 mg/ml, esto con el fin de hacer un medio sólido. Esta mezcla aún en estado líquido, se vertió en placas de petri y se dejaron enfriar.

Con la ayuda del asa de platino, cada placa se cultivó tres veces en forma de zigzag con la bacteria recombinante previamente incubada en el medio líquido y se dejó en la incubadora por 24 horas a 37 °C para su cultivo.

Luego de cultivada en placas de petri, la bacteria *E. coli* recombinante portadora del gen *msp5* de *A. marginale*, se tomó una colonia de esta placa con el asa de platino y se colocó en un frasco que contenía 50 ml de LB con 50 μ l de ampicilina preparada a la misma concentración.

Para controlar la contaminación del cultivo, este procedimiento se realizó dentro de una cámara de flujo laminar con un mechero encendido.

F) Purificación de la MSP5. (Reyna-Bello y col, 1.998)

Para realizar la purificación de la proteína MSP5 se usó una columna, que contiene una resina de níquel (ProBond Sistem, Invitrogen) y una serie de soluciones tampón a diferentes pH, que permiten la elusión de la proteína recombinante. Como esta proteína recombinante, fue clonada en un vector que agrega en el extremo N-terminal del péptido, una cola de 6 aminoácidos histidina y este, tiene fuerte afinidad por el níquel, se puede separar por afinidad la proteína recombinante del resto de proteínas de *E.coli*.

Con la finalidad de realizar la purificación de la MSP5 se realizaron dos etapas, primeramente, la preparación de las *E. coli* y posteriormente, la elusión a través de la columna (ver figura 5). Las soluciones tampón fueron preparadas según anexo 1.

Diagrama de purificación

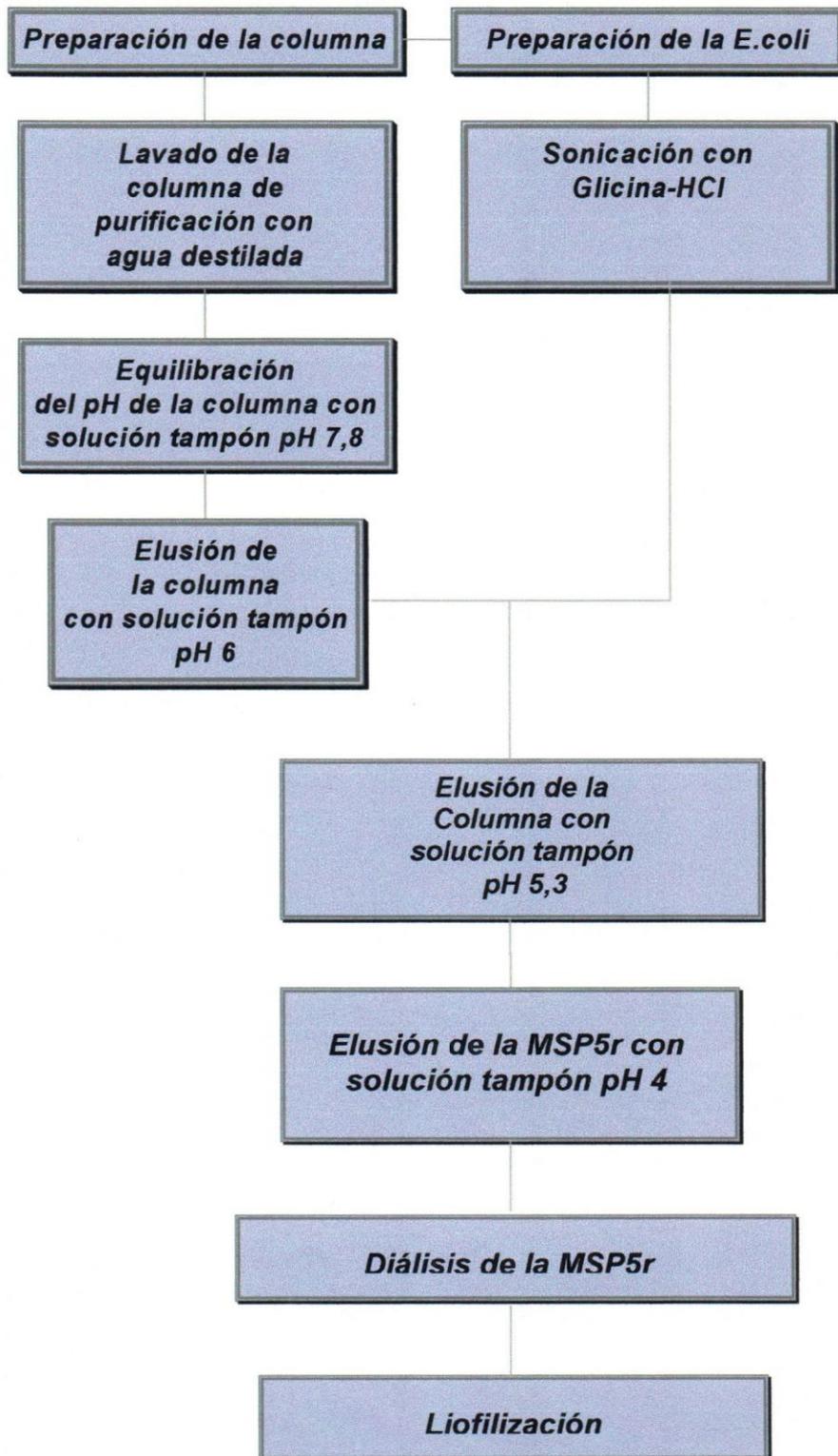


Fig. 5. Diagrama de purificación

1.- Preparación de las E. coli:

Anticipadamente, se equilibró la solución Guanidina-HCl a 37°C en una incubadora. Luego, se centrifugó el cultivo de *E. coli* en medio LB a 8.000 Xg durante 20 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 10 ml de la solución Guanidina-HCl. Se agitó el cultivo durante 5-10 minutos a temperatura ambiente para asegurar la lisis de las paredes celulares de la *E. coli*. Consecutivamente, se sonicó el lisado de las células sobre hielo con 3 pulsos de 5 segundos cada uno a alta intensidad. Posteriormente, se centrifugó la mezcla a 3000 Xg durante 15 minutos con el fin de remover la parte insoluble. Finalmente, se almacenó el sobrenadante a -20°C hasta su uso.

2.- Elusión a través de la columna:

Proceso A: Lavado de la columna.

Antes de continuar con la purificación, se procede a preparar la columna de elusión. En primer lugar, se centrifugó la columna por 2 minutos a 800 RPM para descartar el sobrenadante. Se colocó

5ml de agua destilada y se resuspendió el contenido con la ayuda de un agitador (Labline, rotator) por un espacio de 10 minutos. Este proceso se hizo dos veces.

Proceso B: Equilibración del pH de la columna.

Para equilibrar la columna en el pH 7,8, se centrifugó la resina por 2 minutos a 800 RPM, con el fin de descartar los 5ml de agua destilada que se le había agregado previamente. Luego, se añadió 5 ml de solución tampón pH 7,8 en la columna y finalmente se resuspendió en un agitados por 10 minutos. Este proceso se hizo dos veces.

Proceso C: Elusión de la proteína MSP5.

Se centrifugó por 2 minutos a 800 RPM para descartar la solución tampón de pH 7,8. Posteriormente, se añadió 5 ml de la solución Guanidina-HCL-*E.coli* que contiene el lisado de *E. coli* recombinante. Luego, se resuspendió la columna agitándola por 10 minutos en un rotador. Este proceso se realizó dos veces para completar los 10 ml de glicina-HCl.

Posteriormente, se realizó de nuevo el proceso B, se recogió el sobrenadante y se determinó en un espectrofotómetro (Milton Roy, Spectronic 1201) la densidad óptica de cada una de las muestras a $\lambda=280$. Luego, se repitió este mismo proceso con las soluciones tampón de pH 6, 5,3 y 4. La determinación de la densidad óptica en el eluato obtenido con la solución tampón de pH 4 nos indicó cuando eluyó la proteína recombinante. Posteriormente, se dializó contra agua destilada en bolsas de diálisis (Sigma, catálogo No. 250-7U) y se liofilizó (cortesía del IVIC, laboratorio del Dr. Alfredo Mijares).

G) Determinación de la cantidad de proteínas utilizando el método de Lowry.

Esta metodología fue desarrollada según la casa comercial Pierce (Micro BSA, Protein Essay Reagent).

Los reactivos que utilizamos para preparar la solución fueron mezclados de la siguiente manera:

Se mezcla: 25 partes del reactivo A
24 partes del reactivo B
1 parte del reactivo C.

Con la finalidad de hacer una curva patrón, se diluyó un set de BSA (Albúmina Sérica Bovina) inicial (BSAi) de 2 mg/ml en PBS (Buffer Fostato Salino) como se muestra en la figura 5.

Para preparar un stock de 2 ml de una muestra de 50 µg/ml se realizó la siguiente operación:

$$V(\text{BSAi}) = [C(\text{BSAf}) \times V(\text{BSAf})] / C(\text{BSAi}).$$

Donde:

$V(\text{BSAi})$ es el volumen de BSAi que se requiere.

$C(\text{BSAf})$ es la concentración stock (50 µg/ml).

$V(\text{BSAf})$ es el volumen a preparar (2 ml).

$C(\text{BSAi})$ es la concentración inicial (2 mg/ml).

Por lo que:

$$V(\text{BSAi}) = 50 \mu\text{g/ml} \times 2 \text{ ml} / 2\text{mg/ml}$$

$$V(\text{BSAi}) = 0,05 \text{ ml}$$

Después de preparada las muestras de la curva, se agregaron 100 μl tanto de las muestras de la curva patrón, como de las muestras problemas en cada pozo en placa de ELISA (todas las placas de ELISA tienen 96 pozos). Posteriormente, se agregaron 100 μl de reactivo a cada muestra y se agitó la placa, suavemente, por 30 segundos. Se cubrió la placa y se incubó por dos horas a 37°C. Después de la incubación, se dejó la placa a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 562 nm en un sistema automático de lectura para placas de ELISA.

Concentración	Volumen de BSAi (μl)	Volumen de PBS (μl)
0 μ g/ml	0	300
5 μ g/ml	30	270
10 μ g/ml	60	240
15 μ g/ml	90	210
20 μ g/ml	120	180
30 μ g/ml	180	120
40 μ g/ml	240	60
50 μ g/ml	300	0

Fig. 5. Tabla para muestras por duplicado de 100 μ l (se preparan 300 μ l para tener un excedente).

H) Migración de proteínas por electroforesis.

Para la realización de este método, se usó un gel de poliacrilamida que separa las proteínas en base del tamaño y carga eléctrica. (Bollag and Edelstein, 1.995; Laemmli,1.970).

Se prepararon todas las soluciones tampón necesarias para la realización del gel según anexo 2.

Se preparó el gel de corrida de 20 ml al 12% de acrilamida de la siguiente forma:

En un matraz aforado se añadió: 6,6 ml de agua destilada; 8ml. de acrilamida al 30%; 5 ml de Tris 1,5 M; 200 μ l de SDS al 10%; 200 μ l de APS al 10% y 8 μ l Temed.

Esta mezcla se colocó, inmediatamente, entre los vidrios montados del sistema electroforético (Bio-Rad- Protean II xi). De igual forma, se agregó 3 ml de Butanol sobre la mezcla ya colocada en el "sándwich" para alinear el margen del gel. Se esperó dos horas, aproximadamente, hasta que el gel polimerizó. Luego que el gel polimerizara, se limpió el

margen de este con agua destilada para quitar el Butanol. Posteriormente, se preparó 8 ml del gel apilamiento de la siguiente forma:

En un matraz aforado se añadió: 5 ml de agua destilada; 1,3 ml de acrilamida al 30%; 1 ml de Tris 1 M; 80 μ l de SDS al 10%; 80 μ l de APS al 10% y 8 μ l Temed.

Antes de añadir esta solución, se colocó el “peine” que marcaría los bolsillos donde se colocarían las muestras y posteriormente y se vierte sobre el gel de corrida la solución de apilamiento.

Luego de polimerizado el gel de apilamiento, se retiró con cuidado el peine y se limpió con agua destilada el gel para quitar el exceso de solución no polimerizada.

Se colocó este sistema dentro de la cámara electroforética (Bio-Rad, Protean II xi) y se le añadió aproximadamente 2 Lts de solución tampón de corrida (1,5 Lts en la cámara inferior y 500 ml en la cámara superior). Se vertió, en cada bolsillo, las muestras a una concentración de 2 μ g-60 μ g (preparada, anteriormente con 250 μ l de Laemmli muestra, 200 μ l de agua, 1 μ l de 2-mercaptoetanol y puesta en baño maría por 10 min.),

además, se colocó también un estándar de peso molecular (GibcoBRL, No. 10747-012).

Se cerró la cámara, se enchufó a una fuente de poder a 400 Voltios, 30 miliamperios y se dejó correr el gel percatándose siempre el movimiento del frente de la corrida.

Se sacó el gel del sistema de corrida y se colocó en la coloración Azul de Comassie, dejándolo agitar durante una hora. Luego, se decoloró el gel con una solución decolorante formada por 90 ml de etanol, 90 ml de agua destilada y 20 ml de ácido acético. Se dejó en agitación hasta decolorar el exceso de azul.

1) Transferencia del gel de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa.

(Cloackaert y col, 1.996).

Se preparó 1 litro de solución tampón de transferencia (39 mM de glicina, 48 mM de Tris, 0,0375% de SDS, etanol al 20% en agua destilada). Se siguió el siguiente protocolo para la transferencia:

Se humedecieron los filtros (Bio-Rad, catálogo No. 1703960) del aparato de transferencia (Bio-Rad, Trans-Blot SD) en el tampón de transferencia al igual que el papel de nitrocelulosa (0,45 μm , Bio-Rad 162-0175) cortado a la medida del gel. Posteriormente, se sacó cuidadosamente el gel de la cámara electroforética y se separó este del gel de apilamiento. Luego, se humedeció el electrodo del artefacto con el tampón de transferencia utilizando uno de los filtros. Rápidamente, se colocó uno de los filtros sobre el electrodo negativo al igual que el papel de nitrocelulosa cuidando que entre este y el papel no queden burbujas de aire. Se colocó, sobre el papel de nitrocelulosa, el gel y sobre este se situó el otro filtro cuidadosamente y finalmente, se colocó el electrodo positivo se cerró y se conectó el equipo a 150 miliamperios durante 30 minutos.

Transcurrido el tiempo, se descartó el gel y se sumergió el papel de nitrocelulosa en una solución de Rojo Ponceau (0,1% rojo Ponceau y 5% de ácido acético) por 10 minutos. Esta membrana luego fue decolorada con agua destilada para eliminar el exceso de coloración, evidenciando las bandas de los péptidos transferidos.

J) Inmunotinción para el reconocimiento la MSP5 de Anaplasma marginale en sueros ovinos (Cloackaert y col., 1.996).

Estandarización de cantidades de conjugado:

Los reactivos para este proceso de inmunotinción se ejecutaron según el anexo 3.

Previo a la inmunotinción de los sueros tanto experimentales como los sueros de campo de la estación experimental "Zambrano", se realizó la estandarización de las cantidades de conjugado-peroxidasa que se deben usar en la inmunotinción. Para ello, se colocó en 4 trozos diferentes de papel de nitrocelulosa, 1 μ l de suero en cada uno. Se sumergieron en solución de saturación en sendos posillos por 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se lavaron 3 veces los trozos de papel de nitrocelulosa con solución de lavado. Posteriormente, se le añadió a cada posillo diferentes concentraciones de conjugado anti-ovino-peroxidasa (Sigma, A-3415) (1:10.000), (1:1.000), (1:500) y (1:250) diluidos en solución dilución y se dejó en agitación por una hora. Luego, los posillos fueron lavados 2 veces con solución de lavado y una con TBS.

Finalmente, se agregó 1 ml de la solución reveladora a cada pocillo y se esperó la precipitación.

Análisis de sueros de campos y ovinos experimentales:

Los reactivos para este proceso de inmunotinción se ejecutaron según el anexo 3. Para la elaboración de la inmunotinción se siguió el protocolo siguiente:

Se cortó la membrana ya trasferida en tiras y se colocaron en sendos pocillos. Inmediatamente, se vertió en cada pocillo, 2 ml de solución saturación y se dejó en agitación por 30 minutos. Transcurridos los 30 minutos, se descartó la solución saturación que contenía cada pocillo y se vertió en ellos los sueros ovinos en una dilución 1:50 en solución dilución dejando agitar por 2 horas. Pasado este tiempo, se descartaron los sueros y se lavaron las tiras 3 veces con la solución de lavado por 5 minutos cada vez. Posteriormente, se vertió en cada pocillo una solución preparada con conjugado anti-ovino-peroxidasa (Sigma, A-3415) diluido 1:100 en solución dilución, dejándose agitar por 1 hora. Al cumplirse este tiempo de agitación, se descartó la solución y se lavó 3 veces con TBS agitando por 5 minutos entre cada lavada. Finalmente, se descartó el

TBS y se vertió 1 ml de solución reveladora en cada posillo y se esperó las bandas de precipitación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A) Producción y purificación de la proteína MSP5.

1) Cultivo y aislamiento de *E. coli* recombinante.

El aislado de *E. coli* recombinante (pAR 1903) y el aislado nativo (JM 109) mantenidos en nitrógeno líquido (-196 °C) fueron inoculados a 50 ml de LB con la ayuda de un asa de platino y puestos en agitación vigorosa a 37 °C por 8 horas. Una vez que se confirmó que las *E. coli* se reprodujeron por el enturbamiento del medio LB, estas fueron luego cultivadas en placas para formar colonias. Una colonia única de cada cepa de *E. coli* fue cultivada nuevamente en LB medio con la finalidad de tener la certeza de que en cada cultivo de *E. coli* existe una población genéticamente idéntica.

Una vez, se tenían colonias únicas cultivadas en LB medio, se realizó un gel para comparar el perfil proteico de la *E. coli* que expresan la proteína recombinante (pAR 1903) con las *E. coli* nativas sin la proteína MSP5 (JM 109) (ver figura 6). Como se puede apreciar, en el carril 3 y 4 se observa una banda, en cada uno, a nivel 25 KDa que determina la posible presencia de la proteína MSP5 en esos

cultivos, en cambio, el carril 1 y 2 correspondiente a la *E. coli* JM 109, no se aprecia la misma banda. Como la MSP5 recombinante tiene un peso aproximado de 24-25 KDa, según lo reportado por Reyna-Bello y col, (1998), esto nos permite inferir que esta diferencia encontrada en el gel de la figura 6 se debe justamente a la expresión de la MSP5 por parte de *E. coli* pAR 1903.

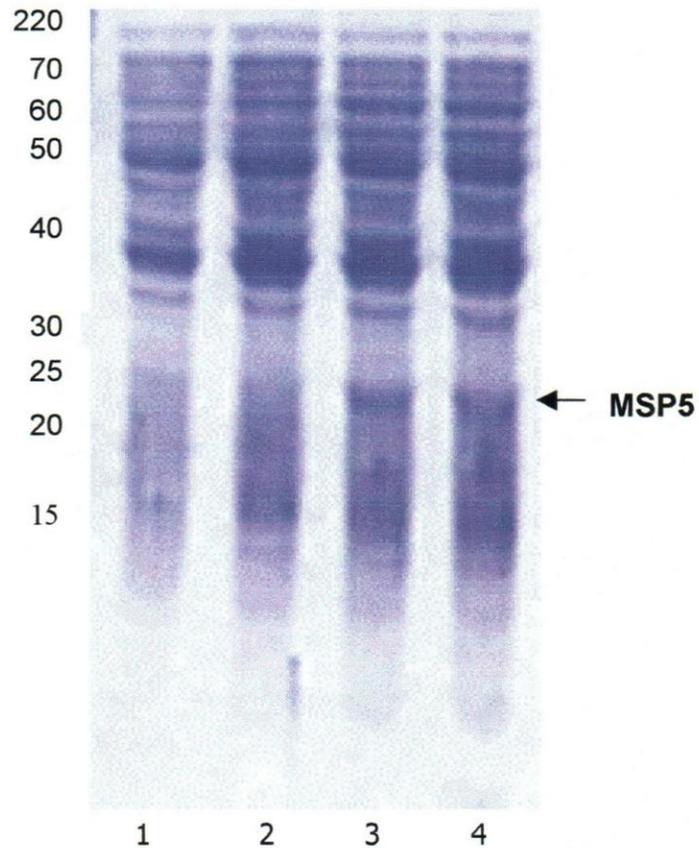


Fig. 6 Gel SDS-PAGE para comparar la cepas de *E. coli* JM109 y pAR 1903. Carriles 1 y 2: 25 μ l de JM 109 (*E. coli* sin *msp5*); Carriles 3 y 4: 25 μ l de pAR 1903 (*E. coli* recombinante con *msp5*). A la derecha, los pesos de los estándares de peso molecular.

2) *Expresión de la proteína recombinante MSP5 por la cepa de E. coli pAR 1903.*

Una vez, que se tenía la demostración que la cepa de *E. coli* pAR 1903 expresaba la MSP5 de *A. marginale*, se realizó el cultivo de 9 colonias diferentes de *E. coli* pAR 1903, para observar si la inducción con IPTG (isopropiltiogalactosidasa) logra efectivamente sobre expresar la MSP5 recombinante todas las colonias por igual.

Para esto, se realizaron 9 cultivos de *E. coli* pAR 1903 que fueron posteriormente divididos en dos para tener un cultivo inducido con IPTG y otro sin inducción.

Una alícuota de cada cultivo de estos y su respectiva replica fueron analizadas en un gel de SDS-PAGE (ver figura 7), con la finalidad de elegir el cultivo que expresa más cantidad de MSP5 después de ser inducido por IPTG.

Como podemos observar en la figura 7, los cultivos donde se estimuló mayor proteína MSP5 fueron los cultivos 5' y 9', pero tomamos el 5' para purificarlo por tener, aparentemente, mayor cantidad. Debe notarse, que el cultivo 3' expresa muy débilmente la MSP5 post inducción con IPTG y el cultivo 6' aparentemente no expresa la MSP5. Ni antes y posteriormente a la inducción con IPTG.

Esto quizás se debe o a un problema de contaminación de esta colonia con *E. coli* JM 109 que no expresan la MSP5, o quizás sea una colonia que perdió el plásmido que contiene el gen *msp5*.

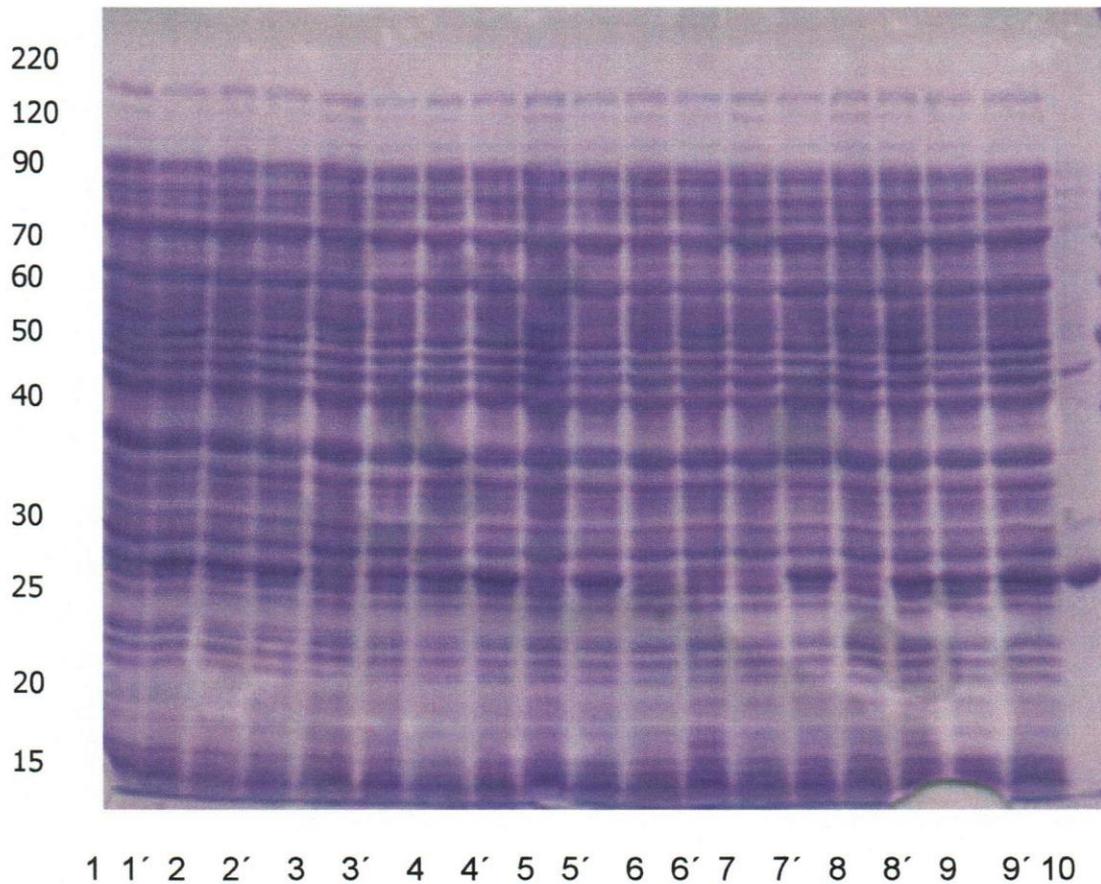


Fig. 7. Análisis por SDS-PAGE de colonias de *E. coli* pAR 1903 inducidas a sobre expresar la MSP5 recombinante por IPTG. En los carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 25 μ l de 9 colonias de *E. coli* recombinante (pAR 1903) no inducida con IPTG. En los carriles 1', 2', 3', 4', 5', 6', 7', 8', y 9', 25 μ l de las 9 colonias replicas de las anteriores, inducidas con IPTG. El carril No. 10, proteína MSP5 purificada anteriormente, cortesía de Reyna-Bello.

3) Purificación

Para la purificación se utilizó el cultivo No. 5' (como dijimos anteriormente), ya que este presentó mayor concentración de la proteína de 19 KDa.

Luego de realizado el protocolo para equilibrar la columna de purificación, se procedió a verter en ella, el cultivo sonificado y se determinó por espectrofotometría ($\lambda=280$), la densidad óptica de cada muestra durante la purificación (ver figura 8). Como se puede observar, durante la elución con la solución tampón pH 7,8, se registró una muestra con densidad óptica de 1,232, lo cual significa el mayor descarte de proteínas pertenecientes a la *E. coli*. Se continuó eluyendo columna con las soluciones tampón de pH 6 y 5,3. Luego que la densidad óptica de la muestra No. 10 llegara a 0, se añadió a la columna la solución tampón de pH 4. Esta permitió eluir la MSP5 ya que esta proteína por poseer una cola de histidina, tiene una gran afinidad por el níquel a pH superior a 4. En las muestras No. 11 y 17, podemos

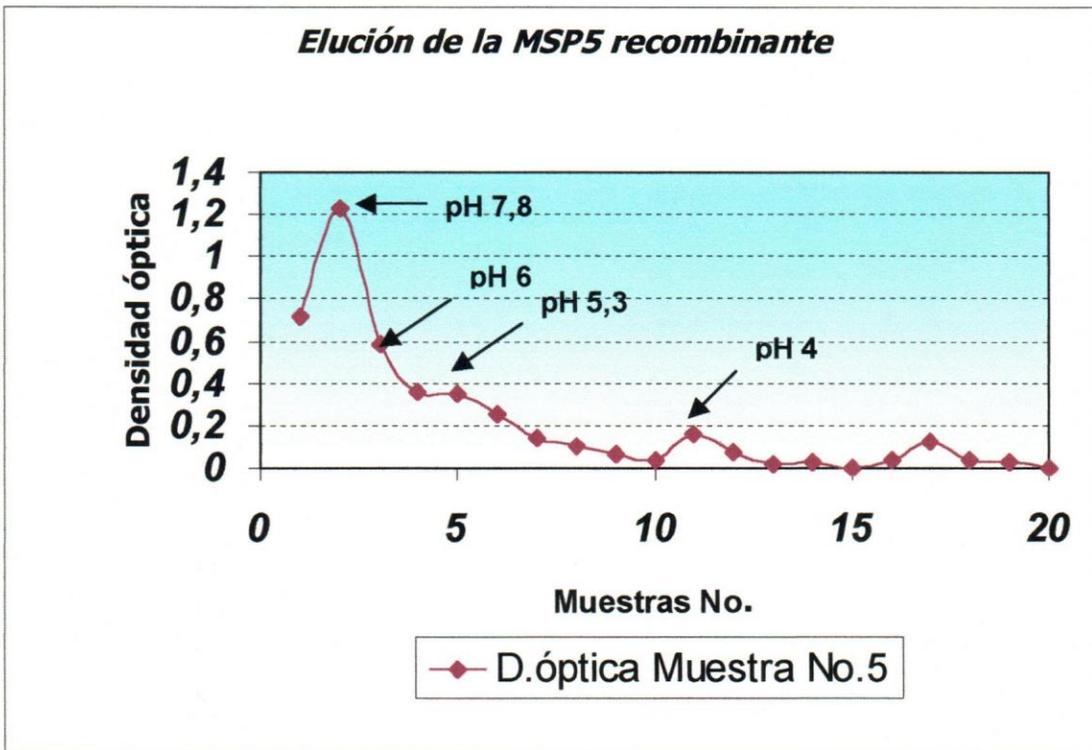


Fig. 8. Concentraciones resultantes de la purificación.

observar unos picos quizás pertenecientes a la MSP5, por ello, mezclamos el contenido de estos tubos. Finalmente, esta muestra se dializó contra agua destilada y luego se liofilizó (cortesía del IVIC, laboratorio del Dr. Alfredo Mijares).

4) Gel de purificación

En la figura 9, se puede observar el análisis por SDS-PAGE del eluato de la columna de purificación, a una concentración de 3 mg/ml. Al nivel de 25 KDa, se observa una prominente banda en los carriles 3, 4, 5 y 6, esto corresponde a la MSP5 purificada. Debe observarse también una ligera banda al nivel de 49 KDa en estos mismos carriles, correspondiente a un péptido de *E. coli* que eluye junto a la MSP5 recombinante. Quizás esto se deba a que este péptido también tenga afinidad por el níquel.

Como control de este gel, se incluyeron en los carriles 1 y 2, las cepas *E. coli* JM 109 y pAR 1903, respectivamente. En ellos se observa de nuevo a nivel de 25 KDa, la expresión de la MSP5 recombinante en el pAR 1903 que no se observa en el JM 109, coincidiendo con lo que mostrado en la figura 6.

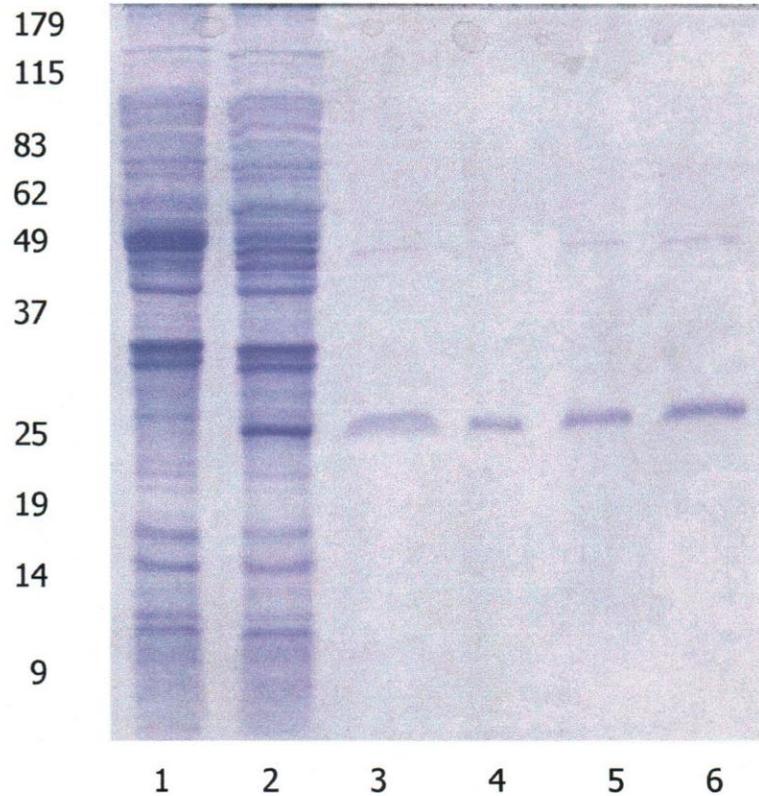


Fig. 9. Análisis por SDS-PAGE del eluato de la columna de purificación. En el carril No.1: 60 μ l de JM 109 (*E. coli* sin *msp5*); en el No. 2, 60 μ l de pAR 1903 (*E. coli* con *msp5*); en los carriles No. 3, 4, 5 y 6: ,128, 32, 64 y 128 μ l de MSP5 purificada.

J) INMUNOTINCIÓN

Una vez probadas las diluciones de conjugados (1:10.000; 1:1.000; 1:500 y 1:250), resultó ser más apropiada la concentración 1:250. Sin embargo, se resolvió trabajar la inmunotinción con una dilución del conjugado 1:100 ya que, 1:250 mostró ser una reacción débil.

Luego de confirmada la purificación de la MSP5, se procedió a realizar un gel preparativo que posteriormente fue transferido a un papel de nitrocelulosa.

Esta membrana de nitrocelulosa fue utilizada para analizar. Los 14 sueros de la estación experimental "zambrano" por inmunotinción. Se observó que en 3 de las 14 tiras de nitrocelulosa (números 2, 9 y 10), los resultados fueron positivos, es decir, se observó, tras la revelación, una línea azul en cada una de las 3 tiras al nivel de 25 KDa. Como se puede evidenciar en la figura 10. El suero del ovino No. 7, también reconoció esta misma banda pero muy débilmente.

Estos resultados nos indican, que el 21,43% de los animales tienen anticuerpos contra la MSP5, lo que nos permite inferir que estos ovinos han estado en contacto alguna vez con *Anaplasma sp.* Estos resultados también confirman lo enunciado por Reyna-Bello y col, (1.998); Ndung'u y

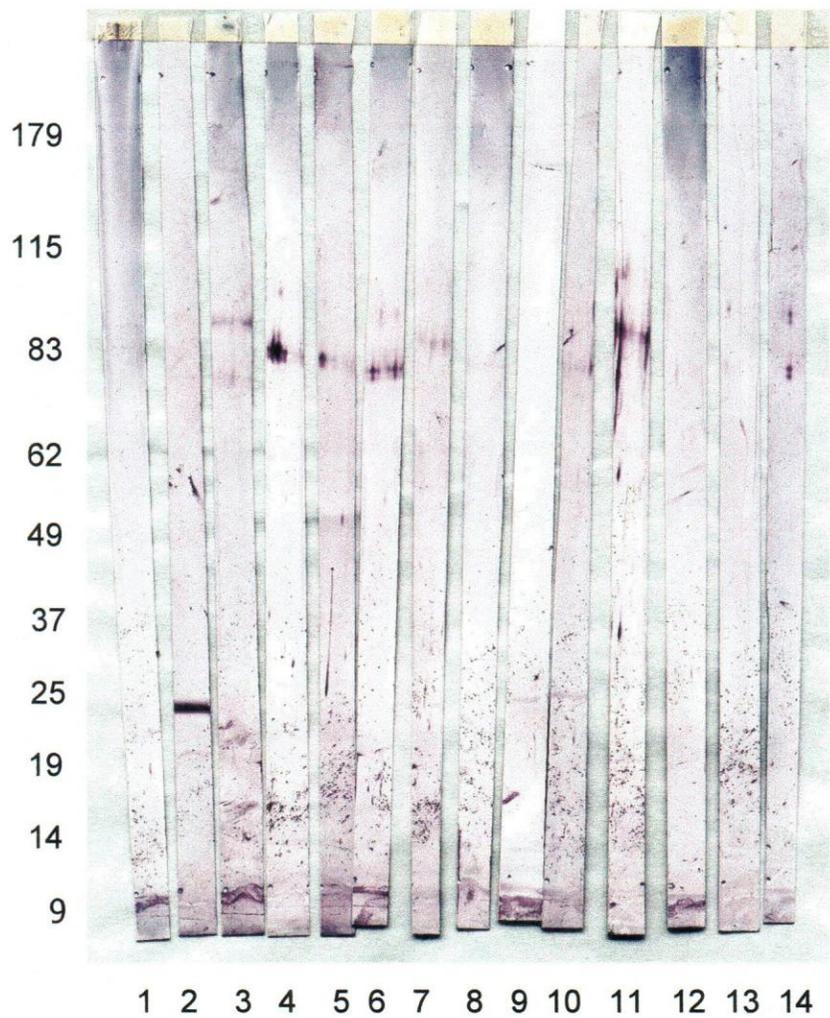


Fig. 10. Inmunotinción de 14 sueros ovinos provenientes de la estación experimental "Zambrano".

col, (1.995); Torioni y col, (1.998); Visser, (1.992) que afirman la capacidad inmunogénica de esta proteína para el diagnóstico de la anaplasmosis ovina, caprina o bovina.

K) Infección experimental

Luego de inoculado el cordero con *A. marginale*, se mantuvo todo el tiempo en continua observación y a lo largo de la fase experimental, no se detectaron síntomas clínicos característicos de la anaplasmosis ovina. El cordero mantuvo todo el tiempo su apetito, consumo de agua y buena condición física. Nunca se mostró postrado ni presentó taquipnea o cualquier otro síntoma que revele un estado febril.

Durante este tiempo experimental, se realizó toma de temperatura rectal del animal y también se analizó la sangre a través del hematocrito y conteo de células infectadas con *A. marginale*, por medio de la técnica de acridina naranja-bromuro de ethidium. Los resultados de estos análisis fueron los siguientes:

a. Si observamos la figura 11 donde presentamos el registro de la temperatura del cordero, podemos notar que el mayor valor es de 39,6 °C y el menor fue de 39 °C por lo que se puede decir que el registro de la temperatura

del cordero, se ubicó dentro del rango de valores normales (39 °C y 40 °C) según Benjamín, (1.984). Además es importante destacar que la temperatura promedio pre-infección que mostró este cordero fue de 39,6 °C.

b. En la figura 12, podemos apreciar que el hematocrito no fue afectado tampoco, es decir, pareciera que la anaplasmosis no indujo la anemia típica esperada, ya que el mayor valor de hematocrito observado fue de 35% y el menor de 28% durante la fase de infección experimental. Incluso, este cordero mostró en la fase pre-infección un hematocrito de 30%, por lo que podemos decir que definitivamente no varió de su valor normal. Esta fluctuación observada en comparación con su valor preinfección, fue muy pequeña en comparación con otros trabajos que reportan la pérdida de eritrocitos entre 60% y 70% (Jones y Brock, 1.966).

c. Finalmente, podemos ver en la figura 13, la rickettsemia registrada por el conteo de células infectadas, observadas en el frotis con la técnica acridina naranja-bromuro de ethidium. En este caso la máxima rickettsemia fue 2,9 % obtenida el día 15 post-infección, mostrando fluctuaciones a lo largo del experimento entre 0,5 y 3%. Estos resultados demuestran que no hubo gran cantidad de eritrocitos infectados por la bacteria, si se comparan estos con otros trabajos donde la rickettsemia fluctúa entre 20% y 60% pudiendo llegar hasta un 90% (Ajayi y col 1.987; Rivera, 1.996).

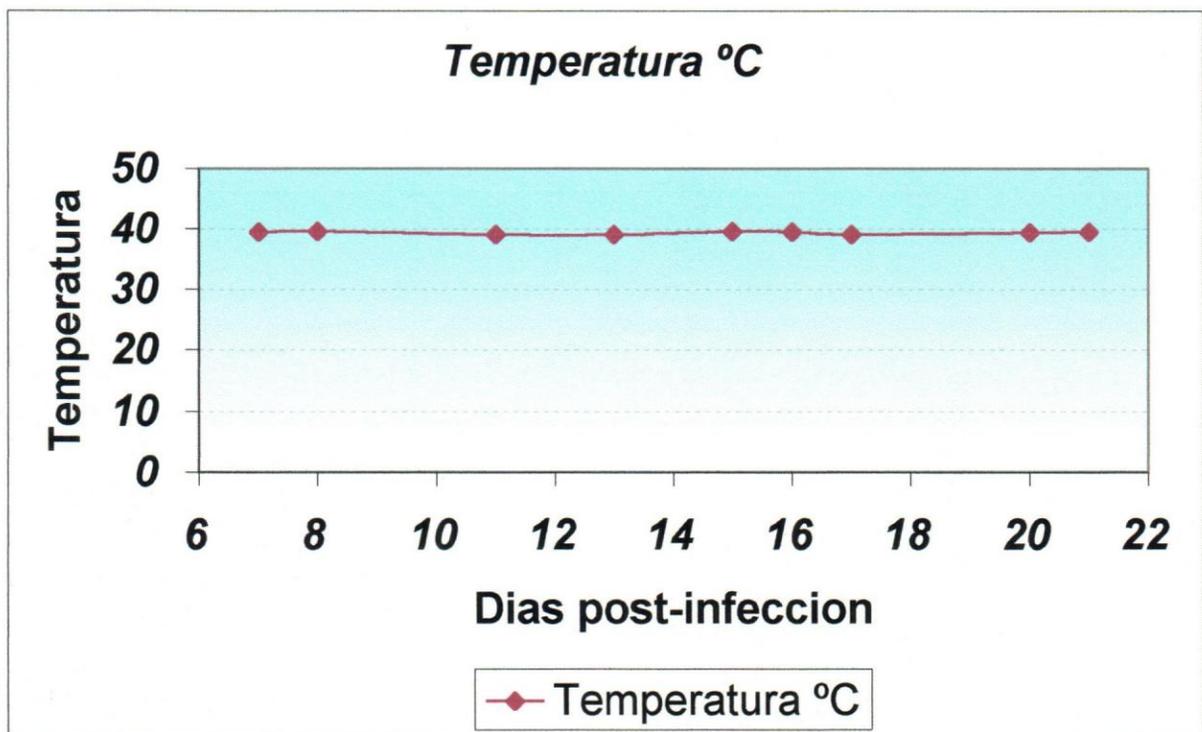


Fig. 11. Resultados de los análisis hechos al cordero infectado experimentalmente, tomando en cuenta la temperatura corporal tomada rectalmente.

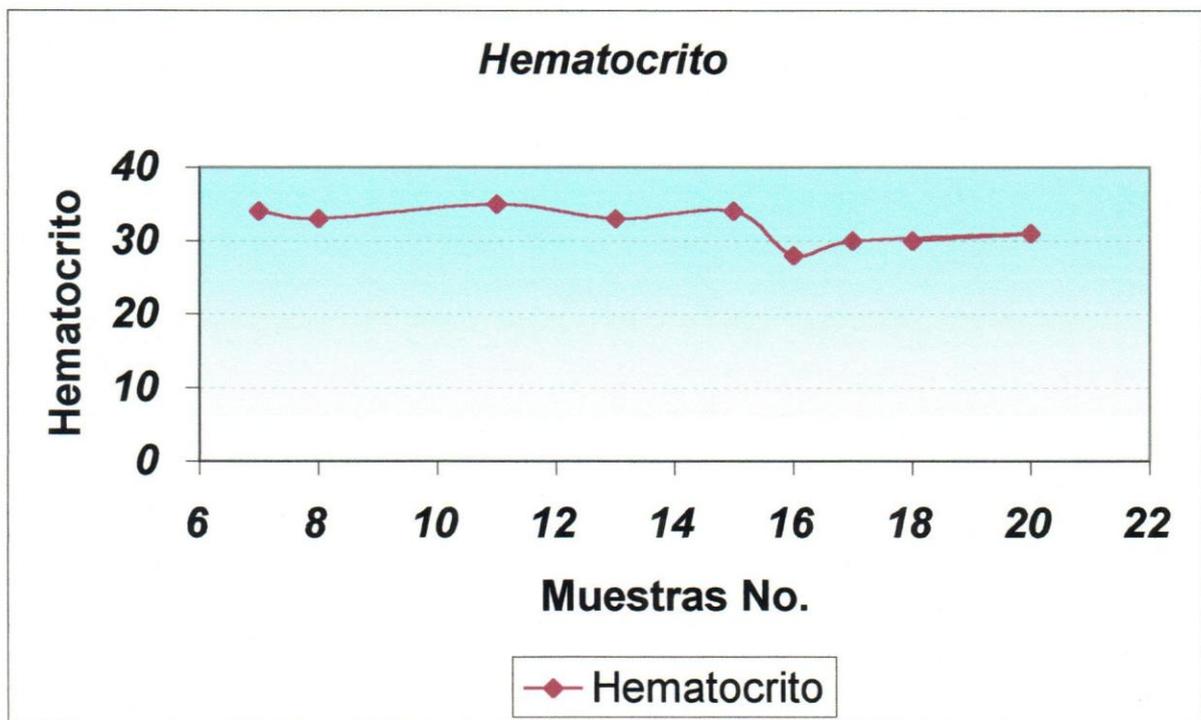


Fig. 12. Resultados de los análisis del hematocrito del cordero infectado experimentalmente.

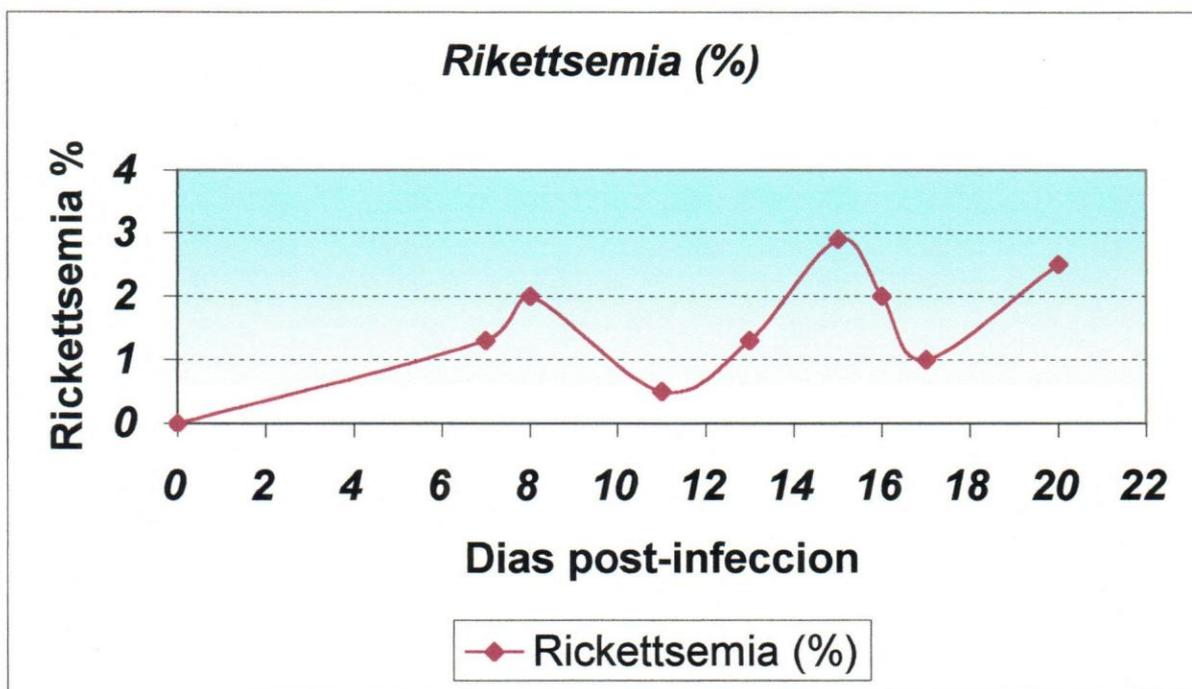


Fig. 13. Resultados de los análisis de la rickettsemia hechos al cordero infectado experimentalmente.

L) Inmunotinción de sueros de ovinos infectados experimentalmente.

En la figura No. 14, se observan 4 sueros de ovinos infectados experimentalmente. El primer carril corresponde a un suero 10 días antes de la infección experimental, el segundo suero, corresponde al séptimo día luego de la infección experimental, día en el cual el cordero comenzó a presentar rickettsemia. El tercer suero se tomó 17 días post-infección, lo que quiere decir, 10 días posterior al inicio de la rickettsemia. El último, representa al suero del ovino a los días de del supuesto estado crónico de la enfermedad. Curiosamente, estos sueros no reconocieron la MSP5, por lo que podemos decir que este animal no produjo anticuerpos contra la MSP5.

Es importante destacar que los ovinos no son clínicamente afectados de manera severa por al *A. marginale* (Ristic, 1.960). Esto explica porque nosotros no observáramos la sintomatología clínica de la anaplasmosis en el ovino infectado experimentalmente, debido que este cordero fue inoculado con *A. marginale*.

Por otra parte, este ovino, tampoco mostró anticuerpos detectables por inmunotinción contra la MSP5, incluso en los sueros tomados los día 17 post infección ni en el estado crónico de la enfermedad (3 meses después de la infección experimental). Estos dos últimos sueros se esperaba que

presentaran anticuerpos que reconozcan la MSP5. En otros trabajos similares Reyna-Bello y col, (1998), encontraron que los anticuerpos anti MSP5 en bovinos infectados experimentalmente son evidentes por inmunotinción concomitantemente con la aparición de la rickettsemia y estos anticuerpos son presente en el estado crónico de la enfermedad.

Es posible que el *A. marginale* en el ovino, es controlado por inmunidad celular y no humoral y es por esto que quizás en la inmunotinción no se evidencia los anticuerpos contra MSP5 del cordero infectado experimentalmente. También, es posible que ocurra lo inverso en el caso del bovino, donde los bovinos presentan una resistencia natural al *Anaplasma ovis* (Ristic, 1.960).

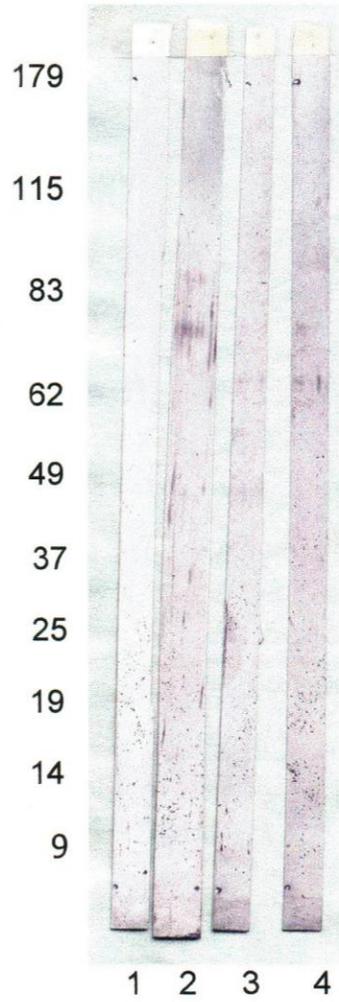


Fig. 14. Inmunotinción de sueros de ovinos infectados experimentalmente.

CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES

Utilizando la técnica de inmunotinción con la proteína MSP5r de *A. marginale*, encontramos que sueros ovinos del estado Falcón presentan anticuerpos contra esta proteína. Lo que nos indica, que estos ovinos han estado en contacto con esta rikettsia.

La purificación de la MSP5 resultó exitosa ya que, como se pudo observar en el gel, se presentaron solamente débiles trazas de una proteína de 49 KDa perteneciente a la *E. coli* que eluyó conjuntamente a la MSP5. posiblemente esto se deba a que esta proteína tiene también gran afinidad por el níquel. Es importante remarcar, que esta purificación de la MSP5 resultó ser más exitosa que la descrita por Reyna-Bello y col (1.998) de la misma proteína, debido a que ellos obtuvieron un mayor número de proteínas de *E. coli* contaminante en el eluato final de la MSP5. Quizás esto se deba al cambio en el protocolo de purificación hecho en este trabajo, el cual consistió en analizar por espectrofotometría los eluatos de todos los diferentes pH que salían de la columna. Este sistema permitió sin duda, lavar más a fondo la columna, eliminando así más contaminantes. En cambio, en el proceso de purificación descrito por Reyna-Bello y col, (1998), solamente

se observa espectrofotométricamente las muestras después de añadir la solución tampón de pH 4.

Se logró la estandarización de la inmunotinción utilizando los reactivos de lavado, dilución, saturación y revelación descritos en el anexo 3. Por otra parte se estableció la dilución óptima de los sueros según Reyna-Bello y col (1.998). La concentración óptima del conjugado se determinó por el ensayo de 4 diluciones frente a una concentración constante IgG (inmunoglobulina tipo G) ovina, resultando más apropiada, la concentración de conjugado 1:100 ya que la concentración de 1:250 resultó ser débil.

El cordero infectado experimentalmente, no mostró sintomatología clínica a la anaplasmosis a lo largo de la infección. Quizás, el ovino actúa como reservorio para *A. marginale* o la bacteria no está adaptada al huésped ovino. Posiblemente, ocurra lo contrario en el caso bovino, donde ellos presentan una resistencia natural al *Anaplasma ovis* (Ristic, 1.960).

En un trabajo reciente realizado en Venezuela (Morillo y col, 2001) se estudió la anaplasmosis en rebaños caprinos. Estos autores, analizaron 105 sueros de caprinos por ELISA con *A. marginale* como antígeno. En esta

población encontraron una seroprevalencia de 68%, indicando la presencia de *Anaplasma sp.* en caprinos de Venezuela.

Otro aspecto curioso de este trabajo (Morillo y col, 2001), es que ellos inocularon un caprino con una cepa virulenta de *A. marginale*, y al igual que lo descrito con el cordero en nuestra etapa experimental, el caprino no presentó la sintomatología clínica característica de la anaplasmosis. Lo que corrobora más esta teoría donde los pequeños rumiantes desarrollan un resistencia natural a la *A. marginale*. Otro aspecto interesante es que este caprino infectado con *A. marginale*, al igual que el cordero, presentó a lo largo del experimento una rickettsemia mímica y no desarrolló anticuerpos detectables por ELISA contra *A. marginale*. Es posible que tanta homología entre ambos trabajos no sea al azar, lo que nos permite inferir que tenemos una posible evidencia que estos pequeños rumiantes constituyen un papel de reservorio de *A. marginale* para los rebaños bovinos en Venezuela.

Es posible que los ovinos en Venezuela están infectados por *A. ovis* a pesar que esta especie aún no ha sido descrita en Venezuela. Estos sueros ovinos pudieron haber sido positivos en la inmunotinción debido que la MSP5 es un dímero conservado en todas en las especies de *Anaplasma* tanto *A. central*, *A. ovis* y *A. marginale* (Visser, 1992; Reyna-Bello, 1.998).

En el presente trabajo, se evidencia la posibilidad de existencia de *A. ovis* en Venezuela debido a las razones siguientes: 1) los sueros ovinos provenientes del estado Falcón presentaban sintomatología clínica típica de hemoparásitos. 2) No obstante, la infección por *A. marginale* no causa síntomas clínicos en pequeños rumiantes según lo descrito por Ristic (1.960); Morillo y col (2.001) y por nuestro propio trabajo. 3) Cuatro sueros ovinos provenientes del estado Falcón, mostraron anticuerpos que reconocen la MSP5 y por los resultados de este trabajo, sabemos que un ovino infectado experimentalmente con *A. marginale*, no produce anticuerpos anti-MSP5 detectables por inmunotinción.

A partir de los resultados del presente trabajo, pudiéramos sugerir una serie de recomendaciones para ampliar conocimientos de esta enfermedad en Venezuela:

1) Desarrollar un método más sensible, como por ejemplo un ELISA, para la determinación de anticuerpos anti-anaplasma en ovinos infectados experimentalmente con *A. marginale*, lo que permitiría profundizar los conocimientos inmunológicos de esta enfermedad.

2) Desplegar un estudio genético de ribotipismo para identificar la especie de *Anaplasma* que está infectando a los ovinos en Venezuela.

3) Ampliar los estudios serológicos para determinar la prevalencia de la anaplasmosis ovina en Venezuela y conocer así su impacto en nuestro país.

BIBLIOGRAFÍA

AJAYI, S. A.; OYETUNDE, I. L.; OGBONNA, G. A.; DIPEOLU, O. O. 1987.

Bovine Anaplasmosis : clinical, haematological and blood biochemical changes in experimentally infected Nigerian cattle. Rev. Elev. Vét. Pays, Trop. **40**(1): 41-47.

BENJAMIN, M. 1.984. Manual de patología clínica en veterinaria. Editotial

Limusa, México, pp. 421.

BOLLAG, D. M. y EDELSTEIN, S. J. 1.995. Protein methods. University of

Geneva, Department of Biochemistry. Editorial A Jhon Wiley & sons, INC. Geneva, Switzerland, pp. 230.

CABALLERO, H. 1.993. A rapid, sensitive, simple and economical method

for detection of Anaplasma marginale by fluorescent microscopy with acridene orange and ethidium bromide. p.1. Proceeding of the nineth International Veterinary Hemoparasite Disease Conference. Mérida-México.

MORILLO, M.; Palmar, E. y Rey, C. 2.001. Anticuerpos contra *Anaplasma marginale* en rebaños caprinos del estado Falcón. V Congreso Nacional de Ciencias veterinarias 2.001. Ovinos y Caprinos.

CLOACKAERT, A.; GRÉPINET, O.; SALIH-ALJ DEBBARH, H. y ZYGMUNT, M.S. 1.996. Overproduction of the *Brucella melitensis* heat shock protein DNAk *Echerichia coli* and its localization by use of specific monoclonal antibodies in *B. Melitensis* cells and fractions. Res. Microbiol. 147:145-157.

GIARDINA, S., A. BRETANA, y N. MÁRQUES Q. 1983. Ultrastructural aspects of intraerythrocytic development of a Venezuelan strain of *Anaplasma marginale*. Tropenmed. Parasit. **34**: 7-10.

GIARDINA, S. y GARCÍA F. 1.990. Hemoparásitos: Biología y Diagnóstico. Edit. Cuadernos U.S.B. 246 pp.

GRAY, M. G. 12 November 1.998. Rickettsia, typhus and the mitochondrial connection. Nature magazine. Vol. 396.

HERNÁNDEZ, R.; FERNÁNDEZ, C. y BAPTISTA, P. 1.998. Metodología de la investigación. Edit. Mc. Graw Hill. P.57-72.

INOKUMA, H.; TERADA, Y.; KAMIO, T.; RAOULT, D. y BIZOUQUI, P. 2.001. Analysis as the 16S rRNA gene sequence of *Anaplasma centrale* and its phylogenetic relatedness to other Ehrlichiae. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. Vol.8, No.2, p.241-244.

JONES, E.W. y BROCK, E.W. 1.966. Bovine anaplasmosis: Its diagnosis, treatment and control. J.A.V.M.A. Vol. 149, No. 12.

KNOWLES, D.; TORIONI de ECHAIDE, S.; PALMER, G.; McGUIRE, t.; STILLER, D. y McELWAIN, T. 1.996. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 34, No.9, p. 2.225-2.230.

KOCAN, K. M. 1.995. Targeting ticks for control of selected hemoparasitic diseases of cattle. Veterinary parasitology. Vol. 57.

LAEMMLI, U. K. 1.970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

MOLLOY, J.B. ; BOWLES, P.M. ; KNOWLES, D.P. ; McELWAIN, T.F. ; BOCK, R.E. ; KINGSTON, T.G. ; BLIGHT, G.W. and DALGLIESH, R.J. 1.999. Comparison of a competitive inhibition ELISA and the card agglutination test for detection of antibodies to *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* in cattle. *Aust Vet J.* 1999 Apr;77(4):245-249.

NDUNG'U, L. W., C. AGUIRRE, F. R. RURANGIRWA, T. F. MCELWAIN, T. C. MCGUIRE, D. P. KNOWLES, and G. H. PALMER. 1.995 Mar. Detection of *Anaplasma ovis* infection in goats by major surface protein 5 competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiology.* 33(3):675-679.

PALMER, G. H. y McGUIRE, T. 1.985. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *The Journal of Immunology.* Vol. 133, No. 2, p. 1.010-1.015.

- REYNA-BELLO, A.; CLOECKAERT, A.; VIZCAÍNO, N.; GONZATTI, Mary I.; ASO, Pedro M.; DUBRAY, G. and ZYGMUNT, Michael S.** 1.998. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in Venezuela. *Clinical and Diagnostic Immunology*. Vol. 5, No.2, p. 259-262.
- RISTIC, M. y J.P. Kreier.** 1.960. *Advances in veterinary. Science*. 6(6):111-192.
- RISTIC, M. y J.P. Kreier.** 1.984. Family III, anaplasmatidae dans. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Volume 1 p. 719-729. N.R. Krieg et JG, Holt (ed), The Williams & Wilkins Co., Baltimore, U.S.A.
- RIVERA, M. A.** 1.996. *Hemoparasitosis bovinas*. Ed: Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas.
- SAMBROOK, S. E.; FRITSCH, E. F. y MANIATIS, T.** 1.989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

TEBELE, N.; McGUIRE, T. C. y PALMER, G. H. 1.991. Induction of protective innunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. Infection and Immunity. Vol. 59, No. 9, p. 3.199-3.204.

THEILER, A. 1910. *Anaplasma marginale* (Genus nov. et species nov). Un nouveau protozoaire du bétail. Bull. Soc. Phatol. Exot. 3: 135-137.

TORIONI de ECHAIDE, S.; KNOWLES, D. P.; McGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; SUAREZ, C. E. y McELWAIN, T. F. 1.998. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using recombinant major surface protein 5. The Journal of Clinical Microbiology, Vol. 36, No.3, p. 777-782.

UUILENBERG, G. 1995. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. Vet. Parasitol. **57**: 19-41.

**M. C., VIDOTTO; VIDOTTO, O.; ANDRADE, G. M.; PALMER, G.,
McELWAIN, T. y KNOWLES, D. P.** 1.998. Seroprevalence of
Anaplasma marginale in cattle in Parana state, Brazil, by MSP-5
competitive ELISA. Ann N Y Acad Sci. 1998 Jun 29;849:424-426.

**VISSER, E. S.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; W. C. Davis; SHKAP,
V.; PIPANO, E. y KNOWLES, D. P. Jr.** 1.992. The *Anaplasma
marginale msp5* gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all
recognized *Anaplasma* species. Infect. Immun. 60: 5139-5144.

WALKER, D. H. y DUMLER, J. S. 1.996. Emergence of the Ehrlichioses as
human health problems. Emerging Infectious Diseases. Vol.2, No.1.

ANEXOS

Anexo 1

Solución A:

NaH ₂ PO ₄	2,76 grs.
NaCl	29,29 grs.
Agua destilada	100 ml

Solución B:

NaHPO ₄	2,84 grs.
NaCl	29,29 grs.
Agua destilada	100 ml

Solución Guanidina-HCl; pH 7,8

Solución A	0,58 ml
Solución B	9,42 ml
Guanidina-HCl	57,30 grs.
Agua destilada	90 ml

Se ajustó pH a 7,8 usando 1N NaOH o 1N HCl.

Se ajustó volumen a 100 ml.

Tampón Binding pH 7,8:

Solución A	29 μ l
Solución B	4,7 ml
Urea	24 grs.
Agua destilada	30 ml

Se ajustó pH a 7,8 usando 1N NaOH o 1N HCl.

Tampón Wash pH 6:

Solución A	3,69 ml
Solución B	1,3 ml
Urea	24 grs.
Agua destilada	30 ml

Se ajustó pH a 6 usando 1N NaOH o 1N HCl.

Tampón Wash pH 5,3:

Solución A	4,6 ml
Solución B	415 μ l
Urea	29,29 grs.
Agua destilada	25 ml

Se ajustó pH a 5,3 usando 1N NaOH o 1N HCl.

Tampón de Elusión pH 4:

Solución A	5 ml
Urea	29,29 grs.
Agua destilada	25 ml

Se ajustó pH a 4 usando 1N NaOH o 1N HCl.

Anexo 2

Acrilamida al 30% :

En 70 ml de agua destilada se añadió 29,2 grs. de acrilamida; 0,8 grs. de N-N'-methylene-bis-acrylamida. Se ajustó el volumen a 100 ml. Se mantuvo refrigerado hasta su uso.

Tris 1,5 M, pH 8,8: Se disolvieron 18,15 grs. de Tris en 80 ml de agua destilada, se ajustó el volumen a 100 ml y se ajustó el pH a 8,8 con HCl. Se mantuvo refrigerado hasta su uso.

Tris 1 M, pH 6,8: Se disolvieron 12,1 grs. de Tris en 80 ml de agua destilada, se ajustó el volumen a 100 ml y se ajustó el pH a 6,8 con HCl. Se mantuvo refrigerado hasta su uso.

SDS 10% (Sodio dodecilsulfato): Se disolvieron 10 grs. de SDS en 100 ml de agua destilada. Se conservó a temperatura ambiente hasta su uso.

APS 10% (Persulfato de Amonio): Al momento de la preparación del gel, se disolvieron 0,1 grs. de APS en 1 ml. de agua destilada, ya que el Persulfato de Amonio tiende a precipitar con el tiempo.

Solución tampón de corrida: Se disolvieron 15,15 grs. de Tris; 72 grs. de Glicina; 5 grs. de SDS en 5 litros de agua.

Laemmli muestra: Se añadió 4ml. de SDS 10%; 2 ml de glicerol; 1,2 ml de Tris 1M; 0,01% de Bromophenol Blue en 2,8 ml de agua destilada.

Azul Comassie: (coloración fuerte). En una solución compuesta por 150 ml de metanol, 150 ml de agua destilada y 30 ml de ácido acético, se disolvió 0,375 grs. de Brillan Blue (Blue 12250).

Axexo 3

Solución TBS:

Tris 20 mM 2,42 grs.

NaCl 29,22 grs.

Agua destilada 1 lt

Se ajustó pH a 7,5

Solución Saturación:

Leche descremada en polvo 0,5 grs.

TBS 50 ml

Solución Dilución:

Para 50 ml:

Solución Saturación 12,5 ml

TBS 38,5 ml

Solución de lavado:

Tween 20 0,125 ml

TBS 250 ml

Solución reveladora:

Solución A:

4-cloro-1-Naphtol (sigma, C-6788) 30 mg

Metanol 10 ml

Solución B:

TBS 50 ml

Peróxido de hidrógeno al 30% 30 μ l.

Se mezclaron la solución A y B justo antes de usar.