

ARTÍCULO ORIGINAL

## Análisis de la secuencia de la proteína principal de superficie 1a en aislados cubanos de *Anaplasma marginale*

Belkis Corona González<sup>I\*</sup>, Adrian Díaz Sánchez<sup>I</sup>, Yoandry Hinojosa López<sup>I</sup>, Dasiel Obregón Álvarez<sup>II</sup>, Claudia Bezerra Da Silva<sup>III</sup>, Maristela Peckle Peixoto<sup>III</sup>, Marcus Sandes Pires<sup>III</sup>, Huarrisson Acevedo Santos<sup>III</sup>, Siomara Martínez Marrero<sup>I</sup>, Aivaldo Enrique da Fonseca<sup>III</sup>, Carlos Luiz Massard<sup>III</sup>

<sup>I</sup>Dirección de Salud Animal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: [bcorona@censa.edu.cu](mailto:bcorona@censa.edu.cu).

<sup>II</sup>Universidad Agraria de la Habana, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

<sup>III</sup>Universidad Federal Rural de Rio de Janeiro, UFRRJ, BR 465, Km 7, Rio de Janeiro, Seropédica 23890-000.

**RESUMEN:** La anaplasmosis bovina es una enfermedad causada por la rickettsia *Anaplasma marginale*. Las principales proteínas de superficie de esta bacteria, codificadas por genes con secuencias conservadas, constituyen candidatos potenciales para vacunas. Dentro de estas proteínas, MSP1a se expresa por un gen de simple copia (*msp1α*) y su peso molecular varía entre aislados de *A. marginale* de diferentes regiones geográficas debido a la presencia, en número variable, de una secuencia de 28-29 aminoácidos repetida en tándem. En el presente estudio se analizaron las secuencias de los repetidos y del microsatélite de la proteína MSP1a de dos aislados de *A. marginale* provenientes de bovinos de una granja de la región occidental de Cuba. Ambos aislados pertenecen al genotipo G y el aislado 21G presenta los repetidos T-B-B-C y el 25G los tipos T-C. El análisis de estas secuencias repetidas resulta muy importante, pues incluyen marcadores para la transmisibilidad por garrapatas y son de gran valor para el desarrollo de un futuro candidato vacunal contra este hemoparásito.

**Palabras clave:** anaplasmosis bovina, *msp1α*, MSP1a, proteínas principales de superficie.

---

### Analysis of major surface protein 1a sequence in Cuban isolates of *Anaplasma marginale*

**ABSTRACT:** The bovine anaplasmosis is a disease of cattle caused by the rickettsia *Anaplasma marginale*. The major surface proteins encoded by genes with conserved sequences are potential candidates for vaccines. Among these proteins, MSP1a is expressed by a single copy gene (*msp1α*). The molecular weight of MSP1a varies among *A. marginale* isolates from different geographical regions due to the presence, in a variable number, of a sequence of 28-29 amino acids in tandem repeats. In the present study, the sequences of the repeats and of the microsatellite of the protein MSP1a of two isolates of *A. marginale* from bovines in a farm of the Cuban western region were examined. Both isolates belongs to the genotype G, and the isolate 21G presented the repeats T-B-B-C and the 25G of the types T-C. The analysis of these repeated sequences are very important because they include markers for transmissibility by ticks and are of great value for the future development of a vaccine candidate against this hemoparasite.

**Key words:** bovine anaplasmosis, *msp1α*, MSP1a, major surface proteins.

---

## INTRODUCCIÓN

*Anaplasma marginale* es una rickettsia Gram negativa, que se transmite por la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (1), y se considera el vector biológico más importante en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (2).

Se han identificado y caracterizado varias proteínas de superficie de *A. marginale* que están involucradas en la interacción con los hospederos vertebrados e invertebrados (3).

Muchos aislados de *A. marginale* de diferentes orígenes geográficos difieren en la secuencia de las pro-

teínas, en las características antigénicas y en su habilidad para ser transmitidas por garrapatas (4). La diversidad genética de aislados de *A. marginale* provenientes de eritrocitos bovinos, se ha caracterizado a partir de las secuencias de los genes que codifican para las proteínas principales de superficie (MSP), varias de las cuales han demostrado estar involucradas en las interacciones patógeno-célula hospedera (5).

La proteína MSP1a es una de las seis proteínas principales de superficie descritas para *A. marginale*, la cual es codificada por un gen de simple copia, conservado durante la multiplicación en el bovino y las garrapatas (6).

La proteína MSP1a de aislados de *A. marginale*, procedentes de diferentes regiones geográficas, difiere en su peso molecular debido al número variable de secuencias repetidas en tándem de 23-31 aminoácidos que estas presentan. Se ha demostrado que esta proteína es un marcador estable para la identificación de aislados (7, 8).

Los estudios previos demuestran que la proteína MSP1a de *A. marginale* está sometida a selección positiva (6) y el análisis de los repetidos proporciona evidencias de co-evolución del patógeno en las garrapatas (3).

El objetivo del presente estudio fue analizar las secuencias de los repetidos y del microsatélite de la proteína MSP1a de dos aislados de *A. marginale* provenientes de bovinos de una granja en la región occidental de Cuba.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Selección de las muestras:** Se trabajó con dos muestras de sangre de bovinos, provenientes de una granja de la región occidental de Cuba. Los animales no presentaban signos clínicos típicos de la enfermedad. Se les realizó el diagnóstico de *A. marginale* a partir de la amplificación por nPCR del gen *mSP5* de este hemoparásito, según el protocolo descrito por Torioni *et al.*, (9) (resultados no publicados) y se les denominó aislamiento 21G y 25G.

**Extracción de ADN y amplificación por PCR del gen *mSP1α*:** La extracción del ADN genómico se realizó con el estuche comercial *Blood and Tissue DNA Purification Kit* (QIAGEN), según las indicaciones del fabricante y la concentración del ADN extraído se determinó en un equipo NanoDrop (200 Spectrophotometer). Para la amplificación del gen *mSP1α* se utilizaron los cebadores descritos por Palmer *et al.* (10) (Sentido: 5'GTGCTTATGGCAGACATTTCC3'; antisentido:

5'CTCAACACTCGCAACCTTGG3'). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50 µl, conteniendo 50 ng de ADN, 0.4 µM de cada cebador y 1X GoTaq® Green Master Mix (Promega®, Madison, USA). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 2 min, 58°C por 30 seg, 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C durante 10 min, en un ThermalCycler GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer).

Los resultados del PCR se aplicaron en geles de agarosa (Sigma) al 1%, en tampón TBE 0.5 X; se corrieron a 100 Volts y 50mA, en cámara de electroforesis Maxiphor 2012 (LKB Bromma) durante 35 minutos en tampón de corrida (TBE 0.5X) que contenía Bromuro de Etidio (0.5 µg/ml). Los resultados se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografiaron con cámara digital (Olympus). Se utilizó un marcador de peso molecular de 1kb (DNA Ladder, Promega).

Los productos amplificados se purificaron con el estuche comercial QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) y se cuantificaron utilizando el equipo NanoDrop (200 Spectrophotometer).

### **Secuenciación de los fragmentos amplificados:**

Los fragmentos amplificados se secuenciaron utilizando el estuche comercial BigDye Terminator (Applied Biosystems), en un equipo ABI 3130, Applied Biosystems. Para cada aislado se realizaron tres reacciones de secuenciación con los mismos cebadores que se utilizaron para la amplificación del gen *mSP1α*.

El ensamblaje y edición de las secuencias se realizó con el programa Sequencher Versión 4.8 Demo (Gene Codes Corporation). La secuencia deducida de aminoácidos se obtuvo a través del sitio web Swissprot Expasy (<http://web.expasy.org/translate/>). Las secuencias se depositaron en el GenBank. Posteriormente, se compararon con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos disponibles en el GenBank, utilizando el programa Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blastn>).

### **Clasificación de los aislados de *A. marginale*:**

Para la el análisis de las secuencias obtenidas se tuvo en cuenta la clasificación de las secuencias repetidas en tándem (*del inglés Sequence Repeat Tandem*, SRT) y se denominaron según la nomenclatura propuesta por Allred *et al.* (7) y de la Fuente *et al.* (8). La secuencia del microsatélite se utilizó para asignar un genotipo siguiendo el sistema de Estrada-Peña *et al.* (11). Para calcular la distancia entre Shine-Dalgarno (SD) y el codón de inicio de la transcripción (ATG) se utilizó la fórmula  $(4 \times m) + (2 \times n) + 1$  y según su estructura se

clasificaron los aislamientos como genotipos, identificados por letras entre A y K (11,12).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las secuencias obtenidas para el gen *msp1α* de *Anaplasma marginale* de los dos aislados cubanos en estudio (21G y 25G) se depositaron en el GenBank con los números de acceso KT732269 y KT732270, respectivamente. En el análisis de la secuencia del microsatélite se encontró que ambos aislados pertenecen al genotipo G (Tabla 1).

Estos resultados coinciden con Estrada-Peña *et al.* (11), quienes encontraron el genotipo G en el 68% ( $n=115$ ) de los aislados de *A. marginale*, procedentes de varios países en todos los continentes. El microsatélite se localiza en la región 5'UTR de MSP1a, entre la secuencia de Shine-Dalgarno y el codón de inicio de la transcripción (ATG). Este tiene dos tipos de secuencia: (G/ATTT) $m$  y (GT) $n$ . Las diferentes secuencias del microsatélite producen distancias entre SD y el ATG entre 19 y 29 nucleótidos, pero la distancia de 23 nucleótidos es predominante en todas las regiones estudiadas por Estrada-Peña *et al.* (11). Estos autores plantean que esta región está implicada en la regulación de los niveles de expresión de la proteína MSP1a y demostraron que la expresión de la proteína fue menor en construcciones, expresadas en

*Escherichia coli*, para cepas con 19 nucleótidos de distancia entre SD y el ATG; sin embargo, no se observaron diferencias entre construcciones de las cepas con distancias entre 23 y 29 nucleótidos entre SD y el ATG, lo que podría afectar la expresión de MSP1a, que varía durante la multiplicación de *A. marginale* en las células de garrapatas y en los eritrocitos bovinos, la infección por el patógeno y la transmisión (13).

Con relación a los repetidos en tándem encontrados en la proteína MSP1a de los aislados en estudio, el repetido T está presente en ambos aislados en la posición R1, según lo descrito por Estrada-Peña *et al.* (11), y el resto de los repetidos (C-B-F) es diferente para los dos aislados (Tabla 2). Cuando se comprara el tipo de repetidos de estos aislados con los descritos por Corona *et al.* (14) para otro aislado cubano (HA), de la región occidental, pero de una granja diferente, se puede observar que el repetido B está también presente en el aislado 21G, pero con diferente número de repeticiones (Tabla 2).

En este sentido, de la Fuente *et al.* (15) caracterizaron 11 aislamientos de Oklahoma, y encontraron diferencias en las secuencias de este gen para todos los aislamientos. Se conoce que la proteína MSP1a de diferentes aislados difiere en el peso molecular debido al número variable de repeticiones en tándem de 23-31 aminoácidos (7, 10).

**TABLA 1.** Estructura del microsatélite del gen *msp1α* de dos aislados cubanos de *A. marginale* procedentes de una granja en la región occidental de Cuba./ *Structure of the microsatellite of the gene msp1α of two Cuban isolates of A. marginale from a farm of the Cuban western region.*

Aislado	Genotipo	m (G/ATTT)	n (GT)	Distancia en nucleótidos desde SD hasta el ATG	Número de Acceso en el GenBank
21G	G	3	5	23	KT732269
25G	G	3	5	23	KT732270

**TABLA 2.** Secuencias repetidas en tándem en los aislados Habana (HA) (14), 21G y 25G./ *Tandem repeat forms of MSP1a protein present in the Habana (HA) isolate (14), 21G and 25G.*

Tipo de repetidos	Secuencias	HA	21G	25G
A	DDSSASGQQQESSVSSQSE-ASTSS-QLG--	1	-	-
B	ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSS-QLG--	4	2	-
C	ADSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSS-QLG--	-	-	1
F	TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSS-QLG--	-	1	-
T	AGSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSS-QLG--	-	1	1
<b>Orden de los repetidos</b>		A-B-B-B-B	T-B-B-F	T-C
<b>Número total de repetidos</b>		5	4	2

Tal heterogeneidad genética observada entre cepas de *A. marginale* en regiones endémicas podría explicarse por el movimiento y mantenimiento de diferentes genotipos de ganado, por los acontecimientos de transmisión independiente, debido a la exclusión de la infección por *A. marginale* en el ganado y las garrapatas que se traduce en el establecimiento de un único genotipo de *A. marginale* por animal (16).

El repetido B está entre los repetidos más comunes en los aislados de *A. marginale* de América (12). Además, el repetido T también es frecuente en los aislados en Estados Unidos de América y Latinoamérica (8). En este trabajo se encontró similitud entre los repetidos en tándem que se encuentran en los aislados de *A. marginale* procedentes de Cuba y en otros países de América,

El gen *msp1 $\alpha$*  es estable durante la multiplicación en los hospederos vertebrados e invertebrados (12). No obstante, existe diversidad genética (*msp1 $\alpha$* ) entre los aislados en áreas endémicas en EUA, México, Argentina, Brasil y otros países; esto soporta la teoría del surgimiento de nuevas cepas que se mantienen en los rebaños y se encuentra una secuencia por animal, por el fenómeno de la exclusión de la infección que caracteriza la interacción de esta rickettsia y sus hospederos (15,17).

El estudio de estas secuencias repetidas resulta muy importante, pues incluyen marcadores para la transmisibilidad por garrapatas (15). El mecanismo de infección y transmisión de *A. marginale* por garrapatas es importante en la formulación de las estrategias de control y en el desarrollo de vacunas mejoradas contra la anaplasmosis. Esto es de suma importancia además, pues se sabe que la secuencia de MSP1a está conservada en todo el ciclo de vida de *A. marginale*, (18), lo que indica que esta proteína resulta un potencial candidato vacunal contra la anaplasmosis.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Proyecto CAPES/MES Cuba188/2013 por el financiamiento para esta investigación.

## REFERENCIAS

1. Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA. The natural history of *Anaplasma marginale*. Vet Parasitol. 2010;167:95-107.
2. Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas JL, Guglielmone A, Horak I, Jongejan F, et al. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. Exp Appl Acarol. 2006; 38:219-235.
3. de la Fuente J, Kocan KM, Blouin EF, Zivkovic Z, Naranjo V, Almazán C, Esteves E, Jongejan J, Daffre S, Mangold AJ. Functional genomics and evolution of tick-*Anaplasma* interactions and vaccine development. Vet Parasitol. 2010;167(2-4):175-86.
4. Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Garcia-Garcia JC. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. Parasitol. 2004;129:S285-S300.
5. Palmer GH, Rurangirwa FR, Kocan KM, Brown WC. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. Parasitol Today. 1999;15:281-286.
6. de la Fuente J, Van Den Bussche RA, Prado TM, Kocan KM. *Anaplasma marginale msp1 $\alpha$*  genotypes evolved under positive selection pressure but are not markers for geographic isolates. J Clin Microbiol. 2003;41:1609-1616.
7. Allred DR, McGuire TC, Palmer GH, Leib SR, Harkins TM, et al. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. Proc Natl Acad Sci. 1990;87:3220-3224.
8. de la Fuente J, Ruybal P, Mtshali MS, Naranjo V, Shuqing L, Mangold AJ, et al. Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. Vet Microbiol. 2007;119:382-390.
9. Torioni de Echaide S, Knowles DP, McGuire TC, Palmer GH, Suarez CE, McElwain FF. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. J Clin Microbiol. 1998;36:777-782.
10. Palmer GH, Knowles DP Jr, Rodriguez JL, Gnad DP, Hollis LC, et al. Stochastic transmission of multiple genotypically distinct *Anaplasma marginale* strains in a herd with high prevalence

- of *Anaplasma* infection. J Clin Microbiol. 2004;42:5381-5384.
11. Estrada-Peña A, Naranjo V, Acevedo-Whitehouse K, Mangold AJ, Kocan KM, et al. Phylogeographic analysis reveals association of tick-borne pathogen, *Anaplasma marginale*, MSP1a sequences with ecological traits affecting tick vector performance. BMC Biol. 2009;7:57.
  12. Cabezas-Cruz A, Passos LMF, Lis K, Kenneil R, Valdés JJ, Ferrolho J, et al. Functional and Immunological Relevance of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1a Sequence and Structural Analysis. PloS ONE. 2013;8:e65243.
  13. Garcia-Garcia JC, de la Fuente J, Bell-Eunice G, Blouin EF, Kocan KM. Glycosylation of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and its putative role in adhesion to tick cells. Infec Immun. 2004;72:3022-3030.
  14. Corona B, Minet C, Albina E, Vega A, Martínez S. Sequence of *mSP1α* gene of *Anaplasma marginale* Havana isolate and expression in eukaryotic cells. Span J Agric Res. 2005;3(3):275-280.
  15. de la Fuente J, Blouin EF, Kocan KM. Infection exclusion of the rickettsial pathogen, *Anaplasma marginale*, in the tick vector, *Dermacentor variabilis*. Clin Diagn Lab Immunol. 2003;10:182-184.
  16. de la Fuente J, Van Den Bussche RA, Garcia-Garcia JC, Rodriguez SD, Garcia MA, Guglielmone AA, et al. Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. Vet Microbiol. 2002;88:275-285.
  17. Lew A, Jorgensen W. Molecular approaches to detect and study the organisms causing bovine tick borne diseases: babesiosis and anaplasmosis. Afr J Biotech. 2005;4(4):292-302. Retrieved from <http://www.academicjournals.org/AJB>.
  18. Bowie MV, de la Fuente J, Kocan KM, Blouin EF, Barbet AF. Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. Gene. 2002;282:95-102.

Recibido: 4-11-2015.  
Aceptado: 20-3-2016.