

Evaluación y comparación de la sensibilidad de los cebadores que amplifican los genes *msp2* y *msp5* de *Anaplasma marginale* para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina

Eleizalde Mariana

Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios
Universidad Nacional Experimental "Simón Rodríguez"
areyna@immunobiologia.net.ve

Gómez-Piñeres Ely,

Departamento de Biología y Sanidad Animal
Universidad de Oriente
areyna@immunobiologia.net.ve

Mendoza Marta

Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios
Universidad Nacional Experimental "Simón Rodríguez"
areyna@immunobiologia.net.ve

Reyna-Bello1 Armando

Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios
Universidad Nacional Experimental "Simón Rodríguez"
areyna@immunobiologia.net.ve

Fecha de recepción: 23-03-2014 Fecha de aceptación: 15-04-2014

Resumen

La bacteria *A. marginale* infecta los eritrocitos en bovinos, ocasionando un cuadro anémico que afecta la productividad del animal, siendo necesaria la aplicación de métodos de diagnóstico sensibles y específicos para el control y tratamiento de la enfermedad. En este sentido, las técnicas moleculares se han convertido en una herramienta ideal para el diagnóstico, por lo tanto, tomando en cuenta que en Venezuela se ha desarrollado la técnica de PCR empleando los cebadores 19A y 19B que amplifican el gen *msp5* de la bacteria y

el reciente diseño de los cebadores *msp2A* y *msp2B*, los cuales amplifican el gen *msp2*, se propuso evaluar la sensibilidad de ambos pares de cebadores, así como su potencial para el diagnóstico molecular. Para ello se procedió a realizar un ensayo a partir de diluciones seriadas de una muestra de ADN cuantificada de referencia positiva *A. marginale* en una población de 22 animales, mediante la técnica de PCR, empleando en ambos casos los cebadores 19A/B y *msp2A/B*, con fines comparativos. Los resultados obtenidos demostraron que la sensibilidad de los cebadores que amplifican los ge-

nes *msp2* y *msp5* fue de 0.01ng/μl, siendo similar más no idéntica, ya que la intensidad de las bandas fue mayor empleando los cebadores que amplificaron el gen *msp5*. Este hecho se evidenció al evaluar la población bovina, donde al utilizar los cebadores *msp2A/B* y 19A/19B, se obtuvo una prevalencia de 13,63% y 68,18% respectivamente, concluyendo que los cebadores 19A/B son mejores para el diagnóstico de *A. marginale* en muestras bovinas de campo.

Palabras clave: Sensibilidad; cebadores; PCR ; *A. marginale*; diagnóstico

Evaluation and comparison of the sensitivity of the primers that amplify genes *msp2* and *msp5* de *Anaplasma marginale* for the diagnosis of the bovine anaplasmosis

Abstract

The bacterium *A. marginale* infects the erythrocytes in bovines, causing an anemic picture that affects the animal's productivity, being necessary the application of sensitive and specific diagnostic methods for the control and treatment of the disease. In this sense, molecular techniques have become an ideal tool for diagnosis, therefore, taking into account that in Venezuela the PCR technique has been developed using the primers 19A and 19B that amplify the *msp5* gene of the bacterium

and The recent design of the primers *msp2A* and *msp2B*, which amplify the *msp2* gene, aimed to evaluate the sensitivity of both pairs of primers, as well as their potential for molecular diagnosis. For this, an assay was carried out from serial dilutions of a sample of positive reference quantified DNA *A. marginale* in a population of 22 animals, using the PCR technique, using in both cases the primers 19A / B and *msp2A* / B, for comparative purposes. The results obtained showed that the sensitivity of the primers that amplify the *msp2* and *msp5* genes was 0.01ng / gl, be-

ing similar but not identical, since the intensity of the bands was greater using the primers that amplified the *msp5* gene. This fact was evidenced when evaluating the bovine population, where when using the primers *msp2A* / B and 19A / 19B, a prevalence of 13.63% and 68.18% respectively was obtained, concluding that the primers 19A / B are better for the Diagnosis of *A. marginale* in bovine field samples.

Key words: Sensitivity; primers; PCR; *A. marginale*; diagnosis

Introducción

La anaplasmosis es causada por una bacteria Gram-negativa del orden de las *Rickettsias*, la cual ocasiona anemia severa en rumiantes, pérdida de peso, baja productividad, disminución de libido en los toros, aborto y, a veces, hasta la muerte del animal enfermo, ocasionando cuantiosas pérdidas monetarias (Rivera, 1996).

En Venezuela, la seroprevalencia de *A. marginale* varía desde 10% hasta 95%, dependiendo de la región geográfica [Rivera, (1996); Reyna-Bello *et al.*, (1998); Eleizalde *et al.*, (2007)], y presenta una amplia distribución, lo cual puede deberse a varias causas: transporte de ganado sin control sanitario, un aumento de la transmisión mecánica por los insectos vectores y el uso de jeringas contaminadas a partir de portadores asintomáticos [Kocan *et al.*, (2003)].

Actualmente, se emplean muchas y variadas técnicas para el diagnóstico de la anaplasmosis, entre ellas la más común es la observación directa por frotis [(OIE, (2001)], la cual puede originar falsos positivos debido a depósitos de precipitados sobre las células rojas similares a la rickettsia. En cuanto a su sensibilidad, ésta es capaz de detectar 106 eritrocitos infectados por mL de sangre [Torioni de Echaide *et al.*, (1998)], garantizando el diagnóstico en la fase aguda de la enfermedad [Díaz *et al.*, (2003); Eleizalde *et al.*, (2007)]. No obstante, cuando los animales se encuentran en fase de infección crónica, resulta incapaz de detectar la

infección [Díaz *et al.*, (2003); Tavares-Marques y Reyna-Bello, 2006)]. Los métodos serológicos también se emplean para el diagnóstico de esta enfermedad, siendo el Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) el más ampliamente utilizado, por ser más sensible con respecto a otros métodos serológicos como la aglutinación en tarjeta [Barry *et al.*, (1986)] y la inmunofluorescencia indirecta (IFI) [Montenegro *et al.*, (1990)]. Entre los tipos de ELISA, el más utilizado es el ELISA indirecto (ELISAI), empleando como antígeno la proteína mayor de superficie 5 recombinante (MSP5r), la cual es conservada en todas las especies de *Anaplasma* [Visser *et al.*, (1992)], permitiendo el diagnóstico de animales en la fase crónica de la enfermedad [Knowles *et al.*, (1996); Reyna-Bello *et al.*, (1998); Tavares-Marques *et al.*, (2010)]. Sin embargo, debido a que esta técnica se fundamenta en la detección de anticuerpos contra el agente causal, no es capaz de distinguir una infección activa y una tratada. Por lo tanto, se han desarrollado otros métodos empleando técnicas de Biología Molecular, los cuales presentan una mayor sensibilidad y especificidad, permitiendo detectar el agente patógeno en las diferentes fases de la infección.

En este sentido, se ha desarrollado la técnica de PCR, la cual se basa en la amplificación de un segmento del ADN del patógeno empleando un par de cebadores específicos (Harris, 1998). La amplificación de los genes *msp5* y *msp2* ha sido empleada para el detección de *A. marginale*, logrando evidenciar la presencia de la bac-

teria no solo en bovinos (Eleizalde y Reyna-Bello, 2006), sino también en pequeño rumiantes (Tavares-Marques y Reyna-Bello, 2006). Sin embargo, en Venezuela, su potencial para diagnóstico no ha sido evaluado, y tomando en cuenta que el gen *msp2* es codificado por una familia multigénica, encontrándose repetido 56 veces en el genoma de la bacteria, mientras que el gen *msp5* es de copia simple [Brayton *et al.*, (2005)], se procedió evaluar y comparar la sensibilidad de la PCR empleando los cebadores que amplifican estos genes, así como su potencial para el diagnóstico molecular en muestras de campo.

Materiales y Métodos

Amplificación del gen *msp2* y gen *msp5* de *A. marginale* mediante la técnica PCR

Las reacciones de PCR fueron ejecutadas en un termociclador Cycler Eppendorf® con un volumen final de 25 µL para la amplificación de los genes *msp5* (Tavares-Marques y Reyna-Bello, 2006) y *msp2* (Eleizalde y Reyna-Bello, 2006). Se utilizó como control positivo ADN bovino infectado experimentalmente con un aislado de *A. marginale* procedente del Estado Zulia (Am76615) con un rickettsemia de 25% y, como control negativo, ADN de un bovino sano de referencia (ambos cuantificados previamente con el fluorómetro Qubit®).

La concentración de ADN genómico utilizada fue de 100 ng por reacción y las concentraciones de

reactivos para la mezcla de reacción, así como el protocolo de ciclado para la amplificación de los genes *msp2* y *msp5* se muestra en las Tablas 1, 2 y 3, 4 respectivamente. Los productos

se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8% para observar las bandas de 517 pb y 1240 pb, correspondientes a los genes *msp5* y *msp2*, respectivamente. Para la tinción

de los geles se utilizó SYBR® safe DNA (Invitrogen), en una relación de 1 µl por cada 10 ml de buffer TAE 1X y finalmente se visualizaron en un transluminador Uvitec.

Tabla 1. Mezcla de reacción PCR para amplificación del gen *msp2*

Reactivo	Concentración		Volumen 1 rxn (µl)
	Inicial	final	
Buffer	5X	1X	5
MgCl ₂	25 mM	3 mM	3
dNTPs	40 mM	200 µM	0,5
MSP2A	10 µM	2.5 mM	0,5
MSP2B	10 µM	2.5 mM	0,5
Taq polimerasa	5U		0,125
ADN	_____	100 ng	
H ₂ O	_____		
Volumen final			25

Tabla 2. Condiciones de ciclado para amplificación del gen *msp2*

Ciclo	Temp (°C)	Tiempo (min)	Repeticiones
Desnaturalización inicial	95	5	1
Desnaturalización	95	1	
Hibridación	55	1	35
Extensión	72	2	
Extensión final	72	10	1
Mantenimiento	4	∞	

Tabla 3. Concentraciones de reactivos para la amplificación del gen *msp5* (Tavares- Márques y Reyna-Bello, 2006)

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen por reacción (25 µl)
Buffer	5X	1X	5
MgCl ₂	25 mM	3 mM	3
dNTPs	40 mM	200 µM	0,5
19A	10 µM	2.5 mM	0,5
19B	10 µM	2.5 mM	0,5
Taq polimerasa	5U		0,125
ADN	_____	100 ng	_____
H ₂ O	_____	_____	_____
Volumen final			25

Tabla 4. Condiciones de ciclado estandarizadas para la amplificación del gen *msp5* (Tavares-Márques y Reyna-Bello, 2006)

Ciclo	Temp (°C)	Tiempo	Repeticiones
Desnaturalización inicial	94	5'	1
Desnaturalización	94	45''	
Hibridación	64	30''	35
Extensión	72	1'	
Extensión final	72	10'	1
Mantenimiento	4	∞	

Determinación de la sensibilidad de los cebadores *msp2A/B* que amplifican el gen y los cebadores 19A/B que amplifican el gen *msp5* de *A. marginale*

La muestra de ADN control positivo se diluyó en forma seriada en agua bidestilada estéril, para así obtener concentraciones desde 300 ng hasta 0,000000001 ng. Estas mues-

tras se analizaron mediante la técnica de PCR para amplificación de los genes *msp2* y *msp5* y los productos obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa, teñidos en SYBR safe ® DNA y corridos a 90 voltios.

Diagnóstico molecular de una población bovina mediante la técnica PCR empleando los cebadores *msp2A/B* y 19A/B

Se obtuvieron 22 muestras de sangre de una población bovina procedente de la región Pao de Zarate, Estado Aragua, a partir de la vena yugular, en tubos con EDTA, para posteriormente realizar las extracciones de ADN utilizando el estuche Wizard Genomic DNA® Purification Kit A1120 (Promega), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Una vez obtenidas las muestras de ADN, se procedió a la realización de

la técnica PCR, empleando los cebadores específicos para la amplificación de los genes *msp2* y *msp5* de *A. marginale* y visualizando los productos en geles de agarosa 0,8% teñidos con SYBR® safe DNA.

Resultados y Discusión

Con el fin de evaluar las condiciones para la amplificación de los

genes *msp2* y *msp5*, se realizó un ensayo PCR siguiendo los protocolos reportados por Tavares-Marques y Reyna-Bello (2006) y Eleizalde y Reyna-Bello (2006), evidenciando en la reacción (empleando el ADN control positivo) la presencia de las bandas de 517 pares de bases (pb) y de 1240 pb correspondientes a los genes *msp5* y *msp2* de *A. marginale*, respectivamente; mientras que en

la reacción con ADN de un bovino negativo de referencia y la reacción control del sistema, que consistió en la reacción de PCR sin ADN, no se obtuvo producto de amplificación, evidenciando el buen funcionamiento del sistema (Figuras 1 y 2).

Figura 1. Evaluación de la amplificación del gen *msp5* mediante la técnica de PCR. Carril 1: ADN de bovino positivo a *Anaplasma marginale*; carril 2: ADN de bovino negativo a *A. marginale*; carril 3: control del sistema sin ADN. Std 1 Kb: Estándar de peso molecular de 1 kilobase.

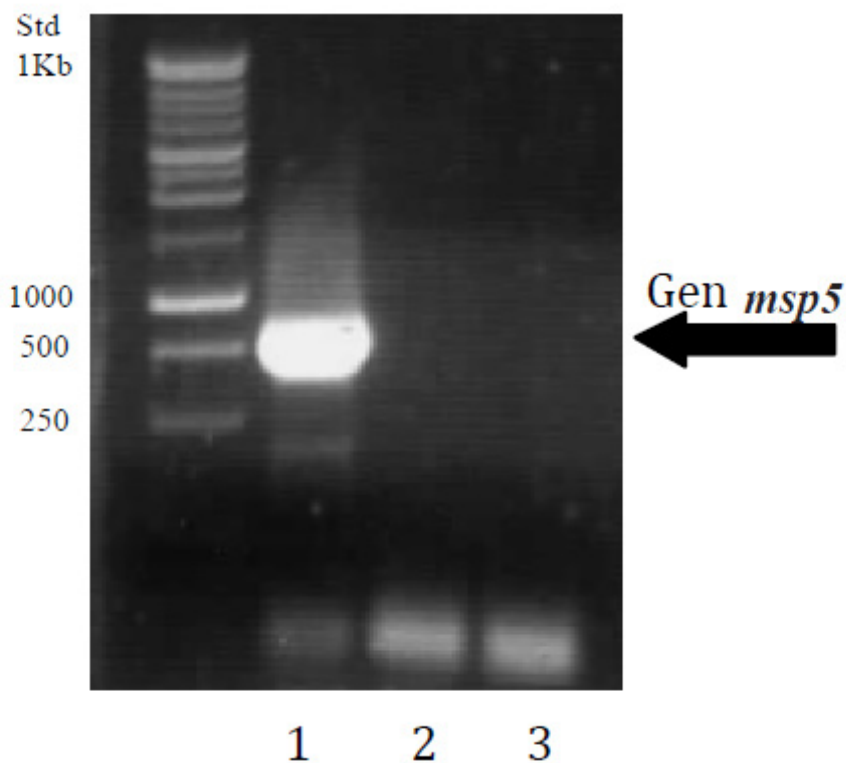
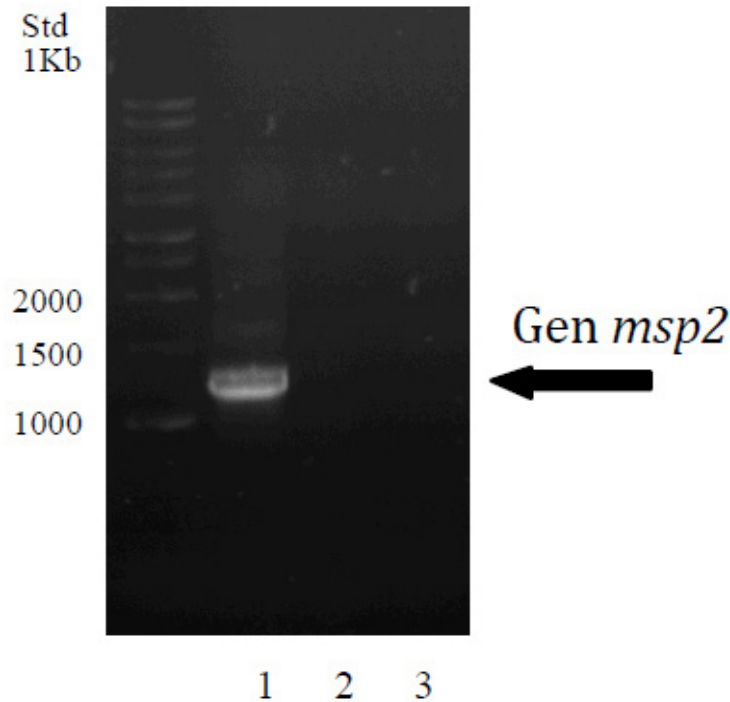


Figura 2. Amplificación del gen *msp2* de *A. marginale* utilizando los cebadores *msp2A* y *msp2B*. Carril 1. ADN proveniente de un bovino positivo a *A. marginale*; carril 2: ADN de bovino negativo; carril 3. Control sin ADN. Std 1 Kb: Estándar de peso molecular de 1 kilobase.



En cuanto a la sensibilidad, la cual es definida como la mínima cantidad de ADN necesaria para producir el amplicón esperado [Fernández *et al.*, (2009)], en las Figuras 3 y 4 se puede observar que las bandas de amplificación de 1240 pb y 517pb correspondientes a los genes *msp2* y

msp5 respectivamente, son visibles en los carriles del 1 al 6, donde la concentración de ADN varía entre 300 ng hasta 0,01 ng. Por lo tanto, se puede afirmar que la sensibilidad para ambos pares de cebadores fue similar. Sin embargo, la intensidad de las bandas fue diferente en ambos

ensayos. Los productos de amplificación del *msp5* se visualizaron como bandas más intensas, las cuales siguen mejor el patrón de dilución, en comparación con el ensayo utilizando los cebadores *msp2A/B*.

Figura 3. Evaluación de la sensibilidad de los cebadores *msp2A* y *msp2B* que amplifican el gen *msp2*, mediante la técnica de PCR utilizando diluciones sucesivas de ADN proveniente de un bovino infectado con *A.marginale* (aislado AmAPZ1). Carriles 1 al 12: Diluciones seriadas de ADN desde 300ng a 10-8 ng; carril 13: Control negativo. ADN proveniente de un bovino sano de referencia; carril 14: control sin ADN.

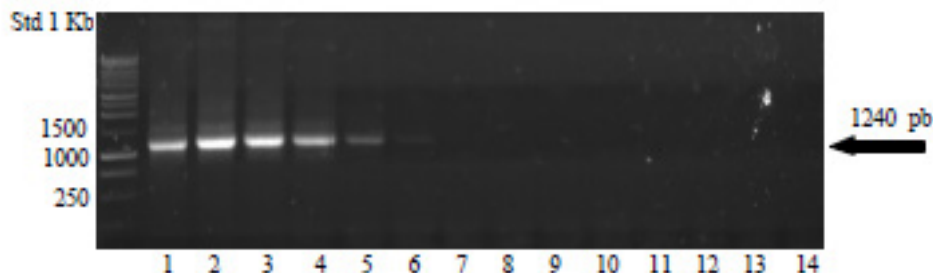
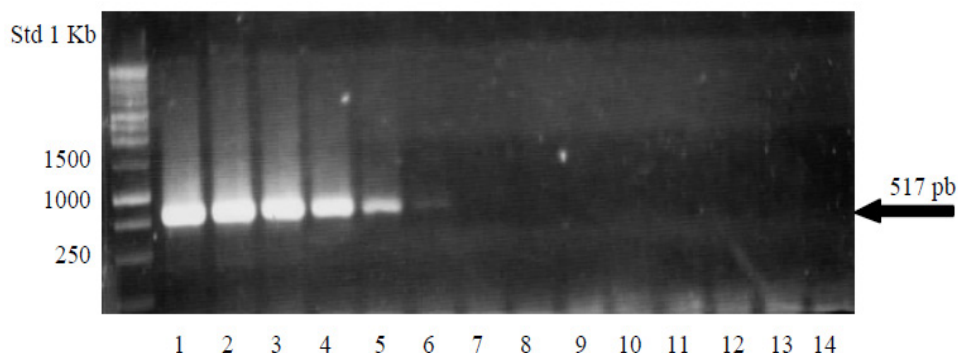


Figura 4. Evaluación de la sensibilidad de los cebadores 19A y 19B que amplifican el gen *msp5*, mediante la técnica de PCR utilizando diluciones sucesivas de ADN proveniente de un bovino infectado con *A. marginale* (aislado AmAPZ1). Carriles 1 al 12: Diluciones seriadas de ADN desde 300ng a 10-8 ng; carril 13: Control negativo. ADN proveniente de un bovino sano de referencia; carril 14: control sin ADN.



Por otra parte, al evaluar el porcentaje de detección para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina de los cebadores en la población bovina, se obtuvo como resultado que al utilizar los cebadores *msp2A/B* (Figura 5), correspondientes al gen *msp2*, solo tres de las muestras evaluadas resultaron positivas, es decir, 13,63 % de la población analizada. Mientras que utilizando los cebadores 19A/19B, correspondientes al gen *msp5*, 15

muestras resultaron positivas (Figura 6), lo cual corresponde a 68,18% de la población.

Se ha reportado que la amplificación mediante la técnica PCR depende de la cantidad y calidad de la muestra de ADN, así como del número de veces que se repite la secuencia blanca en el genoma del organismo y de la longitud y homología de los cebadores [Harris,

(1998); Fernández *et al.*, (2009)]. De acuerdo con esto, y tomando en cuenta que: (1) para la evaluación de ambos pares de cebadores se emplearon las mismas muestras de ADN en la misma cantidad; (2) Los cebadores en estudios poseen una longitud similar y (3) el gen *msp5* existe en copia única, mientras que el gen *msp2* es multicopia [Brayton *et al.*, (2005)], es posible que un menor porcentaje de detección para la PCR,

empleando los cebadores mspA/B, se deba a una menor homología de los mismos con su secuencia blanco. Estudios recientes en nuestro laboratorio han evidenciado que las regiones terminales del gen *msp2*, las cuales han sido reportadas como altamente conservadas [Barbet *et al.*, (2000); Brayton *et al.*, (2005)] y a partir de las cuales se diseñaron los cebadores msp2A/B, presentan hasta diez variaciones nucleotídicas entre aislados venezolanos, lo cual podría contribuir al bajo porcentaje de detección para la Anaplasmosis bovina para la PCR utilizando estos cebadores. Adicionalmente, los cebadores msp2A/B fueron incapaces de detectar la presencia de la bacteria en bovinos procedentes de El Baúl, estado Cojedes, cuyo diagnóstico por frotis resultó positivo, mientras que la PCR empleando los cebadores 19A/B si fueron capaces de detectar la presencia del agente (resultados no mostrados). Por lo tanto, se recomienda el uso de la PCR empleando los cebadores 19A/B que amplifican el gen *msp5* para el diagnóstico de la Anaplasmosis bovina y el establecimiento de la prevalencia de la enfermedad en los rebaños nacionales.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que los cebadores 19A/B son mejores para el diagnóstico de *A. marginale* en muestras de campo, debido a que amplifican un gen más conservado, mientras que las variaciones nucleotídicas halladas en los extremos conservados del gen *msp2* pudiesen

influir negativamente en la eficiencia de la técnica; más aún, cuando trabajos realizados en nuestro laboratorio demuestran que estas variaciones divergen entre aislados, resultando así un falso negativo como diagnóstico, lo cual fue evidenciado en este estudio al evaluar la población bovina de la región del Pao de Zarate.

Referencias Bibliográficas

- Barbet, A.F.; Lundgren, A.; Yi, J.; Rurangirwa, F.R.; Palmer, G.H. (2000). Antigenic variation of *Anaplasma marginale* by Expression of MSP2 Mosaics. *Infection and Immunity*. 68(11):6133-6138.
- Barry, D.N., Parker, R.J., De Vos, A.J., Dunster, P., Rodwell, B.J. (1986). A Microplate Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay for Measuring Antibody to *Anaplasma marginale* in Cattle Serum. *Australian Veterinary Journal*. 63(3): 76-79.
- Brayton, K. A., Kappmeyer, L. S., Herndon, D. R., Dark, M. J., Tibbals, D. L., Palmer, G. H. Knowles, D. P. (2005). Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102(3), 844-849.
- Díaz, D.; Valera, Z.; Andrade, E.; Parra, O.; Escalona, F.; Ramírez, R. (2003). Prevalencia de *Anaplasma marginale* en Bovinos, Sector La Piñata, Municipio La Cañada de Urdaneta, Estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias-LUZ*. 13(3):193-198.
- Eleizalde, M.C.; Caballero, H., Reyna-Bello, A. (2007). Evaluación y Mejoramiento del Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) Para Diagnóstico de la Anaplasmosis Bovina. *Revista Científica. Facultad de Ciencias Veterinarias-LUZ*. 17(4): 349-356.
- Eleizalde, M.C.; Reyna-Bello, A. (2006). Diagnóstico por PCR de la Anaplasmosis Bovina Utilizando el gen *msp2* de *A. marginale*. AsoVAC. Cumaná-Venezuela.
- Fernández, D.; Eleizalde, M.C.; González-Baradat, B.; González-Marciano, E.; Perrone, T.; Mendoza, M. (2009). *Trypanosoma evansi*: A Comparison of PCR and Parasitological Diagnosis Test in Experimentally Infected Mice. *Experimental Parasitology*. 121: 1-7.
- Harris, E. (1998). *A Low-cost Approach to PCR*. New York, USA, Oxford University Press. 304pp.
- Knowles, D., Torioni de Ecahide, S., Palmer, G.H., McGuire, T.C., Stilller, D., McElwain, T.F. (1996). Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 Epitope common to Tick and Erythrocyte Stages Identifies Persistently In-

- fected Cattle. *Journal of Clinical Microbiology*. 34:2225-2230.
- Kocan, K.M., De la Fuente, J., Guglielmone, J. A., Meléndez, R.D. (2003). Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection cattle. *Clinical Microbiology Review*. 16(4): 698-712.
- Montenegro-James, S., Guillén, T., Tapang, P., Abdel-Gawad, A., Toro, M. and Ristic, M. (1990). Use of the Dot Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay with Isolate *Anaplasma marginale* Initial Bodies for Serodiagnosis of Anaplasmosis in Cattle. *American Journal Veterinary Research*. 51(10): 1518-1521.
- OIE. Organización Internacional de Epizootia. 2008. Manual de la OIE sobre animales terrestres. Cap. 2.4.1. Anaplasmosis bovina. pp: 1-13.
- Reyna-Bello, A.; Cloeckert, A.; Vizcaíno, N.; Gonzatti, M.; Aso, P.; Dubray, G.; Zigmunt, M. (1998). Evaluation of an Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5 for Serological Diagnosis of Bovine Anaplasmosis in Venezuela. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 5(2): 259-262.
- Rivera, M. (1996). Hemoparasitosis Bovina. Caracas, Universidad Central de Venezuela. Ediciones Anaaco. 238pp.
- Tavares-Marques, L., Nunez, C., Rey-Valerion, C., Reyna-Bello, A. 2010. Serological evidence of *Anaplasma spp.* in small ruminants from Venezuela using recombinant MSP5 in immunoenzymatic assay. *Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias -LUZ*. 20(5): 506- 511
- Tavares-Marques, L.; Reyna-Bello, A. (2006). Estandarización de la técnica de PCR para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina y ovina. *Agronomía Tropical*. (56)4: 501-502.
- Torioni de Echaide, S. ; Knowles, D.; McGuire, T.; Palmer, G.; Suarez, C.; McElwain, T. (1998). Detection of Cattle Naturally Infected with *Anaplasma marginale* in a Region of Endemicity by Nested PCR and a Competitive Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5. *Journal of clinical Microbiology*. 36(3): 777-782.
- Visser, E.; McGuire, T.; Palmer, G.; Davis, W.; Shkap, V.; Pipano, E.; Knowles, Jr. (1992). The *Anaplasma marginale msp5* Gene Encode a 19 Kilodalton Protein Conserved in All Recognized Anaplasma Species. *Infection and immunity*. 60(12): 5139- 5144.