

# Transmisión de *Anaplasma marginale* por garrapatas

## Tick Transmission of *Anaplasma marginale*

Kelly A. Brayton<sup>a</sup>

### RESUMEN

*Anaplasma marginale*, patógeno de distribución mundial, es transmitido por garrapatas Ixódidas. Comprender su complejo desarrollo dentro de la garrapata vector, permitirá la predicción de brotes y ofrecerá oportunidades para controlar su transmisión. En este trabajo se revisa su ciclo básico de desarrollo junto con los estudios recientes acerca de las diferencias de transmisión entre cepas, que delinear aspectos de la interacción patógeno - vector. Bacterias, virus o protozoarios transmitidos por artrópodos causan enfermedades severas, tanto en humanos como en animales. Las enfermedades infecciosas transmitidas por garrapatas, entre las que incluimos a la Anaplasmosis (*A. marginale*), babesiosis (*Babesia bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens*) y Theileriosis (*Theileria annulata*, *T. parva*), se encuentran entre las más importantes en el ámbito mundial, con pérdidas cercanas a los siete mil millones de dólares anualmente; y, a pesar de su impacto, permanecen escasamente bajo control, basado primordialmente en la aplicación de acaricidas, para interrumpir su transmisión. La aparición de garrapatas resistentes a múltiples sustancias acaricidas, representa una amenaza en este tipo de control y, como resultado, hay un resurgimiento de la investigación para el desarrollo de nuevas estrategias para su control. Nuevas opciones para prevenir la transmisión de patógenos de animales por garrapatas, será el resultado de entender las interacciones garrapata-patógeno; proceso que culmina con el desarrollo de la infección y transmisión exitosa. En todos los casos de patógenos transmitidos por garrapatas, el desarrollo de la infección se realiza coordinadamente a los momentos de adhesión y alimentación del vector sobre el animal. Esto sucede por la interdependencia en la señalización entre el patógeno y el vector al alimentarse y, por ello, será susceptible de intervención.

**PALABRAS CLAVE:** *Anaplasma marginale*, Transmisión, Garrapatas.

### ABSTRACT

*Anaplasma marginale* is a globally prevalent pathogen of cattle transmitted by Ixodid ticks. Understanding the complex development of *A. marginale* in the tick vector will allow for better prediction of disease outbreaks and will afford opportunities for control of disease transmission. The basic developmental cycle of *A. marginale* in the tick is reviewed here along with recent studies exploiting differences in transmission between strains to delineate aspects of the interaction between the pathogen and the vector. Bacterial, protozoan, and viral pathogens transmitted by arthropod vectors result in severe disease in animals and humans. Despite their impact, these infections remain poorly controlled with primary reliance on acaricides to block tick transmission. The rapid emergence of tick resistance to multiple acaricides threatens this control and has resulted in a resurgence of research to develop novel strategies for control. Novel approaches to preventing tick-borne transmission of livestock pathogens will result from understanding the interaction between the pathogen and the tick, a process that culminates with development of infectivity and successful transmission. In all of the tick-transmitted pathogens, development of pathogen infectivity is coordinated with attachment and feeding of the tick upon the animal. This is clearly dependent upon signaling between the feeding vector and the pathogen and thus susceptible to intervention.

**KEY WORDS:** *Anaplasma marginale*, Transmission, Ticks.

### INTRODUCCIÓN

Enfermedades infecciosas transmitidas por garrapatas, incluida la anaplasmosis (*A. marginale*), babesiosis (*Babesia bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens*), y teileriosis (*Theileria annulata*, *T. parva*), son algunas de las enfermedades animales más importantes a nivel mundial con costos económicos anuales estimados en \$ 7 mil millones<sup>(1,2)</sup>. *A. marginale* es una rickettsia patógena intraeritrocítica transmitida por garrapatas, y ocasiona la infección transmitida por garrapatas más frecuente del ganado en el mundo y dentro de los EE.UU.<sup>(3-5)</sup>, donde se cree que la

### INTRODUCTION

Tick-borne infectious diseases, including anaplasmosis (*A. marginale*), babesiosis (*Babesia bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens*), and theileriosis (*Theileria annulata*, *T. parva*), are among the most globally important livestock diseases with annual economic costs estimated at \$7 billion<sup>(1,2)</sup>. *A. marginale* is an intraerythrocytic tick-transmitted rickettsial pathogen and causes the most prevalent tick-borne infection of cattle both worldwide and within the U.S.<sup>(3-5)</sup>. In the U.S., anaplasmosis is thought to be responsible for at least 50-100,000 cattle deaths per year with economic losses ranging

<sup>a</sup> Programs in Vector-borne Disease and Genomics, Department of Veterinary Microbiology and Pathology, School for Global Animal Health, Washington State University, Pullman, WA 99164-7040, USA kbrayton@vetmed.wsu.edu

anaplasmosis es responsable de al menos 50-100,000 muertes de ganado por año, con pérdidas económicas que van desde 30 hasta 60 millones de dólares en 1997<sup>(6,7)</sup>. En México, la prevalencia de *A. marginale* alcanza > 50% en las zonas endémicas<sup>(8,9)</sup>. Después de la transmisión, *A. marginale* invade y se replica en los eritrocitos maduros y, durante la fase aguda de la enfermedad, la rickettsemia intraeritrocítica aumenta dramáticamente a niveles de  $10^9$  *A. marginale* por mililitro de sangre. Esto se traduce en anemia hemolítica severa y una tasa de fatalidad del 36 %<sup>(10,11)</sup>. Los animales que sobreviven a la enfermedad aguda, permanecen infectados persistentemente con ciclos con niveles fluctuantes de  $10^2 - 10^7$  organismos por mililitro<sup>(12,13)</sup>. Esta persistencia, que refleja la variación antigénica de las proteínas inmunodominantes de membrana externa<sup>(14-20)</sup>, es fundamental para la continua transmisión, ya que el paso transovárico de *A. marginale* dentro de la garrapata vector no ocurre<sup>(21)</sup>. En consecuencia, la transmisión depende de animales infectados que son reservorios como fuente de la infección hacia las garrapatas. Es importante destacar que este ganado con infección persistente sirve como reservorio eficiente para la transmisión por garrapatas<sup>(22-25)</sup>.

### **Biología de la infección de la garrapata por *A. marginale***

Se ha demostrado que *A. marginale* es transmitida por garrapatas ixodidas, incluyendo *Dermacentor andersoni* y *D. variabilis* en los EE.UU., y siendo quizá *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, el vector más importante en las regiones tropicales y subtropicales del mundo<sup>(26-29)</sup>. Después de la ingestión de la sangre en el lumen del intestino medio de la garrapata, *A. marginale* invade y coloniza el epitelio del intestino medio mediante un proceso que es mediado por receptores en el que participa la proteína de superficie MSP1a o por un proceso de fagocitosis más generalizada<sup>(30-34)</sup>. Dentro de las células epiteliales del intestino medio de la garrapata, *A. marginale* se replica dentro de vacuolas intracelulares para formar colonias de hasta varios cientos de células de microorganismos, equivalentes a  $10^6$  organismos por intestino<sup>(35-37)</sup>. Ver Figura 1. Después de esta replicación inicial en el epitelio del intestino medio, *A. marginale* entra en la hemolinfa y

from 30 to 60 million in 1997 dollars<sup>(6,7)</sup>. In Mexico, the prevalence of *A. marginale* reaches > 50 % in endemic areas<sup>(8,9)</sup>. Following transmission, *A. marginale* invades and replicates in mature erythrocytes and during the acute phase of disease the intraerythrocytic rickettsemia increases dramatically to levels of  $10^9$  *A. marginale* per milliliter of blood. This results in severe hemolytic anemia and a case fatality rate of 36 %<sup>(10,11)</sup>. Cattle that survive acute disease remain persistently infected with cyclically fluctuating levels of  $10^2 - 10^7$  organisms per milliliter<sup>(12,13)</sup>. This persistence, which reflects antigenic variation of the immunodominant outer membrane proteins<sup>(12,14-20)</sup>, is fundamental to continued transmission as transovarial passage of *A. marginale* within the tick vector does not occur<sup>(21)</sup>. Consequently, transmission is dependent on the infected animal reservoir as a source for *de novo* infection of ticks. Importantly, these persistently infected cattle serve as efficient reservoirs for tick-borne transmission<sup>(22-25)</sup>.

### ***A. marginale* tick infection biology**

*A. marginale* has been shown to be transmitted by ixodid ticks, including *Dermacentor andersoni* and *D. variabilis* in the U. S., and with *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* being perhaps the most important vector in tropical and subtropical regions of the world<sup>(26-29)</sup>. Following ingestion of the bloodmeal into the tick midgut lumen, *A. marginale* invades and colonizes the midgut epithelium in a receptor mediated process thought to involve the surface protein MSP1a or by a more generalized phagocytic process<sup>(30-34)</sup>. Within the midgut epithelial cells, *A. marginale* replicates within intracellular vacuoles to form colonies of up to several hundred cell microorganisms, or  $10^6$  organisms per midgut<sup>(35-37)</sup> as illustrated in Figure 1. After this initial replication in the midgut epithelium, *A. marginale* enters the hemolymph and subsequently invades the salivary gland epithelial cells<sup>(30,31,38)</sup>.

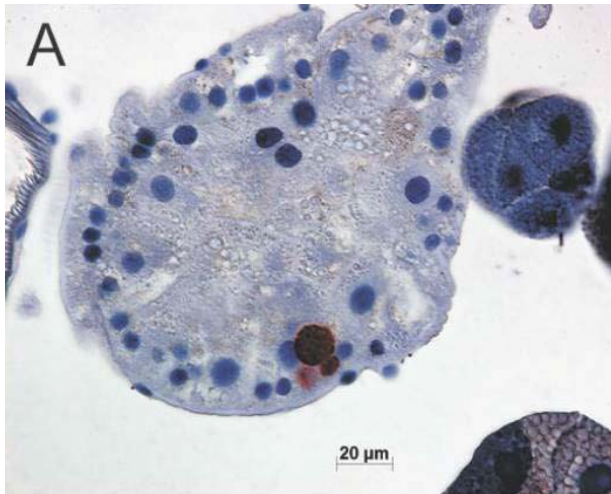
Final replication of up to  $10^6$  organisms per salivary gland and development of infectivity requires re-attachment and initiation of feeding followed by inoculation of *A. marginale* with the saliva into the susceptible host<sup>(30,31,35,38)</sup>. Thus, *A. marginale* transmission requires efficient invasion and replication in tick tissues, culminating in the

## TRANSMISIÓN DE *A. marginale* POR GARRAPATAS

posteriormente invade las células epiteliales de la glándula salival<sup>(30,31,38)</sup>.

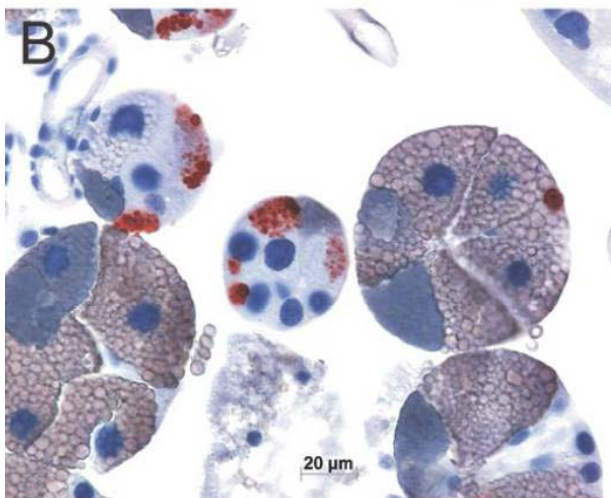
development of infectivity in the salivary gland.

Figura 1: Tinción inmunohistoquímica de *A. marginale* en la garrapata.  
*Figure 1: Immunohistochemistry of A. marginale in the tick.*



Cortes de *D. andersoni* alimentadas en terneras infectadas con la cepa St. Maries se usaron para la detección de colonias (en rojo) por inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal específico ANAR49. Los cortes se tiñeron para contraste con hematoxilina. Panel A, corte de intestino; panel B, corte de glándula salival mostrando la localización en las células del acini granular.

Imagen amablemente proporcionada por Masaro Ueti.



Sections of *D. andersoni* ticks fed on calves infected with the St. Maries strain were used for detection of colonies (red color) by immunohistochemistry with *A. marginale*-specific monoclonal antibody ANAR49. Panel A is a section of midgut, panel B is a section of salivary gland showing localization in the granular acini cells. Sections were counterstained with hematoxylin.

Image kindly provided by Massaro Ueti.

El desarrollo de la infectividad requiere una replicación final de hasta  $10^6$  organismos por glándula salival y, la fijación y el inicio de la alimentación seguida por la inoculación de *A. marginale* con la saliva en el huésped susceptible<sup>(30,31,35,38)</sup>. Por lo tanto, la transmisión de *A. marginale* requiere invasión y replicación eficiente en los tejidos de la garrapata, que culmina en el desarrollo de la infecciosidad de la glándula salival.

Estudios recientes de nuestro grupo se han centrado en la eficiencia de transmisión de las

Recent studies from our group have focused on transmission efficiency of various strains of *A. marginale*. The St. Maries strain is used as the prototypically highly transmissible strain; however other highly transmissible strains include Puerto Rico, Virginia and EMø<sup>(25,26,29,39-43)</sup>. Several strains have been classified as “non-transmissible”, including the Florida, Mississippi, and the Israel vaccine strain, as previous studies have not been able to demonstrate transmission with the tick vectors studied<sup>(25,36,44-46)</sup>. We are exploiting the clearly documented phenotypic difference in strain

distintas cepas de *A. marginale*. La cepa St. Maries se utiliza como la cepa prototipo de alta transmisibilidad, sin embargo otras cepas altamente transmisibles incluyen la cepa, Puerto Rico, Virginia y EMØ<sup>(25,26,29,39-43)</sup>. Varias cepas han sido clasificados como "no transmisibles", incluyendo la cepa Florida, Mississippi, y la cepa vacunal de Israel, ya que en estudios anteriores no se pudo demostrar la transmisión con las garrapatas estudiadas<sup>(25,36,44-46)</sup>. Actualmente estamos explotando esta diferencia fenotípica en transmisibilidad cepa bien documentada para diseccionar la relación patógeno-vector en un esfuerzo por entender mejor el proceso de transmisión y estos estudios se detallan a continuación.

### La transmisión es un fenómeno dosis-dependiente

La cepa vacunal Israel es una cepa de *Anaplasma marginale sensu lato* subsp. *centrale* avirulenta utilizada en Israel, Sudáfrica, Australia y América del Sur para reducir la gravedad de la infección con cepas de *A. marginale sensu stricto*. Estudios recientes de la transmisión de la cepa de Israel con 70 *Dermacentor andersoni*, 63 *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, 49 *Rhipicephalus sanguineus*, y 52 *Hyalomma excavatum* no lograron transmitir la infección<sup>(36,41,45)</sup>. Al examen molecular del intestino medio de garrapatas y de los tejidos de la glándula salival se detectó la cepa vacunal en garrapatas *R. sanguineus*, aunque los niveles de infección no se cuantificaron<sup>(45)</sup>. El análisis cuantitativo demostró que esta cepa infecta los intestinos y las glándulas salivales de garrapatas *Dermacentor andersoni*, en niveles comparables a los de la cepa St. Maries, altamente transmisible<sup>(36)</sup>. Esto llevó al análisis del nivel del organismos en la saliva de garrapatas tratadas con dopamina para inducir la salivación, y se demostró que no sólo muchas menos garrapatas secretan el organismo (30 % de las garrapatas infectadas con la cepa Israel, en comparación con el 96 % de garrapatas infectadas con San Maries), y las que lo hicieron secretaban 10 veces menos que las infectadas con la cepa San Maries. Posteriormente, se logró la transmisión exitosa mediante el aumento de la carga de garrapatas a 425 *D. andersoni*, lo que indica que la baja eficiencia de transmisión de la cepa de la vacuna

transmisibilidad to dissect the pathogen-vector relationship in an effort to better understand the transmission process and these studies are detailed below

### Transmission is a dose dependent phenomenon

The Israel vaccine strain is an avirulent *sensu lato* *Anaplasma marginale* subsp. *centrale* strain used in Israel, South Africa, Australia and South America to reduce the severity of infection with *A. marginale sensu stricto* strains. Recent Israel strain transmission studies using 70 *Dermacentor andersoni*, 63 *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, 49 *Rhipicephalus sanguineus*, and 52 *Hyalomma excavatum* ticks failed to transmit the infection<sup>(36,41,45)</sup>. Molecular examination of tick midgut and salivary gland tissues detected the vaccine strain in *R. sanguineus* ticks, although the infection levels were not quantified<sup>(45)</sup>. Quantitative analysis demonstrated that this strain infected *Dermacentor andersoni* tick midguts and salivary glands at levels comparable to that of the efficiently transmitted St. Maries strain<sup>(36)</sup>. This led to the analysis of the level of the organism in the saliva of ticks treated with dopamine to induce salivation and showed that not only did many fewer ticks secrete the organism (30 % of Israel strain infected ticks as compared to 96 % of St. Maries infected ticks), but those that did secreted 10 fold less than St. Maries infected ticks. Subsequently, a successful transmission was achieved by increasing the tick burden to 425 *D. andersoni* ticks, indicating that the low transmission efficiency of the Israel vaccine strain is reflective of the reduced dose delivered in the saliva<sup>(35)</sup>.

A dose dependent effect on transmission efficiency has important ramifications for our understanding of the pathogen-vector dynamic. Firstly, this implies that strains that have been classified as non-tick transmissible may, in fact, be transmissible under the right conditions, and as such we must realign our thinking to terms of transmission efficiency rather than the absolute of "transmission" vs "no transmission". Secondly, "the right conditions" for a strain could involve both tick burden and the complex interaction of a strain with a given tick population, as it has been demonstrated different populations of *D. andersoni* ticks have differing susceptibilities to *A. marginale*

Israel, es un reflejo de la reducción de la dosis entregada en la saliva<sup>(35)</sup>.

Un efecto dosis-dependiente en la eficiencia de transmisión tiene ramificaciones importantes para nuestra comprensión de la dinámica patógeno-vector. En primer lugar, esto implica que las cepas que han sido clasificadas como no transmisibles por garrapata, de hecho, pueden ser transmisibles en condiciones apropiadas y, como tal debemos alinear nuestro pensamiento en términos de eficiencia de la transmisión en lugar del absoluto "transmisión" vs "no transmisión". En segundo lugar, "las condiciones adecuadas" para una cepa podrían incluir tanto la carga de garrapatas y la compleja interacción de una cepa con una población de garrapatas en particular, como ya se ha demostrado que diferentes poblaciones de garrapatas *D. andersoni* tienen diferentes susceptibilidades a la infección por *A. marginale*<sup>(37)</sup>. En Norte América, las cepas con una eficiencia de transmisión alta se verían favorecidas por garrapatas transmisoras de baja carga en el ganado<sup>(47)</sup>. La carga de la garrapata tiende a ser mayor en las regiones más cálidas, con una variación que resulta en episodios de alta carga de garrapatas que pueden permitir la transmisión de cepas de baja eficiencia de transmisión<sup>(35,48,49)</sup>.

#### **Una estrategia genómica comparativa para identificar genes implicados en la transmisión**

La cepa de la Florida es una cepa de baja eficiencia de transmisión para la que la transmisión no se ha logrado con las siguientes especies de garrapatas: *D. andersoni*, *D. variabilis*, *R. (B.) microplus* y *R. (B.) annulatus* en las condiciones ensayadas<sup>(25,44,46)</sup>. El defecto de la cepa de la Florida se produce a nivel del intestino medio: los estudios *in vitro* sugieren una falla de la proteína de superficie MSP1a, una adhesina, para unirse a las células epiteliales del intestino medio, mientras que en estudios *in vivo* han demostrado la entrada en el epitelio del intestino medio seguida por su remoción sin una primera ronda de replicación detectable<sup>(33,44,46,102)</sup>. Se desconoce si este defecto representa el único factor determinante de la transmisibilidad (o eficiencia de la transmisión). Para efectuar un análisis más global de los cambios genéticos que podrían ser atribuidos a diferencias de la

infections<sup>(37)</sup>. In North America, strains with high transmission efficiency would be favored as the tick that transmits the pathogen typically displays a low tick burden on cattle<sup>(47)</sup>. The tick burden tends to be higher in warmer regions with episodic variation resulting in high tick burdens that may allow for transmission of low transmission efficiency strains<sup>(35,48,49)</sup>.

#### **A comparative genomics strategy to identify genes involved in transmission**

The Florida strain is a low transmission efficiency strain for which transmission has not been achieved with the following tick species: *D. andersoni*, *D. variabilis*, *R. (B.) microplus*, and *R. (B.) annulatus* under the conditions tested<sup>(25,44,46)</sup>. The defect in the Florida strain occurs at the level of the midgut: *In vitro* studies suggest a failure of the MSP1a surface protein, an adhesin, to bind to the midgut epithelial cells, while *in vivo* studies have demonstrated entry into the midgut epithelium followed by clearance without a detectable first round of replication<sup>(33,44,46)</sup>. Whether this defect represents the sole determinant of transmissibility (or transmission efficiency) is unknown. To exert a more global analysis of gene changes that could be attributed to pathogen encoded transmission differences, we undertook a comparative genomics approach reasoning that the phenotypic difference in transmissibility was underlain by a genotypic difference between the strains. The Florida strain genome was sequenced to completion<sup>(50)</sup> and whole genome comparison with the previously sequenced prototypically efficiently transmitted St. Maries strain revealed complete conservation of gene content, indicating that transmission status could not be ascribed to the simple presence or absence of one or more genes, and the genotypic difference underlying the transmission difference is due to a polymorphism between the strains. Analysis of the genetic polymorphisms revealed 9,609 single nucleotide polymorphisms (SNP's) between the two strains, and further analysis showed that approximately half of the 950 genes present in the genome had at least a single non-synonymous change. Additional strains (Puerto Rico, Virginia, and Mississippi) were subjected to high throughput sequencing methods resulting in at least 96 % genome coverage for each strain<sup>(50)</sup>. Comparisons of the

transmisión codificadas en agentes patógenos, realizamos un estudio genómico comparativo basado en el razonamiento de que la diferencia fenotípica en transmisibilidad está sustentada por una diferencia genotípica entre las cepas. El genoma de la cepa de la Florida se ha secuenciado completamente<sup>(50)</sup> y la comparación de su genoma completo con el previamente secuenciado de la cepa St. Maries prototípica de alta eficiencia en transmisión, reveló la conservación completa en el contenido de genes, lo que indica que el estado de transmisión no puede ser atribuido a la simple presencia o ausencia de uno o más genes, y la diferencia genotípica subyacente a la diferencia de transmisión se debe a un polimorfismo entre las cepas. El análisis de los polimorfismos genéticos revelaron 9,609 polimorfismos de nucleótido único (SNP's) entre las dos cepas y, un análisis posterior demostró que aproximadamente la mitad de los 950 genes presentes en el genoma tenían por lo menos una mutación no sinónima. Otras cepas (Puerto Rico, Virginia y Mississippi) fueron sometidas a métodos de secuenciación de alta capacidad con al menos 96 % la cobertura del genoma de cada cepa<sup>(50)</sup>. Las comparaciones de las secuencias del genoma de las cepas reveló que *A. marginale* tiene un perfil de SNP's moderadamente abierto, es decir, la mayoría de los SNP's son exclusivos para cada cepa. Ver ilustración en la Figura 2.

Este hallazgo proporciona dos piezas clave de información: en primer lugar, se reduce a 182 la lista de genes polimórficos candidatos que segregan con el estatus de transmisión, significa también que la secuencia específica de estos genes candidatos que quedan en cepas adicionales proporcionaría un medio para reducir la lista de genes candidatos aún más. En los trabajos en curso, estamos llevando al cabo el análisis de secuencias específicas de genes que contienen polimorfismos no sinónimos, y hasta ahora se tienen 8 genes candidatos con 42 genes aún por analizar. La mayoría de los genes en la lista de candidatos están anotados como hipotéticos, lo que no es sorprendente, ya que se sabe muy poco acerca de las vías involucradas en la transmisión de patógenos. Esto pone de relieve el poder de este enfoque genómico comparativo – que es imparcial en cuanto a la anotación de genes o de la función.

genome sequences from all strains revealed that *A. marginale* has a moderately open SNP profile, i.e. most SNPs were unique to a given strain (Figure 2). This finding provides two key pieces of information: first, it reduces the candidate list of polymorphic genes that segregate with transmission status to 182 genes, and also means that targeted sequencing of these remaining candidate genes in additional strains would afford a means of reducing the candidate list of genes even further. In ongoing work, we are conducting targeted sequence analysis of genes containing non-synonymous coding polymorphisms and thus far have 8 candidate genes with 42 genes still to analyze. Most of the genes on the candidate list are annotated as hypothetical, which is not surprising as virtually nothing is known about the pathogen pathways involved in transmission. This highlights the power of this comparative genomics approach – it is unbiased as to gene annotation or function.

The comparative genomics approach generates a candidate list of genes – however the actual proof of involvement in transmission relies on functional analysis through targeted gene replacement/knock out approaches. These techniques are in their infancy for obligate intracellular organisms such as *A. marginale*, however transformation of *A. marginale* has recently been achieved and is being developed for the functional testing of these candidate genes<sup>(51)</sup>.

### Targeted analysis of Msp1a

One shortcoming of the comparative approach is that genes that are repetitive or that contain repetitive sequences are particularly difficult to analyze.

These genes include *msp2*, an immunodominant surface protein that changes through a gene conversion mechanism<sup>(52)</sup>, and *msp1 $\alpha$* , a surface protein which bears a set of repeat sequences near the amino terminus<sup>(53)</sup>. Therefore these genes are being analyzed through targeted approaches. One study<sup>(46)</sup> implicated Msp1a as being involved in transmission. While no specific function has been determined for this protein, expression of Msp1a allows for adhesion of *Escherichia coli* to cultured tick cells<sup>(33)</sup>. When adhesion of Msp1a molecules from different strains are compared, *E. coli* expressing the Florida strain molecule have significantly less adhesion to tick cells than *E. coli* expressing Msp1a from the tick-transmissible Oklahoma strain<sup>(46)</sup>.



El enfoque de la genómica comparativa genera una lista de candidatos de genes - sin embargo, la prueba real de la participación en la transmisión se basa en el análisis funcional a través de una estrategia de sustitución/*knock out* de genes específicos. Estas técnicas están en su infancia para organismos intracelulares obligados como *A. marginale*, sin embargo la transformación de *A. marginale* se ha logrado recientemente y está siendo desarrollado para el análisis funcional de estos genes candidatos<sup>(51)</sup>.

### Análisis específico de Msp1a

Uno de los defectos del enfoque comparativo es que los genes que son repetitivos o que contienen secuencias repetitivas son particularmente difíciles de analizar. Estos genes incluyen *msp2*, una proteína de superficie inmunodominante que cambia a través de un mecanismo de conversión génica<sup>(52)</sup>, y *msp1a*, una proteína de superficie que tiene un conjunto de secuencias repetidas, cerca del extremo amino-terminal<sup>(53)</sup>. Por lo tanto, estos genes están siendo analizados por medio de enfoques específicos. Un estudio<sup>(46)</sup> ha implicado a Msp1a en la transmisión. Aunque no se ha determinado la función específica para esta proteína, la expresión de Msp1a *in vitro* permite la adhesión de *Escherichia coli* a las células cultivadas de garrapatas<sup>(33)</sup>. Cuando las moléculas de adhesión de Msp1a de diferentes cepas se comparan, *E. coli* que expresan la molécula de la cepa Florida tienen una adherencia significativamente menor a células de garrapata que las *E. coli* que expresan Msp1a cepa Oklahoma que es transmisible por garrapata<sup>(46)</sup>. Dado que la mayor diferencia entre las moléculas Msp1a reside en el número y la secuencia de repeticiones en el extremo amino terminal de la molécula<sup>(53)</sup>, se ha hipotetizado que la región de repeticiones es responsable de la presencia o falta de adhesión hacia las células, y por lo tanto del estatus de transmisión. La cepa de la Florida tiene una estructura de repetidos que codifica por una secuencia A seguida de 7 repeticiones B. Curiosamente, la cepa transmisible Virginia, codifica una A y una repetición de B, lo que sugiere que los repetidos no abrogan la capacidad de ser transmitida. Se han identificado cepas con repetidos de Msp1a idénticos que difieren en la transmisibilidad (Brayton *et al.*, resultados no

Figura 2: Distribución de SNPs en cuatro cepas comparadas contra la cepa Florida  
 Figure 2: Distribution of SNPs in four strains compared to the Florida strain.

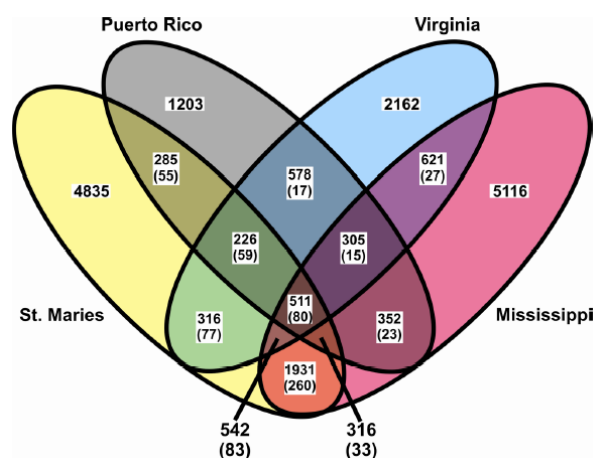


Figura reproducida de: / Figure reproduced from:  
 Dark *et al.*, 2009.180.

Números en paréntesis muestran los SNP's diferentes a los de la cepa Florida en cada cepa en el conjunto pero no son las mismas en las cepas comparadas.

Numbers in parentheses show SNPs that are different from Florida in each strain in the subset, but are not the same in the compared strains.

As the major difference between the Msp1a molecules resides in the number and sequence of repeats at the amino terminus of the molecule<sup>(53)</sup>, the repeat region was hypothesized to be responsible for the presence or lack of binding to tick cells and thus transmission status. The Florida strain repeat structure encodes one A followed by 7 B repeats. Interestingly, the transmissible Virginia strain, encodes one A and one B repeat, suggesting that the repeats themselves do not abrogate the ability to be transmitted. We have identified strains with identical Msp1a repeat structures that differ in transmissibility (Brayton *et al.*, unpublished results). This indicates that the ability to be transmitted is likely to be a multi-factorial process, with different factors being affected in the different non-transmissible strains. It could be that the Florida strain is not transmissible due to the Msp1a repeat structure of that strain, while the genetic basis for the lack of tick transmission of other

publicados). Esto indica que la capacidad de transmitirse sea muy probablemente un proceso multifactorial, con los diferentes factores afectados en las diferentes cepas no transmisibles. Podría ser que la cepa de Florida no es transmisible debido a la estructura de repetidos de Msp1a, mientras que la base genética de la falta de transmisión por garrapatas de otras cepas se encuentra dentro de otro gen.

## CONCLUSIONES

Los estudios presentados aquí son ejemplos de los conocimientos obtenidos a partir de los análisis de la transmisión de cepas con fenotipos diferentes. Los estudios utilizan diferentes métodos para separar la vía de transmisión y han demostrado que la transmisión consiste en dos etapas distintas – la entrada en la garrapata y la replicación dentro de la garrapata, dos procesos separados que estamos empezando a estudiar. Una vez en la garrapata, la transmisión es un proceso dosis-dependiente. Por último, la transmisión es un proceso multifactorial, con genes diferentes que se ven afectados en las cepas con baja eficiencia de transmisión.

## AGRADECIMIENTOS

Investigación original en el laboratorio del autor fue apoyado por el NIH, USDA-ARS, USDA-CSREES y el Wellcome Trust.

## LITERATURA CITADA

1. FAO. FAO 1994 yearbook production. Rome: Food and Agricultural Organization; 1995.
2. FAO. Ticks and tick-borne disease control: a practical field manual. Rome: Food and Agricultural Organization; 1984: iv-xi.
3. Lincoln SD. Infectious causes of hemolytic anemia: anaplasmosis. In: Large animal internal medicine. Smith BP editor. St Louis: Mosby Publishing; 1996:1214-1217.
4. Palmer GH. Anaplasma vaccines. In: Veterinary protozoan and hemoparasite vaccines. Wright IS editor. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1989:1-29.
5. National Cattlemen's Beef Association ADS: Resolution for assignment of anaplasmosis as a high priority disease for USDA research. 2000: Appendix 1.
6. Goodger WJ, Carpenter T, Riemann H. Estimation of economic loss associated with anaplasmosis in California beef cattle. JAVMA 1979;174:1333-1336.
7. USDA National Agricultural Statistics Service: Meat animals - Production, disposition and income. 1998 summary. Washington DC: Agricultural Statistics Board; 1999.
8. Cossio-Bayugar R, Rodriguez SD, Garcia-Ortiz MA, Garcia-Tapia D, Aboytes-Torres R. Bovine anaplasmosis prevalence in northern Veracruz state, Mexico. Prev Vet Med 1997;32(3-4):165-170.
9. Figueroa JV, Alvarez JA, Ramos JA, Vega CA, Buening GM. Use of multiplex polymerase chain reaction-based assay to conduct epidemiological studies on bovine hemoparasites in Mexico. Rev Elev Med Vet Pays Trop 1993;46(1-2):71-75.
10. Alderink FJ, Dietrich, R. Anaplasmosis in Texas: epidemiologic and economic data from a questionnaire survey. In: Proc Seventh Nat Anaplasmosis Conf. Hidalgo RJ, Jones EW, Starkville MS editors. Mississippi State University Press; 1981:27-44.
11. Palmer GH, Brown WC, Rurangirwa FR. Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. Microbes Infect 2000;2(2):167-176.
12. French DM, McElwain TF, McGuire TC, Palmer GH. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. Infect Immun 1998;66(3):1200-1207.
13. Kieser ST, Eriks IS, Palmer GH. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. Infect Immun 1990;58(4):1117-1119.

strains lies within another gene.

## CONCLUSIONS

The studies presented here are examples of the insights gleaned from analyses of strains with differing transmission phenotypes. The studies use different approaches to tease apart the transmission pathway and have shown that transmission involves two distinct steps – entry into the tick and replication within the tick, two separate processes that we are beginning to examine. Once in the tick, transmission is a dose dependent process. And finally, transmission is a multifactorial process, with different genes being affected in strains with low transmission efficiencies.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Original research in the author's laboratory was supported by NIH, USDA-ARS, USDA-CSREES and the Wellcome Trust.

*End of English version*



TRANSMISIÓN DE *A. marginale* POR GARRAPATAS

14. Alleman AR, Palmer GH, McGuire TC, McElwain TF, Perryman LE, Barbet AF. *Anaplasma marginale* major surface protein 3 is encoded by a polymorphic, multigene family. *Infect Immun* 1997;65(1):156-163.
15. French DM, Brown WC, Palmer GH. Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. *Infect Immun* 1999;67(11):5834-5840.
16. Eid G, French DM, Lundgren AM, Barbet AF, McElwain TF, Palmer GH. Expression of major surface protein 2 antigenic variants during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia. *Infect Immun* 1996;64(3):836-841.
17. Futse JE, Brayton KA, Nydam SD, Palmer GH. Generation of antigenic variants via gene conversion: Evidence for recombination fitness selection at the locus level in *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 2009;77(8):3181-3187.
18. Brayton KA, Meeus PF, Barbet AF, Palmer GH. Simultaneous variation of the immunodominant outer membrane proteins, MSP2 and MSP3, during *Anaplasma marginale* persistence in vivo. *Infect Immun* 2003;71(11):6627-6632.
19. Meeus PF, Brayton KA, Palmer GH, Barbet AF. Conservation of a gene conversion mechanism in two distantly related paralogues of *Anaplasma marginale*. *Mol Microbiol* 2003;47(3):633-643.
20. Brayton KA, Knowles DP, McGuire TC, Palmer GH. Efficient use of a small genome to generate antigenic diversity in tick-borne ehrlichial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(7):4130-4135.
21. Stich RW, Kocan KM, Palmer GH, Ewing SA, Hair JA, Barron SJ. Transstadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentor variabilis*. *Am J Vet Res* 1989;50(8):1377-1380.
22. Howarth JA, Roby TO. Transmission of anaplasmosis by field collections of *Dermacentor occidentalis* Marx (Acarina: Ixodidae). *Proc US Animal Health Assoc* 1972, 76:98-102.
23. Palmer GH, Rurangirwa FR, McElwain TF. Strain composition of the ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a mammalian reservoir for tick transmission. *J Clin Microbiol* 2001;39(2):631-635.
24. Peterson KJ, Raleigh RJ, Stroud RK, Goulding RL. Bovine anaplasmosis transmission studies conducted under controlled natural exposure in a *Dermacentor andersoni* = (venustus) indigenous area of eastern Oregon. *Am J Vet Res* 1977;38(3):351-354.
25. Wickwire KB, Kocan KM, Barron SJ, Ewing SA, Smith RD, Hair JA. Infectivity of three *Anaplasma marginale* isolates for *Dermacentor andersoni*. *Am J Vet Res* 1987;48(1):96-99.
26. Stiller D, Kocan KM, Edwards W, Ewing SA, Barron JA. Detection of colonies of *Anaplasma marginale* in salivary glands of three *Dermacentor* spp infected as nymphs or adults. *Am J Vet Res* 1989;50(8):1381-1385.
27. Stiller D, Coan ME, Goff W, Johnson LW, McGuire TC. The importance and putative role of *Dermacentor* spp. males in anaplasmosis epidemiology: transmission of *Anaplasma marginale* to cattle by *ad libitum* interhost transfer of *D. andersoni* males under semi-natural conditions. Eighth Nat Vet Hemoparasite Disease Conf. St. Louis MO; 1989:209.
28. Lincoln SD, Zaugg JL, Maas J. Bovine anaplasmosis: susceptibility of seronegative cows from an infected herd to experimental infection with *Anaplasma marginale*. *J Am Vet Med Assoc* 1987;190(2):171-173.
29. Futse JE, Ueti MW, Knowles DP, Jr., Palmer GH. Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: retention of vector competence in the absence of vector-pathogen interaction. *J Clin Microbiol* 2003;41(8):3829-3834.
30. Kocan KM. Development of *Anaplasma marginale* in ixodid ticks: coordinated development of a rickettsial organism and its tick host. In: Morphology, physiology, and behavioral ecology of ticks. Sauer JRaH, Chichester JA editors. UK: Ellis Horwood, Ltd.; 1986:472-505.
31. Kocan KM, Stiller D, Goff WL, Claypool PL, Edwards W, Ewing SA, McGuire TC, Hair JA, Barron SJ. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from parasitemic to susceptible cattle. *Am J Vet Res* 1992;53(4):499-507.
32. McGarey DJ, Barbet AF, Palmer GH, McGuire TC, Allred DR. Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b. *Infect Immun* 1994;62(10):4594-4601.
33. de la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Kocan KM. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. *Int J Parasitol* 2001;31(2):145-153.
34. Blouin EF, Saliki JT, de la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Kocan KM. Antibodies to *Anaplasma marginale* major surface proteins 1a and 1b inhibit infectivity for cultured tick cells. *Vet Parasitol* 2003;111(2-3):247-260.
35. Ueti MW, Knowles DP, Davitt CM, Scoles GA, Baszler TV, Palmer GH. Quantitative differences in salivary pathogen load during tick transmission underlie strain-specific variation in transmission efficiency of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 2009;77(1):70-75.
36. Ueti MW, Reagan JO, Jr., Knowles DP, Jr., Scoles GA, Shkap V, Palmer GH. Identification of midgut and salivary glands as specific and distinct barriers to efficient tick-borne transmission of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 2007;75(6):2959-2964.
37. Scoles GA, Ueti MW, Palmer GH. Variation among geographically separated populations of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) in midgut susceptibility to *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). *J Med Entomol* 2005;42(2):153-162.
38. Lohr CV, Brayton KA, Shkap V, Molad T, Barbet AF, Brown WC, Palmer GH. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 operon-associated proteins during mammalian and arthropod infection. *Infect Immun* 2002;70(11):6005-6012.
39. Futse JE, Brayton KA, Dark MJ, Knowles DP, Jr., Palmer GH. Superinfection as a driver of genomic

- diversification in antigenically variant pathogens. Proc Natl Acad Sci USA 2008;105(6):2123-2127.
40. Leverich CK, Palmer GH, Knowles DP, Jr., Brayton KA. Tick-borne transmission of two genetically distinct *Anaplasma marginale* strains following superinfection of the mammalian reservoir host. Infect Immun 2008;76(9):4066-4070.
  41. Galletti MF, Ueti MW, Knowles DP, Jr., Brayton KA, Palmer GH. Independence of *Anaplasma marginale* strains with high and low transmission efficiencies in the tick vector following simultaneous acquisition by feeding on a superinfected mammalian reservoir host. Infect Immun 2009;77(4):1459-1464.
  42. Brayton KA, Kappmeyer LS, Herndon DR, Dark MJ, Tibbals DL, Palmer GH, McGuire TC, Knowles DP, Jr. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. Proc Natl Acad Sci, USA 2005;102(3):844-849.
  43. Smith RD, Levy MG, Kuhlenschmidt MS, Adams JH, Rzechula DL, Hardt TA, Kocan KM. Isolate of *Anaplasma marginale* not transmitted by ticks. Am J Vet Res 1986;47(1):127-129.
  44. Scoles GA, Ueti MW, Noh SM, Knowles DP, Palmer GH. Conservation of transmission phenotype of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) strains among *Dermacentor* and *Rhipicephalus* ticks (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 2007;44(3):484-491.
  45. Shkap V, Kocan K, Molad T, Mazuz M, Leibovich B, Krigel Y, Michoytchenko A, Blouin E, de la Fuente J, Samish M *et al.* Experimental transmission of field *Anaplasma marginale* and the A. centrale vaccine strain by *Hyalomma excavatum*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* ticks. Vet Microbiol 2009;134(3-4):254-260.
  46. de la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, McEwen BR, Clawson D, Kocan KM. Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of *Anaplasma marginale*. Int J Parasitol 2001;31(14):1705-1714.
  47. Wilkinson PR, Lawson JE. Difference of sites of *Dermacentor andersoni* attachment of stiles to cattle in southeastern Alberta and in south central British Columbia, in relation to possible existence of genetically different strains of ticks. Can J Zool 1965;43:408-411.
  48. Brizuela CM, Ortellado CA, Sanchez TI, Osorio O, Walker AR. Formulation of integrated control of *Boophilus microplus* in Paraguay: analysis of natural infestations. Vet Parasitol 1996;63(1-316 2):95-108.
  49. Dreyer K, Fourie LJ, Kok DJ. Tick diversity, abundance and seasonal dynamics in a resource-poor urban environment in the Free State Province. Onderstepoort J Vet Res 1998;65(4):305-316.
  50. Dark MJ, Herndon DR, Kappmeyer LS, Gonzales MP, Nordeen E, Palmer GH, Knowles DP, Jr., Brayton KA: Conservation in the face of diversity: multistrain analysis of an intracellular bacterium. BMC Genomics 2009;10:16.
  51. Felsheim RF, Palmer GH, Barbet AF, Chavez ASO, Kurtti TJ, Munderloh UG. An unexpected *Anaplasma marginale* transformant. 21st Meet Am Soc Rickettsiol. Colorado Springs. 2007.
  52. Brayton KA, Palmer GH, Lundgren A, Yi J, Barbet AF. Antigenic variation of *Anaplasma marginale* msp2 occurs by combinatorial gene conversion. Mol Microbiol 2002;43(5):1151-1159.
  53. Allred DR, McGuire TC, Palmer GH, Leib SR, Harkins TM, McElwain TF, Barbet AF. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87(8):3220-3224.