

# UACM

Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

*Nada humano me es ajeno*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

---

## “CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *A. marginale* DE ANIMALES DE CAMPO CRÓNICAMENTE INFECTADOS”

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A

Q.F.B. ELIZABETH JACQUELINE CASTAÑEDA ORTIZ

DIRECTORES DE TESIS

Dra. Minerva Camacho Nuez.  
Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito.

MÉXICO, D.F.

ENERO 2008

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

#### DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

El presente proyecto de investigación se realizó gracias al apoyo académico y económico otorgado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y del proyecto de la Wellcome Trust del Dr. Guy H. Palmer de la Universidad del Estado de Washington.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 1 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Esta tesis forma parte del proyecto “Caracterización de aislados de *Anaplasma marginale* de animales de campo crónicamente infectados” el cual ha sido apoyado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM, México) y la Universidad del Estado de Washington (WSU, USA)

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, por la formación académica y el apoyo económico. A todos los profesores de la maestría.

A la Universidad del Estado de Washington, por la magnífica oportunidad que me brindaron, el apoyo económico para el desarrollo del presente proyecto.

A mis directores de Tesis y a mis asesores que dedicaron su valioso tiempo para revisar y apoyar este proyecto.

A la Dra. Minerva Camacho Nuez, mil gracias por todas sus enseñanzas, consejos, confianza y sobretodo la maravillosa amistad que me ha brindado.

Al Dr. Juan Mosqueda Gualito, gracias por sus consejos, por el tiempo dedicado y por las enseñanzas.

Al Dr. Guy H. Palmer, muchísimas gracias por la confianza y por los magníficos detalles compartidos y por hacerme sentir como en familia.

A la Dra. Elizabeth Álvarez Sanchez, gracias por el tiempo que me ha dedicado, sus consejos y su amistad.

A la Dra. Selen Zarate Guerra, muchas gracias por el tiempo dedicado a este proyecto y sus consejos.

Al Dr. Massaro gracias por todos los conocimientos que compartió conmigo y a todos los demás de la WSU por hacerme sentir como en casa.

A mis compañeros de la Maestría, por el tiempo compartido, mil gracias por la amistad, honestidad, consejos y sobretodo por ayudarme a salir adelante en este tiempo.

A mis amigos..... solo por ser.

A mis padres, y hermanos por respetar y apoyar mis decisiones.

## ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
<i>A. marginale</i>	<i>Anaplasma marginale</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
Amp.	Ampicilina
ATP	Adenosin trifosfato
ARN	Ácido ribonucléico
BAC	Cromosoma artificial de bacteria (“Bacterial artificial chromosome”)
CDSs	Secuencias codificantes (“Coding sequences”)
dNTPs	Deoxinucleótidos tripfosfatos
D.O.	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
cELISA	Enzayo inmunoenzimático competitivo
<i>g</i>	Constante gravitatoria 9.8 m/s
IDE8	Línea celular de células embrionarias de garrapata
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MSP	Proteína principal de superficie (“Major surface protein”)
nm	Nanómetros

nPCR	Reacción anidada de la polimerasa (nested PCR)
NR	No reconocido
OMP	Proteína de membrana externa
<i>opag</i>	Genes asociados al operón
ORF	Marco abierto de lectura (“Open reading frame”)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SSM	Apareamiento incorrecto por el deslizamiento de la polimerasa
TAE	Tampón tris–acetal–EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) –amino–metano
V	Volts

## ÍNDICE

Anexo.....	91
Apéndice.....	120
Bibliografía.....	113
Fig. 21 Electroferograma de la muda la muestra 1563 u.....	75
Fig. 23 Alineamiento múltiple con MEGA 3.1.....	79
I Introducción.....	3
II Justificación.....	41
III Hipótesis.....	41
IV Objetivos.....	42
4.1 Objetivo general.....	42
4.2 Objetivos particulares.....	42
IX Conclusiones.....	89
Resumen.....	1
V Rstrategía experimental.....	43
VI Metodología.....	45
VIII Discusión de resultados.....	84
X Perspectivas.....	90
Anexo.....	91
Bibliografía.....	113
Apéndice.....	118

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Eritrocitos infectados con <i>Anaplasma marginale</i> .....	3
Fig. 2 Ciclos de rickettsemia.....	5
Fig. 3 Vías de transmisión de la Anaplasmosis bovina.....	7
Fig. 4 Ciclo de vida de <i>Anaplasma marginal</i> en garrapatas.....	9
Fig. 5 Microscopía electrónica de <i>Anaplasma marginale</i> .....	10
Fig. 6 Representación del genoma de <i>A. marginale</i> .....	21
Fig. 7 Relación espacial de los genes de <i>A. marginale</i> .....	23
Fig. 8 Organización genómica de <i>msp1<math>\alpha</math></i> y <i>msp1<math>\beta</math></i> en el genoma de la cepa St. Maries.....	25
Fig. 9 Representación de la proteína MSP1a.....	30
Fig. 10 Alineamiento de repetidos.....	31
Fig. 11 Secuencia de los repetidos de <i>A.</i> .....	33
Fig. 12 Alineamiento de los repetidos de <i>Anaplasma marginale</i> .....	35
Fig. 13 Modelo de conversión de genes de <i>A. marginale</i> .....	36
Fig. 14 Integridad del ADN.....	59

Fig. 15 Amplificación por PCR de <i>msp5</i> .....	60
Fig. 16 Amplificación por nPCR del gen <i>msp5</i> .....	61
Fig. 17 Amplificación por PCR del gen <i>msp1<math>\alpha</math></i> .....	64
Fig. 18 Amplificación por nPCR del gen <i>msp1<math>\alpha</math></i> .....	65
Fig. 19 Análisis del ADN plasmídico purificado por minipreps.....	67
Fig. 20 Análisis de la restricción de los plásmidos con <i>EcoRI</i> .....	68
Fig. 21 Electroferograma de la muda la muestra 1563 U.....	75
Fig. 22 Representación esquemática de cada uno de los repetidos identificados.....	77
Fig. 23 Alineamiento múltiple con MEGA 3.1.....	79
Fig. 24 Representación gráfica del por ciento de superinfección.....	83

### ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I Factores de riesgo para la seroprevalencia de <i>Anaplasma marginale</i> .....	8
Cuadro II Características generales del genoma de <i>Anaplasma marginale</i> .....	19
Cuadro III Resultados del cELISA.....	56
Cuadro IV Resultados del cELISA.....	58
Cuadro V Comparación de los resultados obtenidos con el cELISA y por PCR.....	62
Cuadro VI Resultados de la relación ADN/proteínas.....	69
Cuadro VII Total de clonas secuenciadas.....	70

## RESUMEN

*Anaplasma marginale* es el agente causal de la Anaplasmosis bovina. Esta enfermedad se encuentra principalmente en las zonas tropicales y subtropicales y es responsable de enormes pérdidas económicas. A pesar de que esta enfermedad resulta ser endémica en México, pocos son los reportes relacionados con la presencia de este parásito a lo largo del territorio; por lo tanto se desconocen los genotipos que se encuentran distribuidos en el país. En el presente trabajo nos propusimos caracterizar aislados de *A. marginale* de animales de campo crónicamente infectados, con la finalidad de conocer los genotipos distribuidos en los ranchos estudiados así como tratar de evidenciar, por primera vez, si la superinfección se presenta en condiciones de campo. La genotipificación de cada una de las muestras se llevó a cabo mediante la amplificación del gen *msp1 $\alpha$* , el cual está constituido por repetidos en tándem localizados en el extremo 5'. Cada genotipo se caracteriza por el tipo y número de repetidos que lo constituyen. Se analizaron 166 muestras, de éstas se secuenció la región 5' del gen *msp1 $\alpha$*  de 21, en las que se identificó diversos repetidos, algunos de éstos previamente reportados otros que no lo han sido. En total se identificaron 18 genotipos diferentes, de éstos 11 ya han sido reportados en la base de datos y 7 genotipos nuevos.

Otro de los aspectos relevantes abordados en este trabajo, fue tratar de evidenciar si la superinfección se presenta en condiciones naturales, lo que podría repercutir de manera importante en la epidemiología de la Anaplasmosis y lo cual no ha sido reportado hasta el momento. En nuestro trabajo obtuvimos que más del 80% de los animales del rancho con peores condiciones sanitarias y de manejo, estaba infectado con

más de un genotipo de *A. marginale*, mientras que el otro rancho presentó un 57% de superinfección.

Estos resultados son los primeros que se reportan en México y además aportan datos importantes al debate de los últimos años de si *A. marginale* puede infectar y establecerse en un bovino ya infectado.

## I INTRODUCCIÓN

La Anaplasmosis bovina es una enfermedad que afecta a bovinos, ovinos, caprinos, búfalos y algunos rumiantes silvestres, que se encuentra distribuida en todo el mundo (Brayton y col., 2005), principalmente en zonas tropicales y subtropicales y es responsable de una morbi-letalidad alta, lo que se traduce en grandes pérdidas económicas en el sector ganadero (Palmer y col., 2000). Esta enfermedad es ocasionada por el parásito *Anaplasma marginale*, el cual se encuentra clasificado en el genogrupo II de las Ehrlichias (Kocan y col., 2003). Este patógeno infecta a los eritrocitos maduros de los animales susceptibles, ocasionándoles anemia severa y disturbios fisiológicos (Tomado de la tesis de Doctorado de Camacho., 1999; de La Fuente y col., 2001).

Sir Arnold Theiler en 1908, fue el primero en detectar, en un bovino del Sur de África, la infección de eritrocitos con *A. marginale* y los describió como un “punto” que se encontraba situado al margen del eritrocito (Fig. 1A) (Kocan y col., 2003). *A. marginale* es un parásito intraeritrocítico que sólo afecta a las células rojas del hospedero bovino, alojándose dentro de una vacuola parasitófora formada a partir de la membrana del eritrocito (Stich y col., 2004). Dentro de esta vacuola se pueden identificar de 3 a 4 cuerpos iniciales (Fig. 1B) que se dividen por fisión binaria para dar lugar a nuevos cuerpos iniciales (de ocho a diez por eritrocito) (McGarey y col., 1994; Palmer y col., 2000).

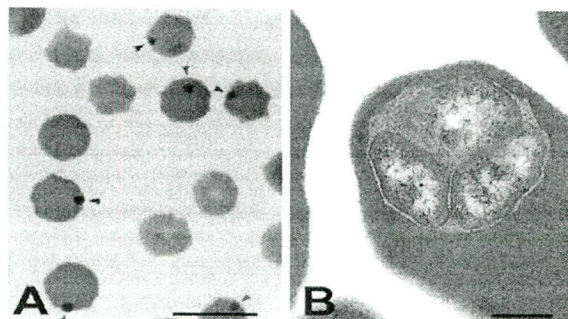


Fig. 1. Eritrocitos bovinos infectados con *A. marginale*. (A) Cuerpos de inclusión localizados en la periferia del eritrocito. (B) Micrografía electrónica de *A. marginale* que contiene tres cuerpos iniciales (Kocan y col., 2003).

## 1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA ANAPLASMOSIS BOVINA

La infección de las células hospederas ocasionadas por *A. marginale* inicia con la adhesión de la rickettsia a la membrana externa de los eritrocitos del hospedero; este proceso se encuentra mediado por la interacción de las proteínas de superficie del microorganismo con los receptores de las células blanco (García-García y col., 2004).

El período de incubación de la enfermedad varía de 7 a 60 días dependiendo del número de microorganismos que infectan al bovino (Eriks y col., 1993). A los 28 días, el número de eritrocitos infectados comienza a aumentar geométricamente y en este momento se establece la fase aguda de la enfermedad. Los eritrocitos infectados con *A. marginale* son fagocitados y destruidos por las células fagocíticas mononucleares del hospedero, lo que ocasiona anemia severa e ictericia en el animal. Los signos clínicos pueden incluir fiebre, pérdida de peso, disminución en la producción de leche, tristeza, heces pastosas, aletargamiento, también puede ocasionar aborto en vacas preñadas y en ocasiones, esta enfermedad causa la muerte del animal (McGarey y col., 1994). Durante la fase aguda de la infección, el número de microorganismos en la sangre oscilan entre  $10^7$  a  $10^9$  parásitos/ml de sangre por lo que la infección puede detectarse mediante microscopía óptica de los eritrocitos teñidos con Giemsa (Kocan y col., 2003).

Los animales capaces de recuperarse de la etapa aguda de la enfermedad; permanecerán infectados durante toda su vida, denominándose a esta etapa fase crónica o persistente. La fase crónica se caracteriza por ciclos de incremento logarítmico de la rickettsemia y una rápida disminución de la misma (Fig. 2). El número de eritrocitos infectados se incrementa gradualmente en períodos de 10 a 14 días y posteriormente se presenta un rápido decremento del número de eritrocitos infectados (Alleman y col., 1997; Palmer y col., 2000). Un eritrocito bovino tiene una vida promedio de 160 días, por lo que *A. marginale* requiere salir

del eritrocito y re infectar eritrocitos nuevos para mantener la infección, por lo tanto, la infección persistente es un proceso dinámico caracterizado por la invasión y replicación continua de *A. marginale*, así como de la evasión de la respuesta inmune del hospedero (Noh y col., 2006).

La fase crónica o persistente se caracteriza por fluctuaciones bimestrales en el número de eritrocitos infectados, entre  $10^3$  y  $10^5$  parásitos/ml de sangre, no detectables por microscopía (Alleman y col., 1997), por lo que se debe recurrir a herramientas de la biología molecular para diagnosticar la infección en el bovino como son: ELISA competitivo y/o PCR (Eriks y col., 1993).

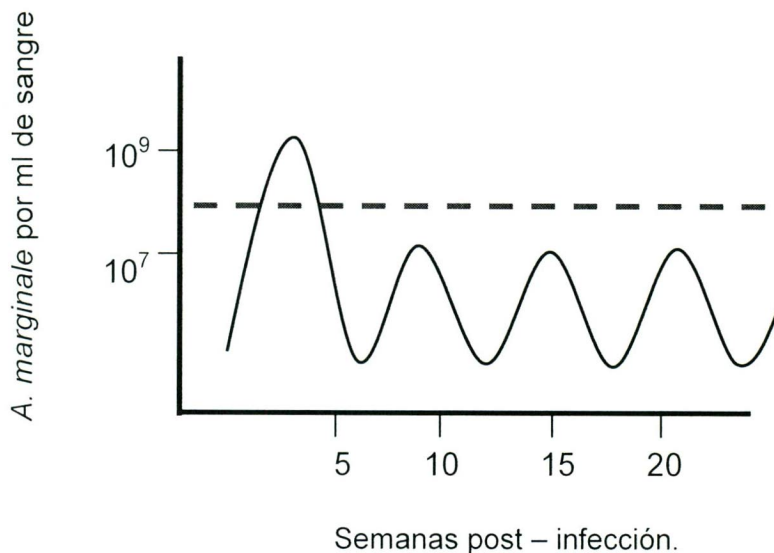


Fig. 2. Representación esquemática de los ciclos de rickettsemia ocasionados por *A. marginale* durante las fases aguda y crónica de la enfermedad. El surgimiento de variantes antigénicas, una vez establecida la infección crónica de la enfermedad ocurre, aproximadamente cada 5 semanas, y estas variantes son las que permiten que la infección se mantenga durante toda la vida del hospedero (Palmer y col., 2000).

Desde el punto de vista epidemiológico la fase crónica resulta ser de vital importancia para la persistencia de *A. marginale*, debido a que los bovinos y los vectores biológicos infectados funcionan como reservorios que permitirán que la enfermedad continúe diseminándose (Palmer y col., 2001). No obstante, los reservorios bovinos resultan ser más importantes debido a que la transmisión

transovárica de *A. marginale* en las garrapatas no ocurre, por lo que el microorganismo no se mantiene entre las generaciones de garrapatas (Brayton y col., 2005).

## 1.2 VÍAS DE TRANSMISIÓN

Existen tres vías por medio de las cuales se puede transmitir *A. marginale*:

- A. Por medio de vectores biológicos (específicamente garrapatas ixodes) (MacGuire y col., 1984). En México el género de garrapatas que se encuentra más distribuido es *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Sin embargo existen otros géneros capaces de transmitir la enfermedad en diferentes regiones del mundo como: otras especies de *Rhipicephalus* y *Dermacentor spp* entre otras (Rodríguez-Vivas y col., 2004). Aproximadamente 20 especies de garrapatas capaces de transmitir a *A. marginale* se encuentran distribuidas en todo el mundo (de La Fuente y col., 2001) (Fig. 3A).
  
- B. Por vía mecánica a través de insectos hematófagos como: moscas de establo (*Stomoxys*), tábanos, piojos y mosquitos (Hofmann-Lehmann y col., 2004). Esta forma de transmisión se considera uno de los mecanismos de mayor diseminación de *A. marginale* sobretodo en áreas de Centro y Sur de América, además de África donde la transmisión por medio de garrapatas no ha sido reportada (Kocan y col., 2003) (Fig. 3B). Un ejemplo de la importancia de este tipo de transmisión se demostró en un estudio realizado en Suiza, en el cual se reportó el brote de Anaplasmosis bovina en una región donde no se habían detectado animales infectados con *A. marginale*. El 46% de los animales analizados se identificaron positivos a la infección con *A. marginale*. La infección y muerte de los animales comenzó justo después de haber introducido al hato, un lote de bovinos. Las condiciones de manejo de los animales en este sitio permitieron que la enfermedad se

diseminara rápidamente ocasionada por la infestación de garrapatas y piojos entre los animales y por el uso de cepillos en común entre las vacas, además de que el ganado se encontraba agrupado en un espacio reducido, ayudando a la propagación del agente etiológico, tanto por la presencia del vector como por la vía mecánica (Hofmann-Lehmann y col., 2004).

- C. Por vía iatrogénica, al utilizar material quirúrgico contaminado como: agujas, sierras para el descorne, pinzas para la nariz, instrumentos para tatuar al ganado, para colocar dispositivos en las orejas y para llevar a cabo la castración (Kocan y col., 2003) (Fig. 3C).

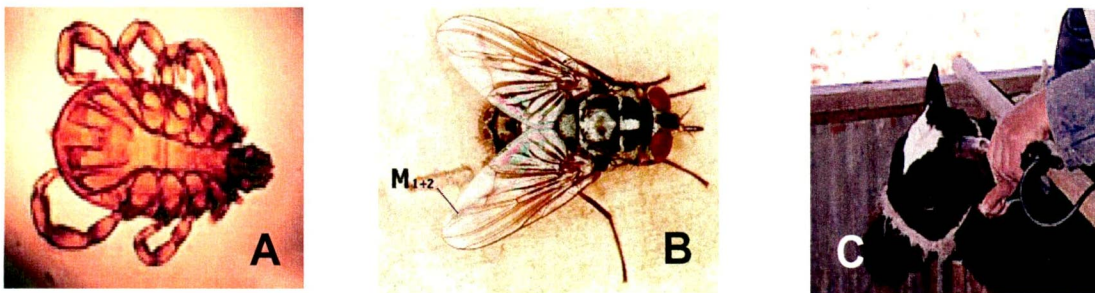


Fig. 3. Vías de transmisión de la Anaplasmosis bovina. (A) Vector biológico de *A. marginale* Garrapata. (B) Vector mecánico *Stomoxys*. (C) Material para el manejo del ganado, pinzas para el descorne, vía iatrogénica.

En el sureste de Yucatán se realizó un estudio para determinar los factores que principalmente contribuyen en la diseminación de la enfermedad. La región seleccionada se encuentra dividida en nueve municipios agroecológicos que crían el 65% del ganado para el estado. La presencia de algunos vectores de la Anaplasmosis como: *Rhipicephalus microplus*, *Stomoxys calcitrans*, *Haematobians* y *Tabanus ssp* son endémicos en esta región. El uso de acaricidas y de insecticidas para el control de las garrapatas y los insectos hematófagos es común en las granjas. El 64% de las granjas analizadas se identificaron con una seroprevalencia de la Anaplasmosis mayor o igual al 75% (Rodríguez-Vivas y col., 2004).

Siete factores de manejo diferentes del ganado se consideraron significativos para la diseminación de la enfermedad. Estos se muestran en el cuadro I.

Cuadro I. Factores de riesgo para la seroprevalencia de *Anaplasma marginale* en el ganado de México (Rodríguez Vivas y col., 2004).

Variable	Valor de <i>p</i>
Sistema de producción	0.48
Densidad del hato	0.01
Tipo de administración de acaricidas	0.10
Tipo de acaricida empleado	0.13
Introducción de ganado a la granja	0.30
Tipo de granja	0.14
Tamaño del hato	0.12
Tamaño de la granja	0.29
Control de vectores	0.71
Tipo de instrumental veterinario utilizado	0.01
Intervalo de baños acaricidas	0.01

La seroprevalencia aumenta cuando la densidad del ganado equivale a más de 1 animal/ha, considerándose éste uno de los aspectos más importantes que contribuyen a la diseminación del microorganismo en diversas regiones del mundo, incluyendo la presencia del vector (*B. microplus*, *S. calcitrans*, *H. irritans* y *Tabanus* spp) que aumenta la probabilidad de que estén en contacto con los animales susceptibles, y en consecuencia que se incremente la tasa de inoculación. El tipo de acaricidas que se utilizan en la región son principalmente los piretroides a los cuales los vectores han desarrollado resistencia. El instrumental veterinario juega un papel de suma importancia para la transmisión de *A. marginale* al ganado susceptible, el uso de las mismas jeringas para vacunar y administrar antibióticos a diferentes bovinos, influyendo en la diseminación de la enfermedad demostrando que la transmisión aumenta por la vía iatrogénica (Rodríguez Vivas y col., 2004).

### 1.3 CICLO DE VIDA DE *Anaplasma marginale* EN EL VECTOR BIOLÓGICO

El ciclo de desarrollo del microorganismo en el vector biológico es complejo y coordinado, comienza con la infección de la garrapata con la rickettsia *A. marginale* al alimentarse de un animal infectado en cualquiera de las dos fases de la enfermedad. En una primera etapa el microorganismo infecta a las células del epitelio intestinal de la garrapata y se reproduce dentro de una vacuola formada a partir de la membrana de la célula infectada (Ueti y col., 2007). Posteriormente, *A. marginale* se distribuye vía hemolinfa a otros órganos del vector, incluyendo las glándulas salivales dentro de las cuales *A. marginale* es capaz de reproducirse y ser transmitida a los vertebrados durante la alimentación (Fig. 4) (Kocan y col., 2003; Ueti y col., 2007).

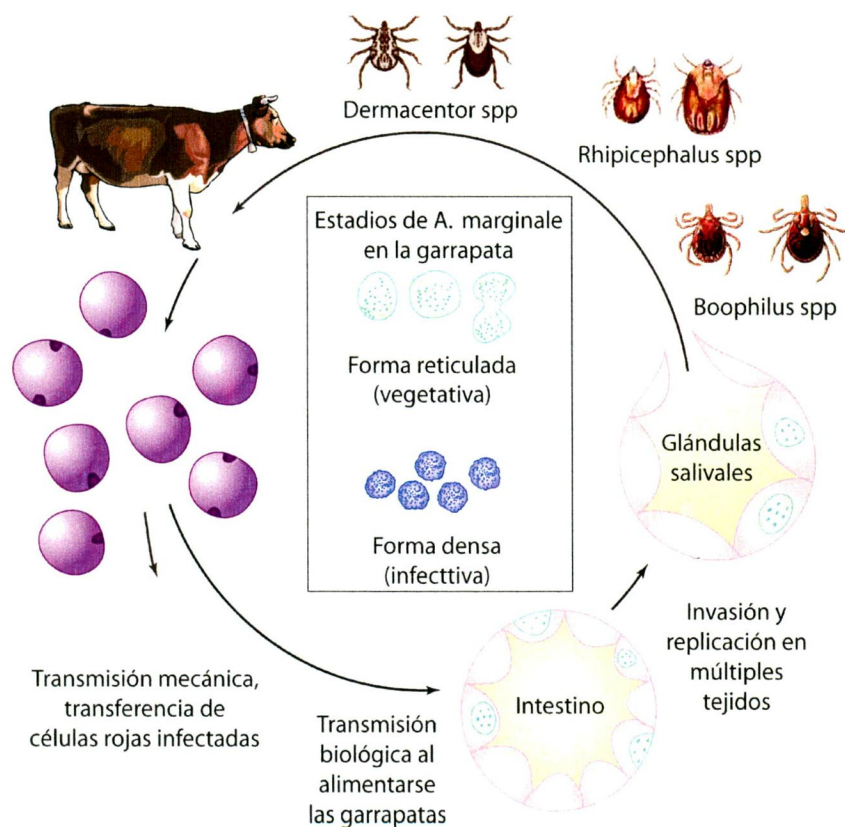


Fig. 4. Esquema del ciclo de *A. marginale* en garrapatas. Los eritrocitos que están infectados al ser ingeridos por la garrapata (*Dermacentor spp.*, *Rhipicephalus spp.*) El primer sitio de las garrapatas que se infecta es el intestino medio, se pueden encontrar dos formas de *A. marginale* en forma reticulada y en forma densa. La primera que aparece es la reticulada que se encuentra en estado vegetativo y que se divide por fisión binaria, está cambia posteriormente a forma densa, que es la forma infectiva y que puede sobrevivir extracelularmente (Fig. modificada de Kocan y col., 2003).

Los dos estadios de desarrollo de *A. marginale* dentro del vector biológico son:

1. Forma reticulada o vegetativa
2. Forma densa infectiva

La forma reticulada es la que se observa primero dentro del vector biológico; en este estadio *A. marginale* se divide por fisión binaria, formando grandes colonias que contienen cientos de microorganismos (Fig. 5A). Las colonias se condensan posteriormente dando lugar al estado denso, el cual es el estado infectivo capaz de sobrevivir fuera de las células del hospedero (Fig. 5B) (Tomado de la tesis de Doctorado de Camacho, 1999; Rurangirwa y col., 2000; Kocan y col., 2003).

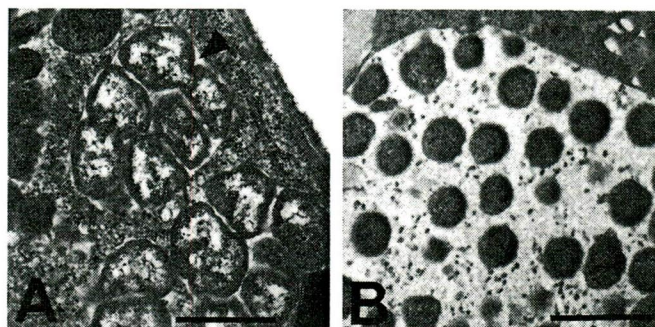


Fig. 5. Microscopía electrónica de los estadios de las colonias de *A. marginale* dentro de las células de la garrapata. (A) La forma reticulada dentro de la colonia, dividiéndose por fisión binaria. (B) Forma densa dentro de la colonia en las células de la garrapata infectada (Kocan y col., 2003).

Sin embargo, no todas las garrapatas que se encuentran en contacto con *A. marginale* adquieren la infección (Tomado de la tesis de Doctorado de Camacho, 1999) la razón se desconoce, pero se sabe que el epitelio intestinal de las garrapatas al igual que las glándulas salivales, funcionan como barreras para la transmisión de *A. marginale* (Futse y col., 2003; Ueti y col., 2007). Algunas cepas de *A. marginale* no son capaces de establecer infección en la garrapata, por lo que estas cepas no se transmiten mediante el vector biológico (Ueti y col., 2007). No obstante, falta determinar los mecanismos involucrados en la transmisión, tanto

para el proceso dependiente de las garrapatas como para el independiente (Ueti y col., 2007). Un ejemplo en específico de esto es la cepa Florida de *A. marginale* la cual no es transmitida por ninguna de las especies de garrapatas que funcionan como vectores de este parásito; esta cepa al entrar al intestino de la garrapata es incapaz de invadir y reproducirse dentro de las células del epitelio intestinal del vector biológico, en consecuencia el sistema inmune de la garrapata logra deshacerse del microorganismo (Ueti y col., 2007). Esta cepa se transmite por medio de la vía mecánica o iatrogénica. También se ha reportado que la secuencia y la conformación de los repetidos de la proteína de membrana MSP1a de este microorganismo está involucrada en la capacidad de las cepas de *A. marginale* para ser capaces de adherirse a las células de los órganos de las garrapatas (de la Fuente y col., 2003).

#### **1.4 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA ANAPLASMOSIS**

La Anaplasmosis bovina se presenta en áreas tropicales y subtropicales de todo el mundo, lo que impide la explotación del ganado en muchas regiones. La enfermedad es de carácter endémico en el Sur de América y en las Islas del Caribe (Kocan y col., 2003). En la República Mexicana se ha reportado que en la región Noreste y a lo largo del Golfo de México la Anaplasmosis bovina es de carácter endémico. En el suroeste del país se determinó que más del 50% del ganado se encuentra infectado con *A. marginale*. Por lo que, es necesario identificar la presencia del parásito en el resto del país para determinar la distribución y seroprevalencia (Rodríguez-Vivas y col., 2004).

Actualmente, en el país la enfermedad se correlaciona con la presencia del vector biológico (*R. microplus*), pero es importante recordar que esta no es la única vía de transmisión de *A. marginale* al ganado, ya que hay regiones en México en las cuales se ha erradicado al vector biológico, pero estas zonas son endémicas para la Anaplasmosis bovina, lo que resalta la importancia de las otras vías de transmisión anteriormente mencionadas.

La presencia de la Anaplasmosis bovina depende del movimiento del ganado en el país, al igual que en el resto del mundo, por lo que la distribución de la enfermedad cambia constantemente (Rodríguez y col., 2003). De acuerdo a lo reportado en 2004, el cambio climático influye en la distribución de las especies que son capaces de propagar al patógeno, y se especula que debido al calentamiento global las garrapatas estarán distribuidas más ampliamente (Hofmann-Lehmann y col., 2004).

En Europa, la Anaplasmosis bovina es común en regiones del Mediterráneo, al igual que la Babesiosis. En el sureste de Italia se han identificado 11 especies de garrapatas distribuidas en la región como: *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus turanicus*, *Haemophysalis punctata* principalmente y en menor cantidad *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes gibbosus*, *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma marginatum*, *Hyalomma deditum*, *Haemophysalis inermes*, y *Haemaphysalis sulfata*. En esta región el 93% del ganado se encuentra infectado con uno o ambos parásitos (Cringoli y col., 2002).

Estos son solamente algunos ejemplos que muestran la distribución de la enfermedad en diferentes regiones el mundo, actualmente se ha reportado que en las zonas endémicas la prevalencia de la Anaplasmosis bovina posiblemente excede el 70% del total de los animales que se producen (Futse y col., 2008).

## **1.5 IMPACTO ECONÓMICO DE LA ANAPLASMOSIS BOVINA**

Las pérdidas ocasionadas por la enfermedad se determinan por diversos parámetros: pérdida de peso de los animales, disminución en la producción de leche, abortos, gastos para tratamiento contra la enfermedad y la muerte de los bovinos. Algunos estudios han estimado que las pérdidas anuales en Estados Unidos sobrepasan los 300 millones de dólares, mientras que en Latinoamérica

las pérdidas se han calculado en aproximadamente 800 millones de dólares anuales (Kocan y col., 2003).

En México, los estudios económicos realizados al respecto estimaron pérdidas por más de 3,000 millones de pesos en el año de 1980 (Rodríguez y col., 2003). Asimismo, en el año 1995 la Anaplasmosis bovina causó el 26% de la mortalidad total registrada en bovinos de alto registro, manejados dentro del programa nacional de mejoramiento genético "Ganado mejor", esto sin incluir pérdidas no reportadas en animales fuera de estos programas gubernamentales. En el año de 2003 se reportó una pérdida de más de 130 millones de dólares (Rodríguez y col., 2003). Esta enfermedad dificulta la introducción de ganado tipo europeo al país, que beneficiaría la producción de leche y carne, debido a que son animales sensibles a la infección con *A. marginale*, la cual ocasiona la rápida muerte de éstos (Kocan y col., 2003).

## 1.6 MEDIDAS PREVENTIVAS

A pesar de las pérdidas económicas ocasionadas por la Anaplasmosis bovina, aún no existen medidas efectivas para su control (Ntando y col., 1991). Actualmente se ha intentado controlar la enfermedad mediante el uso de acaricidas y vacunación (Kocan y col., 2003). Sin embargo el uso de acaricidas, además de ser costoso, es insuficiente para controlar la Anaplasmosis, debido a que *A. marginale* también puede ser transmitida por otros insectos y material quirúrgico contaminado, como se mencionó anteriormente; por otro lado, las garrapatas pueden desarrollar resistencia a los acaricidas empleados (Rodríguez-Vivas y col., 2004; Rajput y col., 2006).

En el año 1909, Theiler describió el uso de un organismo relacionado, *A. centrale*, que resulta ser menos patógeno que *A. marginale*, como vacuna viva para disminuir la severidad de la infección establecida por éste microorganismo, describiendo que se requería el establecimiento de la infección por parte de *A.*

*centrale*, permitiendo que los animales se recuperen de la enfermedad, antes de ser expuestos al campo en donde estarían en contacto con las garrapatas infectadas con *A. marginale* (Kocan y col., 2003; Shkap y col., 2002). Sin embargo al comparar a los animales vacunados con otros que no habían sido expuestos al microorganismo se estableció que este tipo de vacunación no previene la infección con *A. marginale*, sino solo reduce la severidad de la fase aguda y la sintomatología (Shkap y col., 2002).

El método de vacunación utilizando *A. centrale* continúa en uso en naciones como Australia e Israel. No obstante este método presenta un número de inconvenientes de tipo biológico y técnico que limitan su aceptación en el resto del mundo (Kocan y col., 2003). Dentro de estas limitantes se incluyen: (a) la contaminación potencial de la sangre a partir de la cual se obtiene la vacuna con patógenos como el virus de la Leucosis Bovina, el virus de la Lengua Azul, *Theileria* o cepas heterólogas de *Anaplasma* o *Babesia*, (b) la posible contaminación con nuevos patógenos, (c) la inducción de anticuerpos contra antígenos de eritrocitos, (d) la pérdida de la infectividad, lo que puede conllevar a la no protección, (e) la variación de la virulencia, que puede provocar la muerte de los animales vacunados y (f) la dependencia de nitrógeno líquido para la conservación de la vacuna y el transporte al campo (Tomado de la tesis de Doctorado de Camacho, 1999).

Otro método de vacunación consiste en utilizar cepas atenuadas de *A. marginale*, la atenuación de las cepas se lleva a cabo mediante pases del organismo en ovejas y ciervos, o mediante la irradiación de cepas patógenas con  $^{60}\text{Co}$  (Kocan y col., 2003). Sin embargo en los animales vacunados se han observado efectos secundarios como: disminución en la producción de leche, fiebre, anorexia, ictericia y muerte, además el uso de este tipo de vacuna no es adecuado para animales mayores a 12 meses, por que puede ocasionar la enfermedad en los animales adultos (Rodríguez y col., 2003).

Otras de las vacunas son las fabricadas a partir de microorganismos muertos y muestran algunas ventajas al compararlas con los preparados vacunales derivados de *A. marginale* viva, como son: el evitar el riesgo de contaminación con agentes patógenos, su almacenamiento es menos costoso y una reducción de las reacciones secundarias en los animales vacunados. Dentro de las desventajas se encuentran que se requiere de revacunaciones anuales, el costo para purificar a *A. marginale* de los eritrocitos es alto y no se establece protección contra todos los aislados geográficos. Este tipo de preparados vacunales se retiraron del mercado debido a que se encontraron residuos de contaminantes del estroma de eritrocitos, lo que generaba una respuesta inmune contra los eritrocitos, ocasionando anemia hemolítica en los becerros que ingerían el calostro de las madres con altos títulos de anticuerpos (Kocan y col., 2003).

La prevención de la enfermedad con preparados vacunales diferentes no ha mostrado la eficacia deseada, ya que la protección que ofrecen frente a retos con cepas heterólogas es baja y requieren de cuidados excesivos para su manejo.

Una opción probada a nivel experimental es la elaboración de preparados a partir de la membrana externa de *A. marginale*, que ha mostrado ser eficiente para la prevención de la enfermedad, proporcionando protección contra cepas homólogas y cepas menos patógenas; además de reducir dramáticamente la anemia en el ganado y los picos de rickettsemia son menos elevados (Tebele y col., 1991). No obstante, existen inconvenientes para la obtención de las membranas de *A. marginale*, aunado a que este tipo de vacunas son incosteables (Brown y col., 2002).

Otra estrategia empleada, es la inmunización con proteínas recombinantes, pero hasta el momento, no proporcionan la protección necesaria contra la enfermedad (Tomado de la tesis de Doctorado de Camacho, 1999; Kocan y col., 2003; Lahmers y col., 2005). En conjunto los datos anteriores indican la importancia y necesidad de desarrollar una vacuna mediante otras alternativas, como por

ejemplo empleando los métodos de ADN recombinante, vacunas de ADN desnudo o vacunas a base de antígenos recombinantes mejorados (Palmer y McElwain, 1995).

Actualmente, la protección contra la Anaplasmosis bovina se está evaluando a nivel experimental, mediante la administración de una vacuna construida con ADN del gen *msp1 $\alpha$*  del patógeno; ésta se encuentra acoplada a secuencias que inducen la respuesta inmune del hospedero; reclutando y activando a las células dendríticas necesarias para llevar a cabo la presentación de antígenos. Una dosis única de esta construcción ha mostrado ser capaz de activar eficientemente la respuesta del animal, lo que se traduce en grandes beneficios sobre todo en lo relacionado con vacunaciones masivas y en el control de la enfermedad. A pesar de que aun falta definir que secuencias son más inmunodominantes para establecer una mejor protección contra el patógeno. Hasta el momento no se ha determinado si esta estrategia funcionará en condiciones de campo (Mwangi y col., 2007).

Uno de los principales impedimentos para el desarrollo de una vacuna en contra de este patógeno es la carencia de una línea celular para la reproducción de *A. marginale*, hasta ahora se ha desarrollado un cultivo celular para *Anaplasma* (una cepa Sudafricana) empleando células embrionarias de garrapata de la especie *Ixodes scapularis*, denominando a esta línea celular IDE8 (de la Fuente y col., 2003; Zweygarth y col., 2006), lo cuál podría representar una fuente de obtención del microorganismo, pero se debe considerar que es un proceso costoso.

## **1.7 TAXONOMÍA DE *A. marginale***

Los organismos del orden de las *Rickettsiales* fueron reclasificados basándose en las características biológicas y análisis de los genes de rARN 16S, *groES*, y los que codifican para proteínas de superficie (Palmer y col., 2000). Los miembros de

este orden son bacterias intracelulares, que contienen genomas pequeños atribuidos a una evolución reductiva y que establecen parasitismo intracelular a largo plazo (Brayton y col., 2005; Blanc y col., 2007).

Los análisis filogenéticos sustentan la formación de cuatro géneros dentro de la familia de *Anaplasmataceae*: (i) *Anaplasma*, con 96.1% de similitud, (ii) *Ehrlichias*, con un 97.7% de similitud, (iii) *Wolbachia*, con un 95.6% de similitud y (iv) *Neorickettsia*, con un 94.9% de similitud. Los organismos clasificados dentro de la familia de las *Rickettsiaceae* (género *Rickettsia* y *Orientia*) son bacterias intracelulares obligadas que crecen libremente dentro del citoplasma de células eucarióticas. Mientras que los organismos localizados en la familia de *Anaplasmataceae* también son organismos intracelulares obligados, pero se encuentran exclusivamente dentro de vacuolas membranosas en el citoplasma de las células eucarióticas. La mayoría de los organismos de la familia *Anaplasmataceae* son capaces de multiplicarse en vertebrados y en algunos invertebrados, principalmente tremátodos y garrapatas (Palmer y col., 2000).

*A. marginale* es un organismo unicelular que al infectar a los eritrocitos maduros, forma una vacuola derivada de la membrana de los eritrocitos. Dentro de ésta se van a encontrar a los microorganismos alojados. Cada organismo tiene un diámetro de 0.55 – *A. marginale*, que consisten en agregados granulares densos rodeados por una doble membrana de 40-50 nm de espesor, dentro de los cuales se contiene el material genético necesario para llevar a cabo el proceso de replicación (Tomado de la tesis de Doctorado de Camacho, 1999).

El microorganismo se reproduce por medio de fisión binaria dentro de los eritrocitos para formar de ocho a diez organismos individuales dentro de una vacuola simple, denominada vacuola parasitófora (de la Fuente y col., 2003). Esta vacuola se forma por la invaginación de la membrana eritrocítica y durante el proceso de replicación se ha observado la formación de una cola, mejor definida

como apéndice de inclusión constituida por filamentos de actina del hospedero y componentes del parásito, que posiblemente está involucrada en la interacción del patógeno con los eritrocitos del bovino durante los ciclos de replicación, invasión y egreso (Stich y col., 2004). Posteriormente, *Anaplasma marginale* sale de los eritrocitos para infectar nuevos glóbulos rojos, por un mecanismo que aún se desconoce (Tomado de la tesis de Doctorado de Camacho, 1999).

El género *Anaplasma* incluye tres especies que son capaces de infectar rumiantes: *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis*.

*A. ovis* es un patógeno que infecta a las ovejas y no es capaz de establecer infecciones en el ganado bovino. El género *Anaplasma* también incluye a la cepa *A. phagocytophilum*, éste es un agente que causa *Ehrlichiosis granulocítica* en humanos (Kocan y col., 2003).

## **1.8 CARACTERÍSTICAS GÉNICAS DE *A. marginale***

### **1.8.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GENOMA DE *A. marginale*.**

En el año de 2005 se llevó a cabo la secuenciación del genoma completo de *A. marginale*, de la cepa St. Marie, seleccionada por su virulencia y porque es transmitida por las garrapatas *D. andersoni* y *R. microplus*.

La cepa St. Maries de *A. marginale* contiene un genoma circular completo constituido por 1,197,687 pares de bases (Fig. 6), con una densidad codificante del 86%, típica en las bacterias intracelulares. El contenido de C+G es de 49.8% que resulta ser inusual para los organismos intracelulares obligados (Cuadro II); si se compara con el genoma de otras *Rickettsias* secuenciadas que generalmente tiene un promedio del 37%. En el genoma de *A. marginale* el origen de replicación no se identificó utilizando a los genes *dnaA*, *gyrA*, *gyrB*, *rpmH*, *dnaN* que generalmente se encuentran agrupados cerca de este sitio, ya que éstos se

encontraron distribuidos de diferente manera en el genoma secuenciado, por lo que el origen de replicación se designó arbitrariamente basándose en el cambio del sesgo de C+G (Brayton y col., 2005).

El genoma de *A. marginale* tiene una densidad génica de 0.79; con 949 secuencias codificantes (CDSs) de proteínas de un tamaño promedio de 1,077 pares de bases cada una. Ésto incluye la anotación de ocho secuencias sin marco de lectura abierto, las que podrían ser clasificadas como pseudogenes clásicos. El tamaño promedio de las CDSs se debe a la presencia de varias CDSs grandes de 5–10.5 kb de las cuales no existen reportes de homólogos en otras bacterias relacionadas. El genoma contiene un único operón para genes de ARN ribosomal lo que parece ser típico del orden de las *Rickettsiales*. Además existen 37 genes que codifican para ARN de transferencia para los 20 aminoácidos (Brayton y col., 2005).

Cuadro II. Características del genoma de *Anaplasma marginale* (Brayton y col., 2005).

Características generales del genoma de <i>A. marginale</i>	
Tamaño del genoma, pares de bases	1,197,687
% de G + C	49
Proteínas codificadas, %	86
Genes que codifican proteínas	949
Asignación de función	567
Asignación de familia conservada	107
Hipotéticamente conservada	126
Pseudogenes funcionales	14
Dominios de marcos de lectura abierta cortados	8
Densidad génica	0.79
Promedio de longitud de gen	1,077
ARNs ribosomales	3
ARNs de transferencia	37

El análisis de las secuencias de los genomas completos de los organismos pertenecientes a la familia de los *Rickettsiales* como: *Rickettsia prowazekki*, *R. conorii* y *Wolbachia pipientis*, han revelado que estas bacterias intracelulares

obligadas han sufrido eventos de evolución reductiva, resultando en genomas que contienen muchos pseudogenes (Brayton y col., 2005; Blanc y col., 2007). Aunque *A. marginale* tiene un genoma pequeño típico de los miembros de este orden, contiene pocas copias de pseudogenes clásicos, definidos como copias inactivas de genes funcionales. Solamente cuatro genes se identificaron con las regiones codificantes interrumpidas (*murC*, *aspS*, *mutL* y *aatA*), aunque es muy probable que éstos sean pseudogenes, fueron anotados como dominios separados, debido a que falta determinar su posible funcionalidad. Estos cuatro genes muestran un uso de codón diferente a las otras CDSs funcionales descritas (Brayton y col., 2005).

Es importante mencionar que *A. marginale* contiene genes definidos como pseudogenes funcionales los cuales son copias truncadas de genes que solamente van a ser expresados como parte de una proteína completa funcional, una vez que el pseudogen se hayan recombinado en el sitio único de expresión del gen (Brayton y col., 2005). Como es el caso de los genes *msp2* y *msp3* que generan transcritos con los extremos 3' y 5' altamente conservados, interrumpidos por una región central hipervariable caracterizada por sustituciones, inserciones y deleciones. En esta región se generan diversos arreglos de epítopes para células B, necesarios para la evasión de la respuesta inmune del hospedero (Brayton y col., 2001). Este tipo de pseudogenes funcionales también están descritos en *A. phagocytophilum*, pero no han sido descritos en otros organismos del orden de las *Rickettsias* (Brayton y col., 2005).

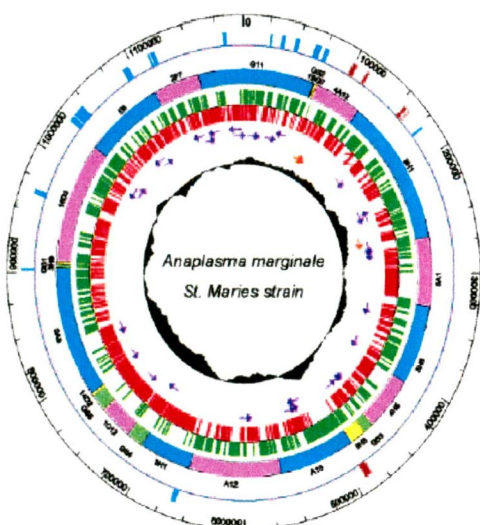


Fig. 6. Representación de el genoma de *A. marginale* cepa St. Maries.

\*El círculo interno (negro) muestra el contenido de C +G.

\*Segundo y tercer círculo muestran la posición y la orientación de los genes para ARN ribosomal (flechas anaranjadas) y de Transferencia (flechas moradas).

\*El cuarto y quinto círculo muestran la posición de las secuencias codificantes sentido (verde) y antisentido (rojo).

\*El sexto círculo muestra la posición de BACs.

\*Séptimo círculo muestra la posición de los genes codificantes para las proteínas de la superfamilia *msp2* (azul) y *msp1*(café) (Brayton y col., 2005)

### 1.8.2 PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA

Las proteínas de membrana externa OMPs, por sus siglas en inglés “Outer Membrane Proteins”, de las bacterias patógenas interactúan tanto con las células eritrocíticas así como con las del sistema inmune del hospedero. La función de cada una de estas proteínas depende de su conformación, incluyendo oligomerizaciones y de las interacciones supramoleculares con otras OMPs a través de interacciones covalentes y no covalentes. Las OMPs de *A. marginale* se encuentran asociadas a otras proteínas a través de puentes disulfuro, formando complejos de homodímeros y heterodímeros como se ha observado con las proteínas correspondientes a la superfamilia de las MSP1 (Macmillan y col., 2006).

De las 949 CDSs de proteínas identificadas en el genoma de *A. marginale*; 62 secuencias (sin incluir los pseudogenes) han sido anotadas como genes que codifican para proteínas inmunodominantes de membrana externa, esta cifra se correlaciona con el número esperado en un genoma de este tamaño (Brayton y col., 2005). Algunos de estos genes han sido clasificados en dos familias: la superfamilia de las *msp2* y la superfamilia de las *msp1* de *A. marginale* (Brayton y col., 2001).

### 1.8.3 LA SUPERFAMILIA DE *msp2*

La superfamilia de las *msp2* está conformada por 56 miembros que incluyen 16 pseudogenes. Esta superfamilia se encuentra constituida principalmente por los genes *msp2*, *msp3* y *msp4*. Las proteínas principales de superficie (por sus siglas en inglés Major Surface Proteins) MSP2, MSP3 y MSP4 residen en la membrana externa con dominios de superficie expuestos, las proteínas MSP2 y MSP3 son capaces de activar la respuesta inmune, además participan en la evasión de la respuesta inmune del hospedero debido a que generan variantes antigénicas, lo que permite a *A. marginale* establecer la fase crónica de la enfermedad (Brayton y

col., 2005). Además, hay de cinco a siete pseudogenes para *msh2* dependiendo la cepa de *A. marginale* y siete pseudogenes para *msh3* (Brayton y col., 2005).

De los pseudogenes de *msh2* y *msh3* descritos, cuatro se encuentran fuertemente ligados en un arreglo conocido como complejo de pseudogenes. Aparte de éstos, hay dos secuencias remanentes de *msh3* en el genoma, una corresponde al extremo 5' del gen *msh3*, y la otra es una secuencia muy pequeña que corresponde al extremo conservado 5' de uno de los pseudogenes de *msh3* (Brayton y col., 2005).

El gen *msh2* es transcrito como parte de un operón formado por cuatro genes, los tres genes restantes han sido denominados "genes asociados al operón" *opag1* a *opag3* y se han incluido en la superfamilia (Noh et al 2006). Los miembros del operón tienen una patrón diferencial de expresión: *opag 1* al parecer no se traduce, mientras que *opag2* y *msh2* son expresados por *A. marginale* dentro de los eritrocitos de los bovinos y dentro de las garrapatas, en el intestino medio y en las glándulas salivales y *opag3* se expresa únicamente en los eritrocitos (Brayton y col., 2005).

Dentro de la superfamilia de *msh2* están incluidos 15 genes no identificados, pero que comparten identidad con la secuencia de los miembros principales de ésta. Estos genes se designaron *omp1* a *omp15*; de los cuales, 12 se encuentran arreglados en tres grupos representando cuatro operones putativos, los tres genes restantes se encuentran por separado en el genoma (Fig. 7). Los miembros restantes de la superfamilia corresponden a genes pequeños denominados *orfX* (12 copias) y *orfY* (siete copias). Estos miembros contienen un péptido señal con identidad de secuencia a MSP3. Los *orfX* y *orfY* se han incluido en esta superfamilia por la ubicación que tienen en el genoma, ya que con frecuencia se encuentran flanqueando un pseudogen de *msh2* o de *msh3*, y son parte del sitio de expresión de *msh3* (Brayton y col., 2005; Noh y col., 2006).

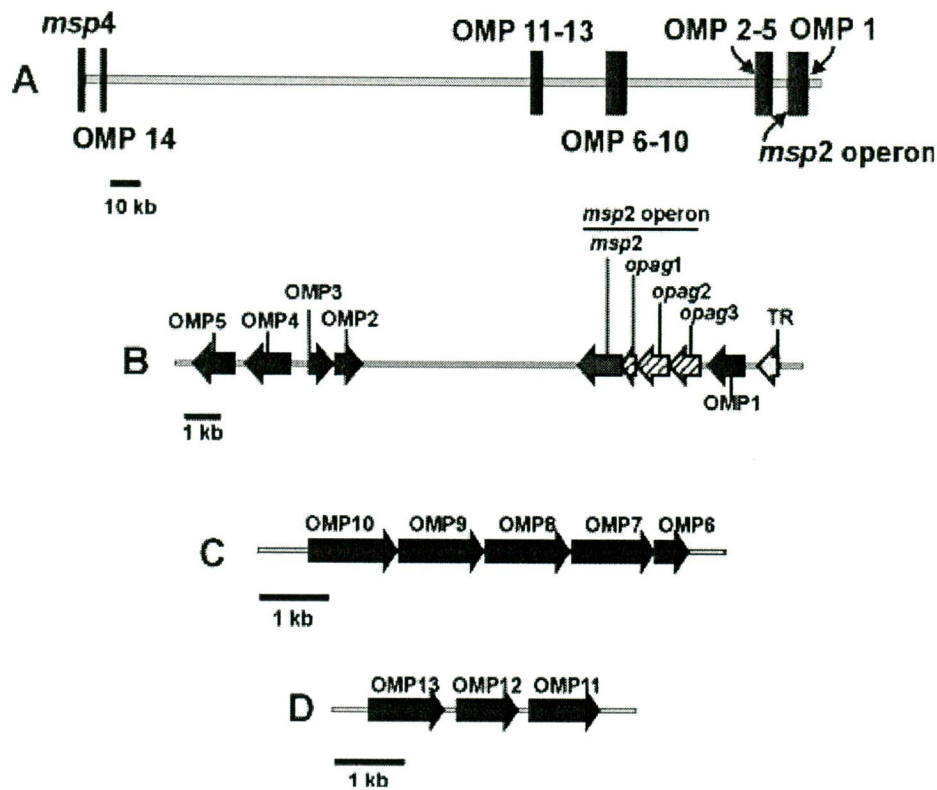


Fig. 7. (A) Relación espacial de los genes *omp1* a 14 en el cromosoma de *A. marginale*. (B) Segmento del genoma con el operón de *msp2*, *omp1* y *omp2* a *omp5*. (C) Locus con el arreglo en tándem de *omp6* a *omp10*. (D) Locus con el arreglo en tándem de *omp11* a *omp13* (Noh y col., 2006).

La proteína MSP2, es codificada por una familia multigénica y polimórfica que comprende al menos el 1% del genoma, le confiere a *A. marginale* la capacidad genética para generar variantes antigénicas por medio de recombinación de la secuencia del gen con cualquiera de los pseudogenes de *msp2* en el sitio de expresión (French y col., 1998; French y col., 1999), dando lugar a secuencias diferentes ocasionadas por mosaicos en el sitio policistrónico de expresión (Futse y col., 2005; Palmer y Brayton 2007). Éste mecanismo le permite al patógeno evadir la respuesta inmune del hospedero y mantener la infección durante toda la vida de éste, funcionando como reservorio del parásito (Barbet y col., 2000; Brayton y col., 2002; Meeus y col., 2003).

La familia multigénica de *msp3* codifica para proteínas inmunodominantes de superficie que son abundantes en la membrana de *A. marginale*. Los productos proteicos de MSP3 con diferentes pesos moleculares que varía de 90, 95 o 100 kDa dependiendo de la longitud del dominio central hipervariable de la proteína; lo que refleja múltiples variantes entre la población de *A. marginale* (MacMillan y col., 2006).

Al igual que *msp2*, el gen *msp3* presenta eventos de recombinación con pseudogenes de *msp3*, para la generación de variantes antigénicas; se ha observado que existe variación de este gen entre los aislados geográficos de *A. marginale* (Kocan y col., 2003; Brayton y col., 2005; Noh y col., 2006) .

En el genoma de diferentes aislados de este microorganismo se han identificado múltiples copias relacionadas con el gen *msp3* las cuales se encuentran distribuidas en todo el genoma, al igual que sucede con la familia multigénica de *msp2* (MacMillan y col., 2006).

El gen *msp4* codifica para una proteína de 31 kDa (MSP4), de la cual se desconoce la función que desempeña en *A. marginale*. Se encuentra flanqueado por dos pseudogenes de *msp3*: uno de 336 pb río arriba y el otro a 4,687 pb río abajo de *msp4*. Este gen *msp4* es de copia única y se localiza junto con el gen de *recA* entre dos pseudogenes de *msp3* (Brayton y col., 2005).

#### **1.8.4 LA SUPERFAMILIA DE LAS *msp1***

La superfamilia de las *msp1* se encuentra constituida por los genes *msp1 $\alpha$* , *msp1 $\beta$*  y el gen *msp5*.

MSP1 es un complejo de superficie expuesto que se encuentra constituido por las proteínas MSP1a y MSP1b que son codificadas por dos genes localizados en dos

loci del cromosoma, *msp1 $\alpha$*  y *msp1 $\beta$*  (Fig.9) (Brayton y col., 2005, MacMillan y col., 2006).

El complejo MSP1 esta involucrado en el proceso de adhesión de *A. marginale* a las células del hospedero (García-García y col., 2004).

La organización genómica de estos genes se esquematiza de la siguiente manera:

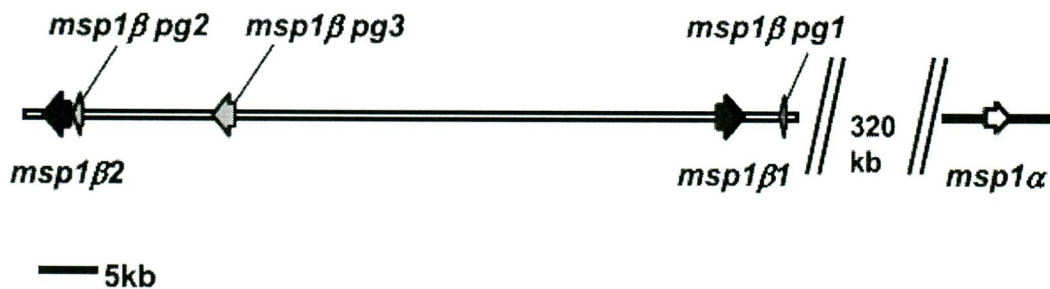


Fig. 8. Organización genómica de *msp1 $\alpha$*  y *msp1 $\beta$*  de *A. marginale* en el genoma de la cepa St. Maries. Las flechas de color blanco indican a *msp1 $\alpha$*  y las de color negro los genes completos de *msp1 $\beta$*  y en gris se representan a los genes parciales de *msp1 $\beta$  pg1*, *pg2* y *pg3* (Macmillan y col., 2006).

Las proteínas de éste complejo contienen segmentos ricos en glutamina los cuales han sido relacionados con la formación de estructuras que darán lugar a complejos multiméricos necesarios para la interacción con las células del hospedero (MacMillan y col., 2006).

La inmunización de bovinos con el complejo MSP1 ha mostrado proporcionar protección significativa contra la Anaplasmosis bovina, además de controlar los niveles de rickettsias en los animales que adquieren la infección (MacMillan y col., 2006).

El gen *msp1 $\alpha$*  es de copia única y se encuentra conservado entre las cepas de *A. marginale*, con excepción de un grupo de repetidos en tándem constituidos de 84 a 87 pb en el extremo 5' que varía tanto en número de repetidos como en la

secuencia, dependiendo la cepa del microorganismo (Brayton y col., 2005). Este gen codifica para la proteína de membrana MSP1a, de un peso molecular aparente aproximado de 105 kDa, y participa en los procesos de la infección a eritrocitos y a células de la garrapata, lo que la ha relacionado con la transmisión de *A. marginale* por la garrapata, además de contribuir en la activación del sistema inmune en la infección del ganado bovino (García-García y col., 2004, Macmillan y col., 2006).

La secuencia de cada uno de los repetidos que constituyen a *msp1 $\alpha$*  se emplean para llevar a cabo la genotipificación de aislados geográficos de *A. marginale* (Kocan y col., 2003). Cada uno de estos repetidos ha sido designados con letras, por ejemplo, en la cepa St. Maries, el gen se encuentra constituido por tres repetidos designados JBB (Kocan y col., 2003; García-García y col., 2004; Brayton y col., 2005). A pesar de no tener péptidos señal canónicos se ha determinado que la proteína se encuentra expuesta en la superficie de *A. marginale* (Brayton y col., 2005).

En el genoma de éste microorganismo también se identificaron tres secuencias codificantes localizadas río abajo de la secuencia del gen *msp1*. Los productos proteicos de estos genes han sido designados con el nombre de proteínas MSP1a-like (MLP) debido a que comparten cierta identidad con el extremo C-terminal de la proteína MSP1a. Las proteínas MLP2 y MLP4 comparten 30% y 37 % de identidad con la región C-terminal de MSP1a respectivamente; mientras que MLP3 no comparte una identidad de secuencia aparente con MSP1a; se ha predicho que estas proteínas son transmembranales (Brayton y col., 2005).

El gen *msp1 $\beta$*  está constituido por una pequeña familia multigénica de cinco genes parálogos, dos genes completos y tres genes parciales. El arreglo de los genes que constituyen a *msp1 $\beta$*  es idéntico entre las cepas de *A. marginale*; pero la secuencia de cada uno de éstos puede variar entre los aislados geográficos (MacMillan y col., 2006).

Cada uno de los genes parciales pueden funcionar como pseudogenes funcionales que pudieran estar involucrados en la generación de variantes antigénicas del producto proteico de MSP1b, mediante la conversión de segmentos del gen, como se ha reportado en otras proteínas inmunodominantes de *A. marginale*. Sin embargo estos procesos de recombinación entre y dentro de los genes de *msp1 $\beta$*  son raros (Brayton y col., 2005, MacMillan y col., 2006)

La proteína MSP1b tiene un peso molecular aparente aproximado de 100 kDa (Rodríguez y col., 2003). Todas las copias del gen *msp* son capaces de expresarse y codificar proteínas estructuralmente únicas. Mediante espectrometría de masas, se identificó que MSP1b1 contiene 4 residuos de glutamina en los primeros 10 aa, y otros cuatro residuos adicionales en los siguientes 30 aa, en el extremo de la región C-terminal, en los últimos 30 aa, se identificaron 9 residuos más de glutamina, estas regiones ricas en glutamina podrían estar involucradas en interacciones entre los complejos MSP1 y MSP3 (García-García y col., 2004 ; Brayton y col., 2006; Macmillan y col., 2006).

Los productos de los genes *msp1 $\alpha$*  y *msp1 $\beta$*  contienen dominios susceptibles a glicosilaciones, (O- y N- glicosilaciones) que podrían estar involucradas en la eficiencia del proceso de adhesión de *A. marginale* a sus células blanco (García-García y col., 2004).

El gen *msp5* es de copia única y codifica para una proteína de 19 kDa (MSP5), altamente conservada entre las cepas de *A. marginale* estudiadas, lo que sugiere que esta proteína es esencial para la vida del microorganismo, ésta se utiliza como antígeno para diagnóstico molecular como se describió por Brayton y col. en 2006 mediante ensayos de cELISA (Kocan y col., 2003).

Las proteínas que constituyen a las superfamilias MSP1 y MSP2 representan una porción importante de las proteínas presentes en la superficie de *A. marginale*. Las proteínas MSP1, MSP2 y MSP3 son moléculas inmunodominantes que son

blancos de la respuesta inmune de los hospederos. Recientemente se identificaron otras proteínas presentes en la membrana: como el sistema de secreción del tipo IV, estas proteínas están involucradas en la activación del sistema inmune del hospedero bovino (Brayton y col., 2005). Las proteínas del sistema de secreción tipo IV son necesarias para la supervivencia y la virulencia de las bacteria gram (negativas), sin embargo estas proteínas no se han explorado como candidatos para el desarrollo de vacunas. En el año de 2007 se determinó que VirB9, VirB10 y CTP son componentes de la membrana externa de *A. marginale*; que activan adecuadamente la respuesta inmune de los bovinos; y que se encuentran altamente conservadas entre los genotipos de éste microorganismo, por lo que podrían funcionar como candidatos para una vacuna en lugar de utilizar proteínas que varían constantemente como MSP2 y MSP3 (López y col., 2007).

#### **1.8.5 GENES INVOLUCRADOS EN EL METABOLISMO DE *A. marginale***

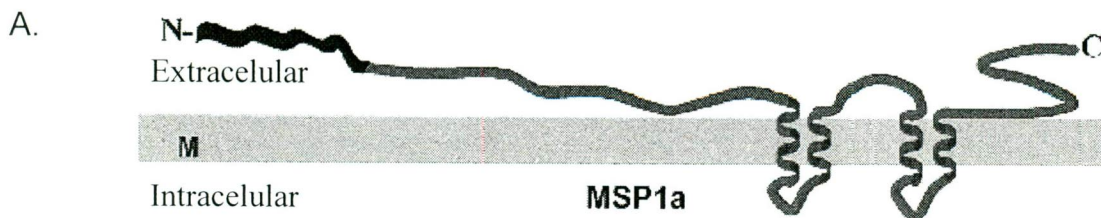
La reconstrucción de las vías metabólicas de *A. marginale* han mostrado que las enzimas necesarias para la glicosilación se encuentran presentes, pero ninguna glicoquinasa o sistema de transporte de azúcar fueron detectados, indicando que *A. marginale* utiliza la gluconeogénesis. Muy pocas genes que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis de aminoácidos fueron encontrados; no se detectaron rutas completas, y solamente se identificaron enzimas involucradas en la etapa final de la biosíntesis de ocho aminoácidos: serina, prolina, tirosina, cisteína, fenilalanina, glutamina y ácido glutámico. La respiración aeróbica de *A. marginale* se lleva a cabo mediante el ciclo de TCA para el cual se describieron conjuntos de enzimas completos. Las enzimas para la vía no-oxidativa de fosfato pentosa también están presentes, sin embargo la trans-aldolasa no pudo ser encontrada. Las enzimas necesarias para la síntesis de ácidos grasos están completas. Las rutas para la biosíntesis *de novo* de purinas y pirimidinas fueron detectadas completas (Brayton y col., 2005).

Solamente un transportador de aminoácidos se identificó en el genoma de *A. marginale* correspondiente a alanina. Lo que refleja que este microorganismo es capaz de llevar a cabo la síntesis de muy pocos aminoácidos. También varios transportadores tipo cassettes de unión al ATP fueron encontrados pero, sin función asignada y también se anotaron dos bombas de multi-resistencia a fármacos (Brayton y col., 2005).

## 1.9 ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA MSP1a

El peso molecular de la proteína MSP1a varía dependiendo del número de repetidos en tándem que la constituyen, estos repetidos difieren en longitud, de 28 a 29 aa (Palmer y col., 2000, Kocan y col., 2003, de La Fuente y col., 2007). Aislados geográficos de *A. marginale* que difieren en morfología, secuencia de aminoácidos, características antigénicas y la transmisión por garrapatas se han descrito (Ueti y col., 2006, de la Fuente y col., 2007).

MSP1a se encuentra constituida por un dominio hidrofílico, localizado en la región amino terminal, es justamente en esta zona donde se encuentran los repetidos en tándem, que caracterizan a cada una de las cepas de *A. marginale* (Fig. 9 A y B) (Palmer y col., 2000). Esta región se encuentra expuesta en la membrana del parásito; el resto de la proteína está altamente conservada entre los genotipos del microorganismo (García-García y col., 2004).



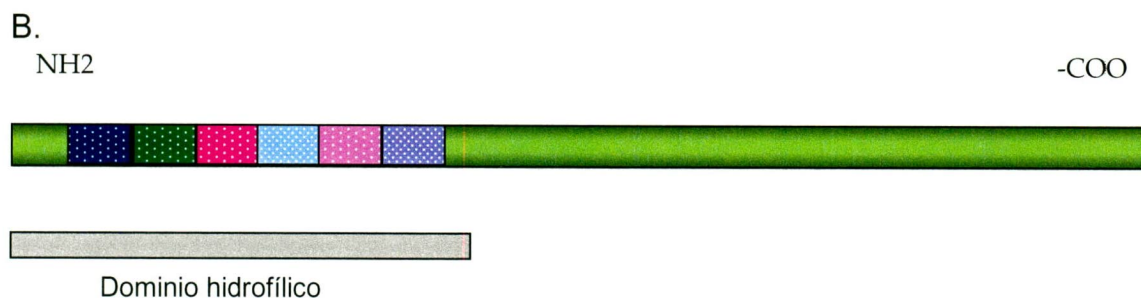


Fig. 9. Proteína MSP1a codificada por el gen *msp1α*, mostrando el dominio hidrofílico en el extremo NH<sub>2</sub>- y la localización de los repetidos en tándem empleados para la genotipificación de *A.marginale*; (B) Representación esquemática de la proteína MSP1a (en diferentes colores se representan diferentes repetidos en tándem, la combinación de repetidos darán lugar a los diversos genotipos distribuidos en el mundo (de La Fuente y col., 2001).

Los repetidos en tándem de la proteína MSP1a están involucrados en los procesos de adhesión tanto a células de la garrapata como a los eritrocitos. Particularmente esta región de repetidos contiene un alto por ciento de los aminoácidos serina y treonina (Ser/Thr), la mayoría de estos residuos están conservados entre los repetidos de MSP1a. De acuerdo a las predicciones de la estructura secundaria de estas secuencias las regiones conservadas son susceptibles a O-glicosilaciones, relacionados con la eficiencia de la adhesión e invasión a las células hospederas y se encuentran conservados en la mayoría de los genotipos de *A. marginale*. A partir de predicciones de la estructura secundaria de la proteína MSP1a se determinó que la región amino-terminal está constituida por hojas β- plegadas lo que se relaciona con la presencia del dominio hidrofílico; con respecto a la región carboxilo terminal, ésta se encuentra altamente conservada entre los genotipos, y está constituida por α-hélices (de La Fuente y col., 2001; Gracia-Gracia y col., 2003; De La Fuente y col., 2003b).

En las secuencias de los repetidos de MSP1a se ha identificado un epítipo sensible a neutralización localizado a partir del aminoácido 21 hasta el 26, representado por la secuencia Q(E)ASTSS que es reconocido por las células T CD4<sup>+</sup>. En todas las cepas de *A. marginale* este epítipo se encuentra conservado, lo que indica que este dominio desempeña funciones esenciales o proporciona ventajas selectivas al microorganismo, y se considera importante para el

desarrollo de vacunas (Fig. 10) (Allred y col., 1990; McGarey y col., 1994; Brown y col., 2002; De La Fuente y col., 2003b).

Específicamente los aminoácidos que se encuentran flanqueando el epítipo sensible a la neutralización y el aminoácido localizado en la posición 20 de cada uno de los repetidos (Fig. 10) son importantes para llevar a cabo la adhesión a las células de las garrapatas.

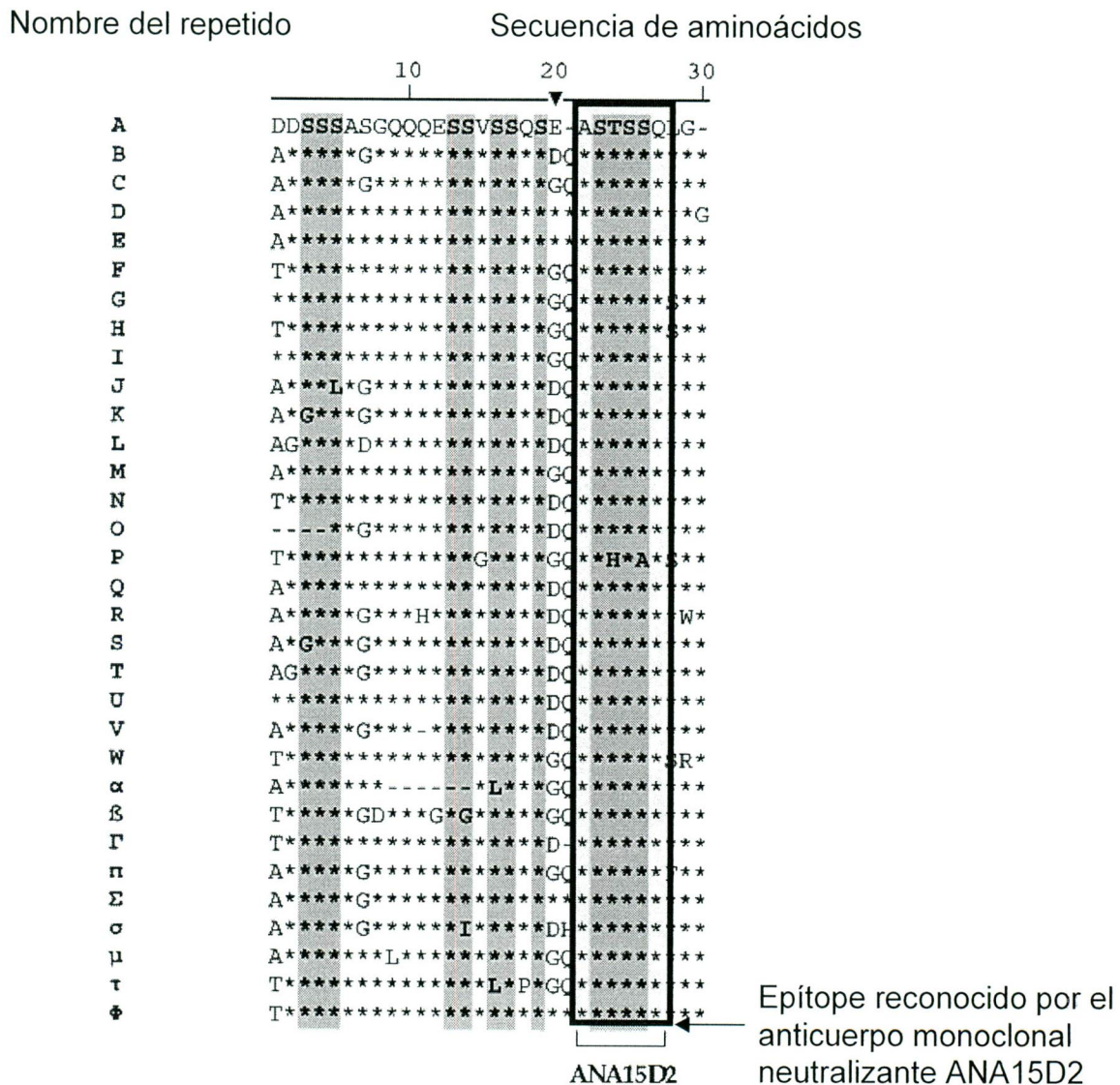


Fig. 10. Alineamiento de repetidos de diferentes genotipos en donde se muestran regiones ricas en serina y treonina conservados en los repetidos en tándem de diferentes aislados de *A. marginale*, en el aminoácido número 20 se encuentra señalada una región involucrada en la interacción con células de garrapata y se muestra la secuencia de aminoácido que representan un epítipo sensible a neutralización a partir del aa 21 hasta el 26 dentro del cuadro de color azul (Brown y col., 2002; García-García y col., 2004).

Las glicosilaciones presentes en estas proteínas posiblemente se encuentren involucradas en la capacidad del patógeno para generar variantes antigénicas que le permitirá al microorganismo evadir a la respuesta inmune del hospedero. Mientras mayor sea el número de cambios de aminoácidos en una proteína estos pueden afectar la función de ésta, sin embargo al generarse un menor cambio en la secuencia de los aminoácidos solamente se modifica el patrón de glicosilación de la proteína, generando variantes antigénicas nuevas (García-García y col., 2004).

### **1.10 HIPÓTESIS DEL ORIGEN DE LOS REPETIDOS EN TÁNDEM EN EL GEN *msp1α***

La hipótesis del origen de los repetidos en tándem de *msp1α* se basa en que estos repetidos surgen producto del apareamiento incorrecto de bases como consecuencia del deslizamiento de la polimerasa (“slipped-strain mispairing” **SSM**) que sucede durante la replicación, con el cual es común que se generen duplicaciones y deleciones de fragmentos del ADN. Éste evento ha sido sugerido para explicar la generación de secuencias repetidas en muchos organismos. SSM es particularmente relevante en patógenos intracelulares que contienen un repertorio genético pequeño, resultado de una evolución convergente reductiva para una existencia intracelular prolongada. Las secuencias de las proteínas principales de superficie (MSPs) de *A. marginale* han mostrado la existencia de motivos de secuencias repetidas, pseudogenes, duplicación de genes y variación antigénica que proporciona evidencia de la reducción del genoma y de la variación en la expresión de genes entre éstas ehrlichias intracelulares. Otros eventos como los de recombinación homóloga y la presencia de elementos móviles podrían ser además fuente de estos repetidos (Levinson y col., 1987; de La Fuente y col., 2001).

Hasta la fecha han sido reportados 79 repetidos diferentes (Fig. 11) identificados por Palmer y col. y de la Fuente y col., los que permiten clasificar a los diferentes

genotipos, estos repetidos han sido designados con letras del alfabeto, números y con el alfabeto griego. La combinación de estos repetidos y el número de repetidos que se encuentren codificados en el gen *msp1α* determinarán el genotipo de *A. marginale* (de La Fuente y col., 2007).

Nombre del repetido	Secuencia de aminoácidos	Nombre del repetido	Secuencia de aminoácidos
A	DDSSSASGQQQESSVSSQSE-ASTSSQLG--	π	A*****G*****GQ*****F***
B	A*****G*****DQ*****	Σ	A*****G*****
C	A*****G*****GQ*****	σ	A*****G*****I*****DH*****
D	A*****G*****	μ	A*****L*****GQ*****
E	A*****	τ	T*****L*P*GQ*****
F	T*****GQ*****	Φ	T*****
G	*****GQ*****G***	1	SG*****L**GGQ*****
H	T*****GQ*****G***	2	T*****P**GQ*****
I	*****GQ*****	3	A*****L**GQ*****
J	A**L*G*****DQ*****	4	T*****L**GQ*****
K	A*G**G*****DQ*****	5	A*****D*****
L	AG**D*****DQ*****	6	A*****H*****
M	A*****GQ*****	7	T*****H*****
III	A*****GQ*****S**	8	A*G**GD*****G*****S***
N	T*****DQ*****	9	A*****D*****S***
O	---*G*****DQ*****	10	A*****L*P*GQ*****
P	T*****G**GQ**H*A*S**	11	A*****L*P*GQ*****VG
Q	A*****DQ*****	12	AG*****L**DQ*****
R	A****G**H*****DQ*****W**	13	T*****L**DQ*****
T	AG**G*****DQ*****	14	T*****L**G*****
U	*****DQ*****	15	A*****G*L**GQ*****
V	A****G**-******DQ*****	16	A*****GD**G*****GQ*****
W	T*****GQ*****SR**	17	T*****G*****GQ*****
α	A*****-L**GQ*****	18	T*****L**DQ*****S***
β	T*****GD**G*G**GQ*****	19	A*****GDR**G*L**GQ*****
Γ	T*****D*****	20	A*****GD*****G*L**GQ*****
		21	A*****GD*****L**GQ*****
		22	A*****L*P*GQ*****S**
		23	T*****K**L**SQ*****
		24	A*****GN*****L*P**GQ*****S**
25	A*****L**SQ*****		
26	A*****GN*****L*P**GQ*****		
27	A*****L**DQ*****		
28	AG**E*****L**GQ*****		
29	T*****D*****GQ*****		
30	A*****K**L**SQ*****		
31	A*****GN*****D*****		
32	T*****G*****GQ*****		
33	A*****L*K*GQ*G*****		
34	AN*****L**DQ*****		
35	T*****GQ*G*****S***		
36	A*****P*****		
37	T*****L**GQ*****S***		
38	A*****L**GQ*****S***		
39	*****L**DQ*****		
40	AG**GD*****DQ*****		
41	AS*****L**DQ*****		
42	T*****L*P**GQ*****S***		
43	A*****L*P**GQ*****S***		
44	T*****A*****GQ*****S***		
45	T*****L*P**DQ*****		
46	T*****L*P**GQ*****		
47	A*****GD*****DQ*****		

Fig. 11. Secuencia de los 79 repetidos en tándem identificados que constituyen a la proteína MSP1a pertenecientes a aislados geográficos de *A. marginale* (los asterisco muestran aa idénticos y los guiones representan inserciones o deleciones) (de La Fuente y col., 2007).

## 1.11 GENERACIÓN DE LAS VARIANTES ANTIGÉNICAS

En el ganado infectado con *A. marginale* se expresan de 3 a 6 variantes de MSP2 en cada ciclo secuencial de rickettsemia, las cuales surgen cada 4–8 semanas durante la infección persistente. A lo largo de 7 años de infección, *A. marginale* habrá expresado aproximadamente 500 variantes diferentes (Barbet y col., 2000; Futse y col., 2005; Palmer y Brayton, 2007).

El surgimiento de variantes antigénicas se identificó desde el año de 1998, mediante la comparación de las secuencias de aminoácidos de MSP2 expresados a lo largo del establecimiento de la fase aguda y de la fase crónica de la enfermedad (French y col., 1998; French y col., 1999; Barbet y col., 2000; Brayton y col., 2002). Este no es el único gen involucrado en la generación de variantes antigénicas del parásito, el gen *msp3* presenta un patrón similar al expresado por *msp2* para evadir la respuesta inmune (Meeus y col., 2003).

Un organismo con un genoma pequeño como *A. marginale*, es capaz de expresar una cantidad enorme de variantes antigénicas, para explicar como es que este evento sucede se ha descrito el mecanismo de conversión génica. Es importante mencionar que los extremos 5' y 3' de los genes y de los pseudogenes de *msp2* y *msp3*, son altamente conservados, y se encuentran flanqueando una región hipervariable de cada una de estas secuencias génicas (Fig. 12) (French y col., 1999; Meeus y col., 2003).

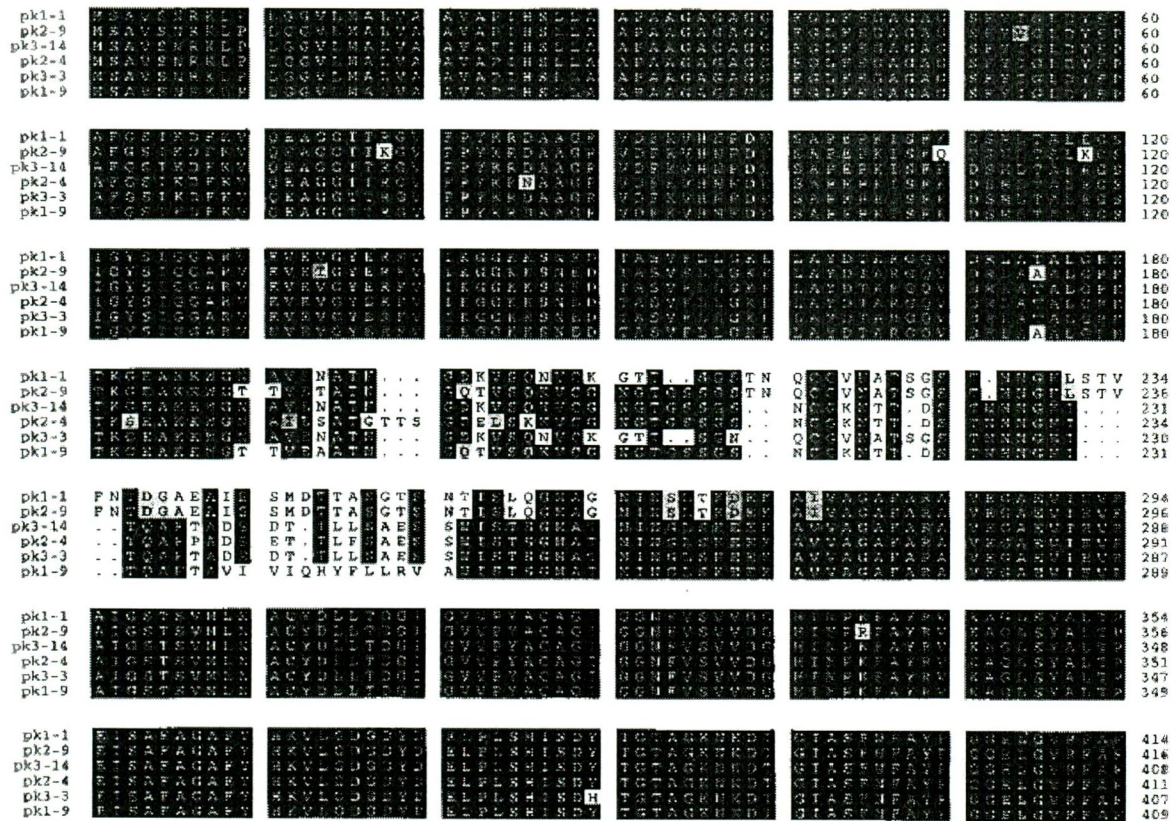


Fig. 12. Alineamiento de la secuencia completa de aminoácidos de la proteína MSP2 de clones de *A. marginale* durante los ciclos de ricketsemia (pk1, pk2 y pk3) expresados durante la fase persistente, seguido del número de identificación de cada una de las clonas moleculares. Indicando en color blanco las regiones en donde se detectan inserciones, deleciones y sustituciones, en negro las regiones conservadas y en gris sustituciones de aminoácidos conservados (French y col., 1999).

La complejidad de las variantes de MSP2 y MSP3, se define como el número de cambios en los segmentos de la región hipervariable derivados de los diferentes pseudogenes, que se irán incrementando a lo largo de la infección. El evento de la recombinación de las regiones hipervariables de los pseudogenes se ve favorecido por las regiones idénticas que flanquean el sitio único de expresión (Futse y col., 2005).

El modelo propuesto para la generación de las variantes antigénicas requiere la identificación de las regiones conservadas de los extremos 5' y 3' de *mSP2* y sus pseudogenes para que se lleve a cabo el proceso de recombinación entre la región hipervariable del gen y los pseudogenes, de igual manera este mecanismo

también ha sido descrito para el gen de *msp3* y la interacción entre los pseudogenes de esta familia (Meuus y col., 2003; Palmer y col., 2007).

Conforme la infección avanza, *A. marginale* tiene que permanecer dentro de su hospedero, por lo que comienza a recombinar segmentos de las regiones hipervariables para dar lugar a mosaicos compuestos por secuencias de dos o más pseudogenes que estarán donando lugar a estos fragmentos, lo que permite que se genere un repertorio enorme de variantes antigénicas (Fig. 13) (Palmer y col., 2007). El modelo de generación de las variantes antigénicas de *msp3* es idéntico al descrito para el gen *msp2* (Brayton y col., 2001).

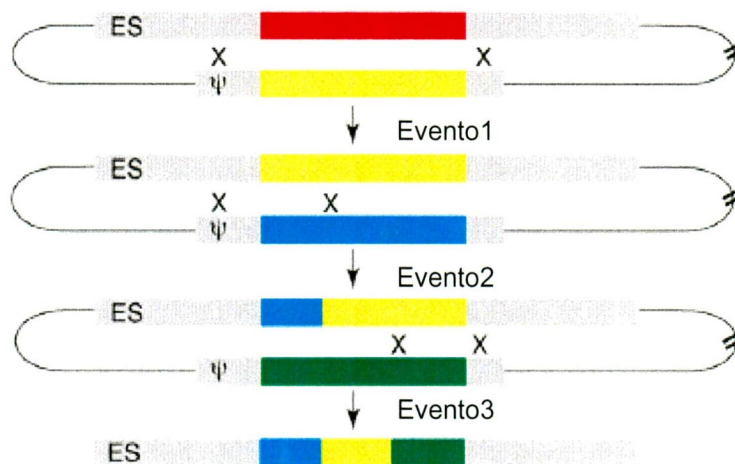


Fig. 13. Modelo de conversión de genes de *A. marginale*. Recombinación de la región hipervariable (amarillo) de un pseudogen con la secuencia dentro de un sitio único de expresión cromosomal, flanqueado por regiones intragénicas conservadas. (Evento 1) Recombinación dentro de esta región con un segundo pseudogen en el que solamente se intercambia una fracción de éste (evento 2 y 3) (Palmer y col., 2007).

Las variantes antigénicas comienzan a expresarse al establecerse la infección temprana en la que suceden eventos de recombinación simple, en los cuales solamente un segmento es recombinado. Conforme la infección avanza y la respuesta inmune del hospedero controla los niveles elevados de la bacteremia, la complejidad de los “mosaicos” del gen, ocasionados por los múltiples eventos de

recombinación, se va incrementando. Esto con la finalidad de que se expresen proteínas capaces de evadir la respuesta inmune y mantener la infección persistente en el hospedero (Palmer y col., 2007).

El evento de la generación de variantes antigénicas se ha relacionado con la presión que ejerce el sistema inmune del hospedero a *A. marginale*. Aunque falta determinar cuales son los factores que realmente están influyendo dentro de las garrapatas y de los eritrocitos para que el parásito las exprese (de la Fuente y col., 2001).

### **1.12 EVENTO DE SUPERINFECCIÓN.**

El fenómeno de la superinfección es un evento en el cual más de una cepa de *A. marginale* se encuentran estableciendo la infección en el bovino, es decir se pueden identificar genotipos diferentes del parásito dentro de un animal. De acuerdo a lo reportado por José de la Fuente, en el año 2002, este tipo de acontecimientos no se puede establecer entre los bovinos. Ésto se sustentó al intentar establecer una superinfección en de dos bovinos y células de garrapata, con dos cepas diferentes de *Anaplasma marginale*, la cepa de Virginia y cepa de Oklahoma. Sin embargo solamente consiguió infectar con una sola cepa al animal expuesto a estos microorganismos (de la Fuente y col., 2003a).

Basándose en estos resultados, el grupo de investigación argumenta que la superinfección es un evento que no se puede establecer, pues al haber sido adquirido un genotipo de *A. marginale* en una primera infección, ésta proporciona protección inmunológica cruzada, (desconocida hasta el momento) evitando así la posibilidad de que un genotipo diferente establezca una segunda infección, este tipo de “protección” sugerida se encuentra sustentada en lo observado y descrito en algunos virus (de la Fuente y col., 2003a).

Sin embargo, de acuerdo a lo reportado por Palmer y col., en el año 2004, en un estudio realizado en un hato de bovinos (n=261) se identificaron cinco animales que se encontraban infectados con dos genotipos de *A. marginale* completamente diferentes, indicando que patógeno es capaz de establecer una superinfección siempre y cuando sean cepas diferentes, como se ha reportado entre *A. marginale* y *A. centrale*. (Palmer y col., 2004).

En una investigación relacionada con el repertorio de pseudogenes de *msp2* en diferentes cepas de *A. marginale* y su capacidad para establecer la superinfección. Se seleccionaron cinco cepas con las siguientes características: dos cepas con genotipo igual denominado 5B, una con genotipo relacionada a 5B denominada 6B y dos cepas con genotipos no relacionados con las anteriores, identificados como: EMØ y 6DE respectivamente. Cada una de estas cepas fue analizada para determinar los repertorios de los pseudogenes correspondientes a *msp2*, basándose en las características de secuencias de éstos (extremos 5' y 3' conservados flanqueando una región hipervariable) (Palmer y col., 2004).

Entre las cinco cepas analizadas se identificaron catorce pseudogenes diferentes, además la cepa del genotipo EMØ contenía un repertorio de pseudogenes completamente diferentes a los identificados en las cuatro cepas restantes. Esta observación puede explicar la superinfección, pues, un animal que se encuentra infectado con una cepa de *A. marginale*, que ha ocasionado que el hospedero establezca una respuesta inmune contra las variantes de MSP2 correspondientes a ese genotipo, al estar en contacto con una segunda cepa que contiene un repertorio de pseudogenes completamente diferentes, infecta al mismo animal, la respuesta inmune no será capaz de controlarlo debido a que no hay una respuesta previa establecida contra las proteínas que se están expresando en el segundo genotipo y se establecerá una superinfección (Rodríguez y col., 2005).

Un patógeno puede ingresar a un hospedero y establecer una infección siempre y cuando éste sea capaz de evadir la respuesta inmune del animal, incluso si existe

una respuesta inmune generada contra una cepa del mismo género, tal y como se ha reportado con el virus de la influenza, que genera cepas antigénicas distintas que le permite establecerse entre la población a pesar de que exista una respuesta inmune establecida contra una o más cepas previas. (Futse y col., 2008)

Este fenómeno es común entre patógenos complejos responsables de infecciones persistentes en zonas endémicas lo que les permite continuar la transmisión del patógeno entre la población susceptible. En el caso de *A. marginale* esto es posible gracias a la diversidad alélica del gen *msp2* que codifica variantes antigénicas, las variantes alélicas están ligadas a la capacidad del microorganismo para infectar y mantenerse durante toda la vida del hospedero. Con la simple existencia de un alelo que difiera entre la población de cepas de *A. marginale* este microorganismo podrá establecer una superinfección en un hospedero que tenga una infección persistente. (Futse y col., 2008)

Es importante mencionar que actualmente se desconoce que genotipos de *A. marginale* se encuentran distribuidos en nuestro país, solamente existe el reporte de unos cuatro genotipos identificados en la República Mexicana, (de la Fuente y col., 2007); y se desconoce la distribución concreta de la Anaplasmosis en el territorio mexicano, solamente se han realizado aproximaciones de seroprevalencia al comparar resultados de investigaciones realizadas en unas cuantas regiones del territorio, por lo que es importante determinar la presencia de esta enfermedad en otras regiones del país (Rodríguez-Vivas y col., 2004).

Además, es necesario determinar el comportamiento de *A. marginale* en condiciones de campo debido a que la mayoría de las investigaciones relacionadas con éste microorganismos se han llevado a cabo con condiciones controladas a nivel experimental, de ahí la importancia de determinar el comportamiento de *A. marginale* y conocer si las superinfecciones son capaces de establecerse en condiciones naturales. La información obtenida de esta

investigación nos permitirá conocer un poco más de la epidemiología de *A. marginale* en estas condiciones.

## II JUSTIFICACIÓN

La Anaplasmosis bovina es una enfermedad de gran importancia económica en zonas tropicales y subtropicales; a pesar de que se encuentra distribuida en todo el mundo no existen medidas para su control. Hasta el momento no existe reporte de estudios moleculares relacionados con *Anaplasma marginale* en condiciones naturales, por lo que, se desconoce la dinámica de la infección en el campo a través del tiempo. Ésto es necesario para llevar a cabo el desarrollo de una vacuna adecuada contra la enfermedad.

## III HIPÓTESIS

Los bovinos infectados persistentemente con *Anaplasma marginale*, en condiciones de campo, mostrarán una gran diversidad de genotipos y la superinfección se verá favorecida por las condiciones sanitarias y de manejo.

## IV OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar genéticamente aislados de *Anaplasma marginale* de animales de campo crónicamente infectados.

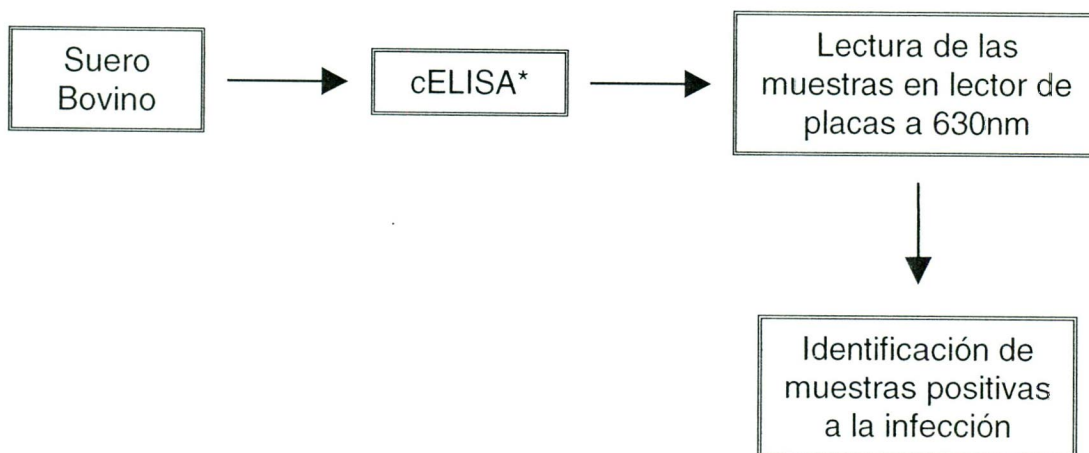
### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar *A. marginale* en muestras de ganado bovino infectadas, en dos épocas diferentes del año.
- Genotipificación de aislados de *A. marginale* de animales de campo.
- Identificar si la superinfección es un evento que puede presentarse en muestras de campo.

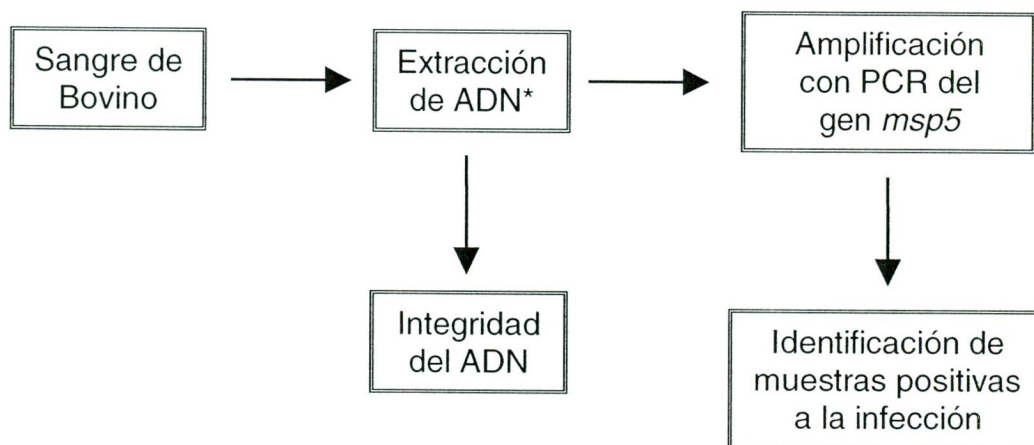
## V ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### Identificación de muestras positivas a la infección con *A. marginale*.

#### A. Diagnóstico serológico

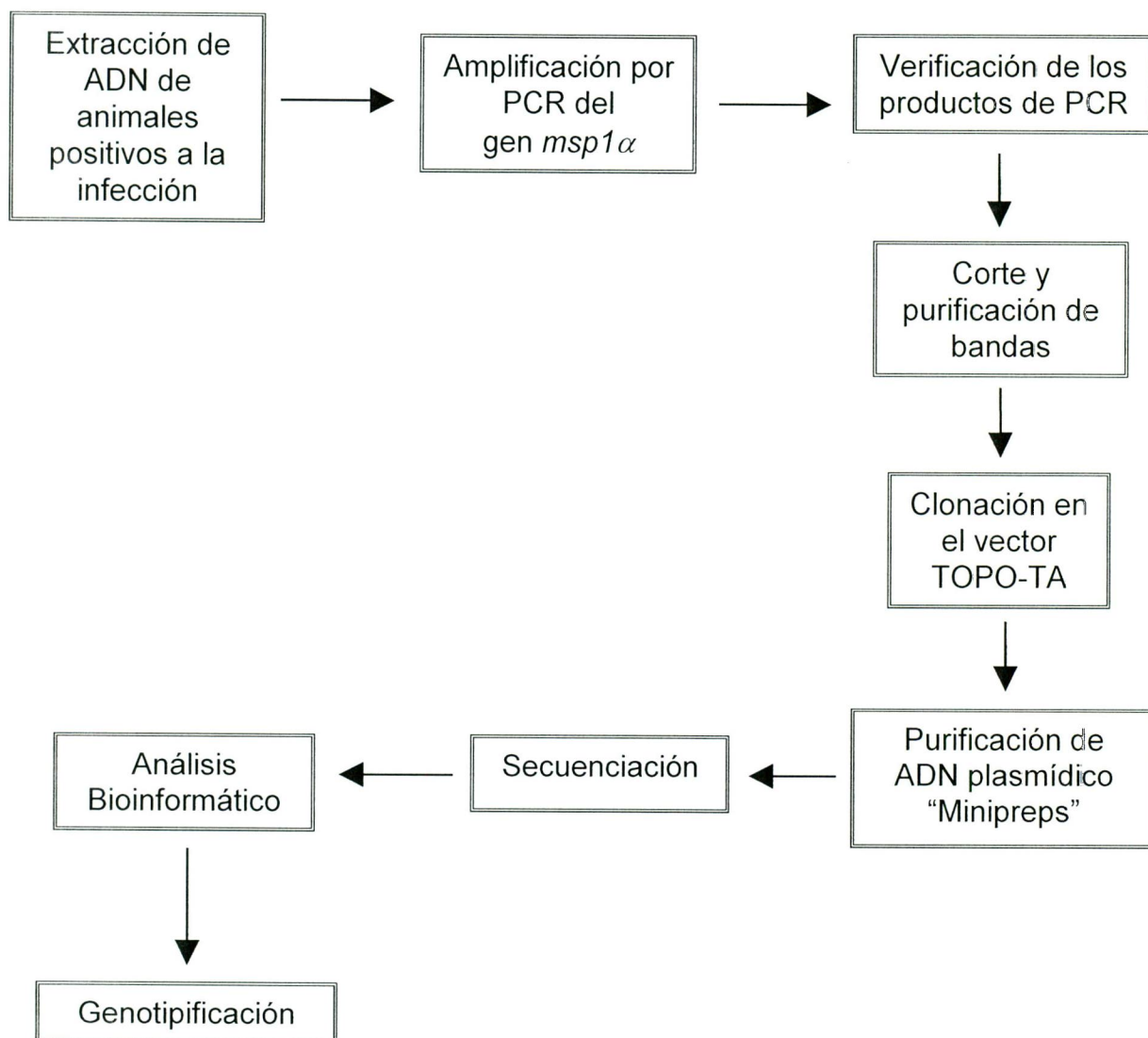


#### B. Diagnóstico por PCR



\* Mediante el uso de Kits comerciales.

## Genotipificación de aislados de *A. marginale* de animales de campo.



## VI METODOLOGÍA

### 66.1 Obtención de las muestras

Las muestras fueron obtenidas durante el año de 2006 en dos muestreos realizados en el mes de Mayo y Noviembre respectivamente, provenientes de dos ranchos: El rancho “La Joya” ubicado en Tapalpa, Jalisco (en la falda sur de la Sierra Madre Occidental) con un clima trópico seco o templado, es un rancho particular en el cuál se proporcionan baños acaricidas y fumigaciones aproximadamente cada 15 días como práctica de manejo para la eliminación de garrapatas e insectos hematófagos, el rancho “El Verdineño” localizado en el municipio de Ixcuintla en el estado de Nayarit, caracterizado por un clima trópico seco; este rancho pertenece al INIFAP como centro de investigación, en el cual no se proporciona ningún tipo de control de vectores.

El presente estudio se realizó con 166 muestras de suero y sangre bovina, de estas muestras se analizaron 82 del rancho “El Verdineño” y 84 de “La Joya”.

### 6.2 Identificación de la infección con *A. marginale*.

Las muestras de suero, fueron analizadas por medio del ensayo cELISA mediante el kit comercial Anaplasma Antibody test, cELISA (VMRD, Inc.) el cual nos permitió identificar si las muestras analizadas se encontraban infectadas con *A. marginale*. El principio del ensayo se basó en el reconocimiento de la proteína recombinante MSP5; que se encontraba inmovilizada en placas de 96 pozos, por anticuerpos específicos presentes en el suero del bovino.

Se adicionó 70 µl de suero bovino sin diluir y los controles (positivo y negativo, proporcionados por el proveedor) a cada uno de los pozos de la placa de absorción. Las muestras se dejaron incubar durante 30 min a temperatura ambiente (21–25°C). Una vez transcurrido el tiempo, se traspasaron 50 µl de las

muestras previamente incubadas a las placas de 96 pozos que contenían inmovilizada a la proteína MSP5 recombinante y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente (21–25°C). Posteriormente se lavó la placa dos veces con la solución de lavado proporcionada en el kit, eliminando la solución mediante inversión y dando unos golpecitos sobre papel absorbente para eliminarla. Posteriormente se adicionó 50 µl de anticuerpo conjugado a peroxidasa (proporcionado por el proveedor) a cada uno de los pozos, verificamos que éste se encontrará al fondo de los pozos de la placa. Se incubaron las muestras durante 20 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se llevó a cabo el lavado de los pozos, cuatro veces con la solución de lavado y ésta se eliminó por completo, retirando el exceso al colocar la placa sobre un papel absorbente, finalmente, se adicionó 50 µl de solución sustrato, cerciorándonos que la muestra se encontrara al fondo del pozo, se dejó incubar durante 20 min, a temperatura ambiente (protegiendo de la luz) inmediatamente después de transcurrir el tiempo de incubación, se adicionó 50 µl de la solución que detiene la reacción, en cada pozo, se agitó cuidadosamente la placa mediante unos ligeros golpecitos, y se procedió a la lectura de la placa.

Las muestras se analizaron en un lector de placas de ELISA de la marca Bio-Tek FCC-Compliance modelo ELX800 a 630nm para determinar que muestras eran positivas a la infección.

Se identificó que muestras eran positivas o negativas a la Anaplasmosis bovina, determinando el % de Inhibición de cada una de las muestras analizadas, con la siguiente formula:

$$\%I = 100 - [ ( O.D. \text{ Muestra} \times 100) / ( \text{Promedio de la O.D del Control Negativo}) ]$$

Sí el por ciento de inhibición es < 30%, la muestra se considera negativa a la infección.

Sí el por ciento de inhibición es infección.

### 6.3 Extracción de ADN

El ADN de *A. marginale* se extrajo a partir de sangre bovina de cada una de las muestras, mediante el uso del kit comercial Puregene para purificación de ADN genómico (Gentra Systems). A 300  $\mu$ l de solución de lisis de células rojas se adicionó 100  $\mu$ l de sangre bovina. La muestra se incubó durante 5 min a temperatura ambiente (21–25°C), posteriormente se centrifugó a 10,000 x g durante 1 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla obtenida utilizando vórtex y se añadió 450  $\mu$ l de solución de lisis celular. Las muestras se trataron con 1.5  $\mu$ l de RNasa A se incubó a 37°C durante 15 min, transcurrido el tiempo se permitió que las muestras se encontraran a temperatura ambiente para adicionar 50  $\mu$ l de proteinasa K [20 mg/ml] y 1  $\mu$ l de glicógeno (Invitrogen), se incubó durante toda la noche a 65°C, transcurrido el tiempo de incubación se adicionó 300  $\mu$ l de solución para precipitar proteínas y se centrifugó a 10,000 x g durante 1 min, para eliminar las proteínas de la muestra. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo limpio que contenía 750  $\mu$ l de isopropanol al 100% (volúmenes iguales a los de la muestra), se centrifugó una vez más a 10,000 x g durante 1 min y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente la pastilla obtenida se lavó con etanol al 70% (preparado en ese momento) y se centrifugó nuevamente a 10,000 x g, se eliminó el sobrenadante cuidando la pastilla. Se dejaron secar las muestras durante un período de 10–15 minutos, y se resuspendió la pastilla obtenida en 100  $\mu$ l de solución hidratante de ADN (10 mM Tris, 1mM EDTA con pH de 7.0–8.0). Se hidrató durante toda la noche a temperatura ambiente y posteriormente se almacenó a -20° C.

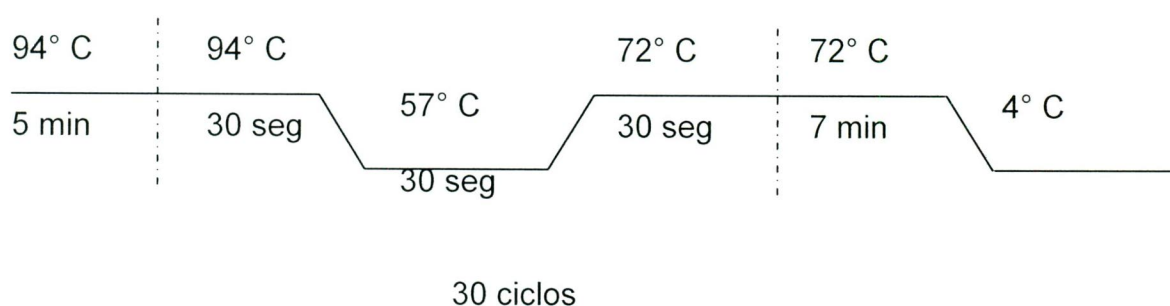
Una vez hidratado el ADN de cada una de las muestras, se determinó la calidad del ADN obtenido mediante geles de agarosa al 1%. Las muestras se dejaron correr a 100 Volts (V) en buffer tris–acetal–EDTA 1X (TAE 1X), teñidos con

bromuro de etidio y se cuantificó por densidad óptica (OD) a 260 nm en un espectrofotómetro de la marca Termo Electrón Biomate 3.

#### 6.4 PCR del gen *msp5*

Aproximadamente 100 ng de ADN de cada una de las muestras se utilizaron para el PCR. Los oligonucleótidos específicos para el gen *msp5* utilizados fueron; el oligonucleótido sentido MSP5extF 5'-gcatagcctccgctctttc-3' el reverso MSP5extR 5'-acacgaaactgtaccactgcc-3'; utilizando PCR Master Mix (Roche) de acuerdo a las instrucciones del proveedor; se adicionó 12.5 µl de Master Mix, 0.5 µl de cada oligonucleótido con una concentración de 20 µM, ADN de la muestra y H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 25 µl de reacción. Como control positivo se empleó ADN de una muestra positiva a *A. marginale* y el control negativo de la reacción de PCR sin ADN. El termociclador que se empleó para este procedimiento es de la marca Hibaid, de Electrón Corporation, modelo Px2. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 2 % a 100 V en buffer TAE 1X y fueron visualizados por tinción con bromuro de etidio.

Las características del programa de PCR utilizado fueron:



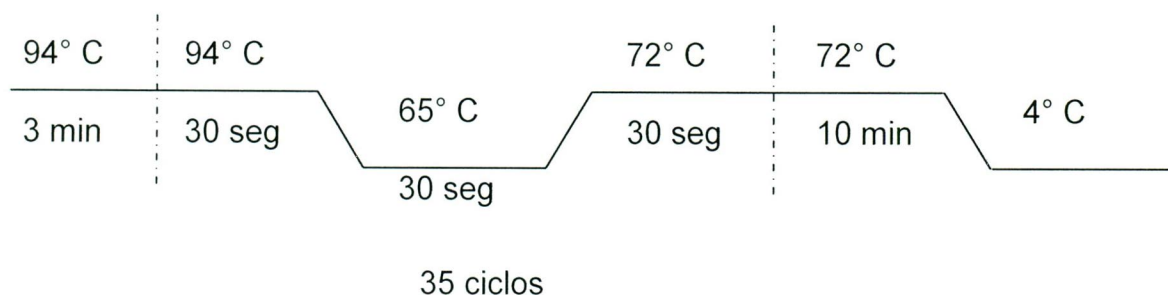
#### 6.5 PCR anidado (nPCR) del gen *msp5*

Se amplificó el gen *msp5* con un nPCR utilizando el oligonucleótido sentido MSP5intF 5'-tacacgtgccctaccgagtta-3, y el reverso MSP5extR (anteriormente descrito), a una concentración de 20 µM. La reacción de trabajo se preparó con

12.5  $\mu$ l de Master Mix (Roche), 0.5  $\mu$ l de cada uno de los oligonucleótidos a la concentración anteriormente indicada, 1  $\mu$ l de producto del primer PCR, y 8.5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.

Los productos de nPCR se visualizaron en geles de agarosa al 2%. Las muestras se dejaron correr a 100 V en buffer TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio.

Las características del programa utilizado para el nPCR fueron:



## 6.6 Comparación de los métodos de diagnóstico

Para determinar el índice  $\kappa$  los resultados se analizaron con una tabla de contingencia 2x2 con el programa Win episcopo, con un nivel confianza de 95%.

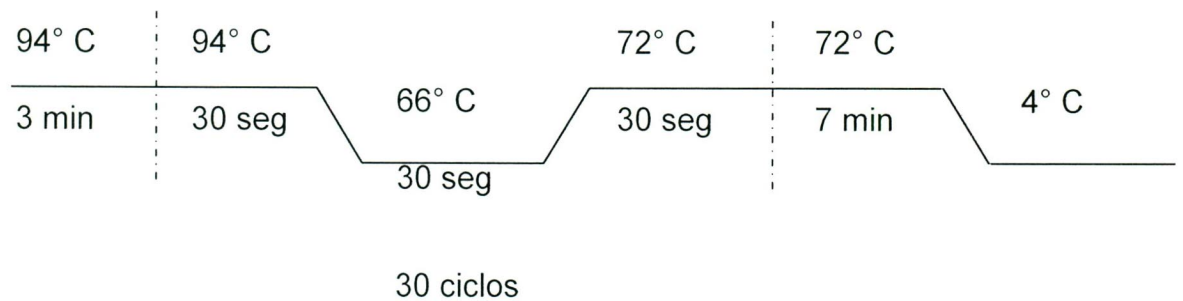
## DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE *A. marginale*

### 6.7 PCR del gen *msp1 $\alpha$*

Para realizar la amplificación de nuestro gen de interés, se utilizó nuevamente el ADN extraído de cada uno de los animales identificados como positivos a la enfermedad, la amplificación de los repetidos en tándem se realizó utilizando oligonucleótidos específicos que flanquean la región de repetidos variables en el extremo 5' del gen *msp1a*; la secuencia del oligonucleótido sentido MSP1aF 5'-gtgcttatggcagacatttcc-3' y la del reverso MSP1aR 5'-ctcaacactcgcaaccttgg-3'. Se utilizó 25  $\mu$ l de Master Mix (Roche) para llevar a cabo la reacción de PCR, se

añadió 1.0  $\mu\text{l}$  de cada uno de los oligonucleótidos con una concentración de 20 $\mu\text{M}$ , ADN aproximadamente 100 ng y H<sub>2</sub>O para completar un volumen final de 50 $\mu\text{l}$ . Como control positivo se utilizó una muestra de DNA que correspondía a un animal infectado con una cepa de *A. marginale*. Se identificaron las bandas del gen *msp1a* en geles de agarosa al 2%, se dejaron correr a 100 V en buffer TAE 1X y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

Las características del programa de PCR utilizado fueron:



### 6.8 nPCR para el gen *msp1 $\alpha$*

Se realizó la amplificación del gen *msp1 $\alpha$*  con un nPCR utilizando el oligonucleótido interno MSP1aNF 5'-gtgcttatggcagacatttc-3', y el reverso MSP1aR 5'-gcgattacacgttccgtatg-3', con una concentración 20  $\mu\text{M}$ . La reacción de trabajo se preparó con 25  $\mu\text{l}$  de Master Mix (Roche), 1.0  $\mu\text{l}$  de cada uno de los oligonucleótidos a la concentración anteriormente indicada, 1 $\mu\text{l}$  de producto del primer PCR, y 8.5  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O. Como control positivo se empleó ADN de una muestra positiva a *A. marginale*; el control de la reacción no contenía ADN.

Los productos de nPCR se visualizaron en geles de agarosa al 2% que se corrieron a 100 V en buffer TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio. Las características del programa del PCR anidado fueron las mismas que se utilizaron en el PCR de *msp1 $\alpha$* .

## 6.9 Purificación de geles de agarosa de las bandas de interés

Las bandas de interés fueron extraídas de los geles de agarosa, para esto se cortaron cuidadosamente y se transfirieron en un tubo eppendorf limpio y estéril de 1.5 ml; se determinó el peso de la banda cortada y se purificó utilizando el kit comercial "QIAEX II" (QIAGEN). Se adicionó 3 volúmenes del buffer de solubilización de agarosa QX1, y 10  $\mu$ l de la suspensión QIAEXII para extraer el ADN. Se incubó la muestra durante 10 min en un baño de agua a 50° C agitando con vórtex cada 2 minutos aproximadamente. Se centrifugó la muestra a 10,000 x g por 1 min. Se retiró el sobrenadante; y se adicionó 500  $\mu$ l de la solución de solubilización QXI al tubo y se resuspendió con vórtex la muestra. Nuevamente se centrifugó a 10,000 x g y se retiró el sobrenadante. La muestra se lavó dos veces con 500  $\mu$ l del buffer PE de lavado previamente diluido con etanol, se resuspendió la muestra con vórtex y se centrifugó a 10,000 x g por 1 min. Una vez lavada la muestra, se le retiró el sobrenadante cuidadosamente y se dejó secar a temperatura ambiente hasta que se observó una pastilla de color blanco, esto indicó la evaporación total de la solución de lavado empleada anteriormente. Se adicionó 20  $\mu$ l de agua a la muestra y se resuspendió utilizando vórtex. Nuevamente se centrifugó a 10,000 x g y se retiró cuidadosamente el sobrenadante de la muestra, con una micropipeta y se colocó en un tubo eppendorf limpio y estéril. En el sobrenadante se obtuvo el ADN purificado el cual se empleó para llevar a cabo la clonación de los fragmentos de interés.

## 6.10 Clonación del gen *msh1a*

El amplicón purificado de los geles de agarosa se utilizó para llevar a cabo la ligación en el vector pCR4-TOPO utilizando el kit de clonación TA-TOPO (Invitrogen, USA). La reacción de ligación consistió en: 1 $\mu$ l de sales (1.2 M de NaCl), 1  $\mu$ l de vector pCR4-TOPO (10ng/ $\mu$ l) y 4  $\mu$ l de producto de PCR recientemente purificado. La mezcla de reacción se dejó incubar 30 min a temperatura ambiente y se guardó a - 20°C.

### **6.11 Transformación de células competentes**

El producto de la ligación se utilizó para transformar células químicamente competentes de *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, USA). Los viales que contenían 50  $\mu$ l de células competentes fueron colocados en un baño de hielo, se adicionó 2  $\mu$ l de la reacción de ligación y se incubó durante 30 minutos; una vez transcurrido el tiempo mencionado, se dió un choque térmico a las células en un baño de agua a 42°C exactamente durante 30 segundos. Inmediatamente las células se colocaron en hielo, se añadió 250  $\mu$ l de medio S.O.C., y se incubó a 37°C y 200 rpm en una incubadora con agitación marca New Brunswick, modelo C23KC durante un período de 1 hora. Las bacterias se plaquearon en cajas de Petri conteniendo agar LB con ampicilina (100 mg/ml) y se dejó a 37° C durante toda la noche.

### **6.12 Selección de colonias**

De las placas que corresponden a cada banda clonada en TOPO se picaron 3 colonias. Se sembraron en tubos que contenían medio LB con ampicilina y se dejó incubando a 37° C y 200 rpm durante toda la noche.

### **6.13 Purificación del ADN plasmídico**

El cultivo bacteriano obtenido se traspasó a tubos eppendorf de 1.5 ml, se centrifugó a 10,000 x g durante 5 min, para la obtención de un botón de bacterias. Se procedió a la purificación del ADN plasmídico mediante el uso del Kit comercial "Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System" (Promega); se retiró el sobrenadante del botón de células y se resuspendió con vórtex en 250  $\mu$ l de la solución de resuspensión de células (50mM Tris- HCl, pH:7.5; 10 mM EDTA; 100 mg/mL Rnasa A) y posteriormente se adicionó 250  $\mu$ l de solución de lisis celular (200mM NaOH; 1% SDS) se homogeneizó invirtiendo 4 veces los tubos, se

dejó incubar durante 5 min a temperatura ambiente, se adicionó 10  $\mu$ l de proteasa alcalina, nuevamente se invirtieron 4 veces los tubos para mezclar la reacción y se incubó los tubos durante 5 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo mencionado, se adicionó 350  $\mu$ l de Solución de Neutralización de la reacción (4.09 M de Hidrocloruro de guanidino; 0.759 M Acetato de potasio; 2.12 M de Ácido acético glacial) se invirtió 4 veces el tubo y se centrifugó el lisado bacteriano a 10,000 x g durante 10 min; el sobrenadante se decantó en una columna de purificación, se centrifugó a 10,000 x g durante 1 min. Se adicionó 750  $\mu$ L de solución de lavado (162 mM Acetato de potasio, 22.6 mM Tris- HCl, pH. 7.5; 1.9mM EDTA, pH: 8.0) previamente diluida con etanol al 95%, se centrifugó la muestra nuevamente a 10, 000 x g durante 1 min, se repitió el lavado de la columna con 250  $\mu$ l de Solución de Lavado, se centrifugó una vez como en el paso anterior . Posteriormente, se transfirió a un tubo limpio la columna que contenía el ADN purificado y se adicionó 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de DNasa, se centrifugó a 10,000 x g. Se obtuvo el ADN plasmídico purificado.

#### **6.14 Análisis de los plásmidos purificados**

Se cargó 1 $\mu$ l de las muestras de ADN plasmídico purificado en geles de agarosa al 1%, mediante la comparación de tamaño con un control de vector nativo religado se determinó si contenía o no el fragmento de interés. Las muestras se dejaron correr a 100 V en buffer TAE 1X y fueron visualizados por tinción con bromuro de etidio.

#### **6.15 Restricción con *EcoRI***

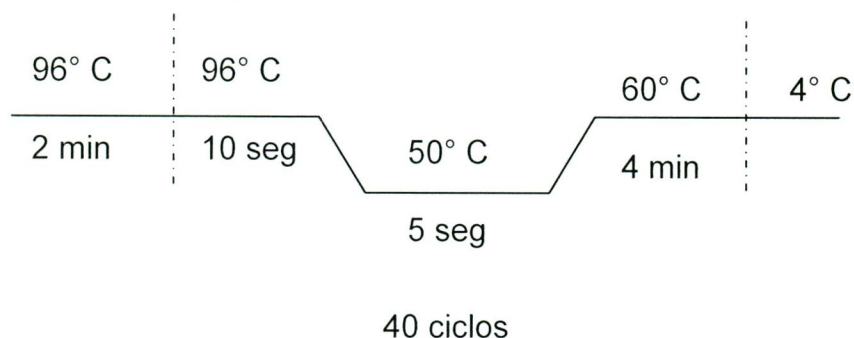
Una vez identificadas las muestras con el fragmento de interés se sometieron a restricción utilizando 1 $\mu$ l de *EcoRI*, 1 $\mu$ l de Buffer de *EcoRI*, 5  $\mu$ l de ADN plasmídico purificado y 3 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. Se incubó durante 2 horas a 37°C. Transcurrido el tiempo, las muestras se corrieron en geles de agarosa al 2% en buffer TAE a 100 V, fueron visualizadas por tinción con bromuro de etidio.

Las muestras de ADN plasmídico purificado se cuantificaron con un espectrofotómetro de la marca Thermo Electron Corporation Biomate 3, a 260 nm y a 280 nm, para determinar la relación ADN/proteína (260/280).

## 6.16 Secuenciación

La reacción de secuenciación contenía: 2.0  $\mu$ l de Big Dye (QIAGEN), 3.0  $\mu$ l de Buffer 6X, ADN de 300 ng a 500 ng), 1 $\mu$ l de Primer sentido M13F o reverso M13R a una concentración de 10  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O para un volumen final de 20 $\mu$ l.

Las características del programa fueron:



Cada una de las muestras se purificó con un Kit comercial (QIAGEN, DyeEx™ 2.0 Spin Kit 250) con el que se eliminaron los nucleótidos marcados no incorporados a la muestra, se secó en speed-vac (eppendorf concentrador 5301) durante 25 min a temperatura ambiente, se resuspendió en 15 $\mu$ l de dimetil-formamida y se colocó en las placas de 96 pozos del secuenciador. La secuenciación se llevó a cabo por triplicado para cada una de las muestras seleccionadas para su análisis.

El secuenciador utilizado fue de la marca Applied Biosystems, HITACHI, 3130 Genetic Analyzer.

## 6.17 Análisis de las secuencias

Las secuencias nucleotídicas de los electroferogramas se analizaron con el programa Bioedit, identificando la secuencia del oligonucleótido correspondiente (Sentido o Reverso), posteriormente se buscó el marco de lectura abierto, el cual nos permitió identificar el sitio en el cual comienza la secuencia de los repetidos del gen *msp1α*. Se realizó la traducción de los repetidos de nucleótidos a aminoácidos mediante el programa de Translate tools en Expasy, (<http://www.expasy.ch/tools/#translate>), y se determinó el genotipo con el programa Kansas (<http://www.KansMatchJs.html.bak.htm>) diseñado específicamente para la identificación de genotipos de MSP1a comparando la secuencia de interés con una base de datos.

### 6.17.1 Alineamiento múltiple de las secuencias de los genotipos.

Se realizó el análisis de cada uno de los genotipos distribuidos dentro de la población mediante alineamientos múltiples, se utilizó el programa MEGA 3.1, y se identificó cada uno de los cambios de nucleótidos dentro de la secuencia, la presencia de los repetidos ricos en Ser/Thr altamente conservados entre los diferentes genotipos y la secuencia del epítipo de neutralización que son característicos y conservados entre las cepas de *A. marginale*.

## VII. RESULTADOS

### IDENTIFICACIÓN DE *A. marginale* EN MUESTRAS DE GANADO BOVINO INFECTADAS, EN DOS ÉPOCAS DIFERENTES DEL AÑO.

- **Ensayo de cELISA**

Las muestras de suero correspondientes a cada uno de los animales seleccionados para esta investigación se analizaron mediante el ensayo de cELISA, que permiten identificar anticuerpos específicos contra la proteína recombinante MSP5 de *A. marginale*. Lo que nos permitió determinar si los animales eran positivos a la infección con *A. marginale*. Los resultados de esta prueba se encuentran reportados en Cuadro III.

	"La Joya"			"El Verdineño"		
	+	-	Total	+	-	Total
Primer muestreo (n=166)	15	69	84	81	1	82
Segundo muestreo (n=166)	14	70	84	80	2	82

Cuadro III. Resultado del cELISA de las muestras analizadas correspondientes a los dos muestreos, de los dos ranchos.

Mediante esta metodología se identificaron 96 animales positivos a la infección en el primer muestro y en el segundo 94 animales infectados con *A. marginale*.

- **Obtención de ADN a partir de muestras de sangre de los bovinos seleccionados.**

Se extrajo ADN de *A. marginale* a partir de sangre bovina; se evaluó la integridad de éste en geles de agarosa al 1% En la Fig. 15 se muestran dos geles

representativos de algunos ADNs extraídos de las muestras trabajadas. Las muestras de ADN íntegro en el análisis en geles de agarosa fueron utilizadas en los experimentos posteriores.

- **Identificación de muestras positivas a la enfermedad Anaplasmosis mediante la amplificación del gen específico *msp5* (PCR y nPCR)**

El gen *msp5* se amplificó por PCR, como resultado de esta amplificación se obtuvo una amplicón de 458 pb correspondiente al tamaño reportado utilizando estos oligonucleótidos, mientras que en el control negativo de la reacción, no se observó amplificación de producto génico (Fig. 16). Se analizó un total de 166 muestras correspondientes al segundo muestreo (realizado en Noviembre) de los ranchos anteriormente mencionados.

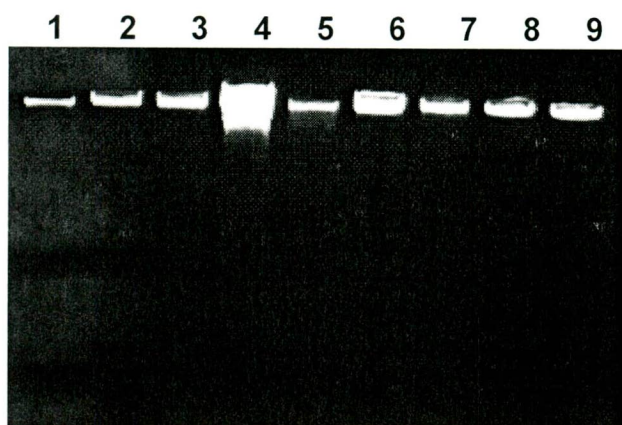
En el caso de las muestras que no amplificaron en un primer PCR, se sometió a una amplificación por nPCR; como resultado se obtuvo un amplicón de 345 pb correspondiente al tamaño reportado, mientras que en el control negativo de la primera reacción de PCR, no se observó señal del producto amplificado (Fig. 17). Esta técnica se empleó para evitar la presencia de falsos negativos producidos por la poca cantidad de ADN de *A. marginale* obtenida de la extracción.

El total de muestras analizadas por PCR fue de 166, de las cuales 84 correspondieron al rancho “La Joya” analizadas por PCR y nPCR se identificaron 30 muestras positivas a Anaplasmosis obteniendo la amplificación de la banda en el tamaño esperado en cada uno de los casos.

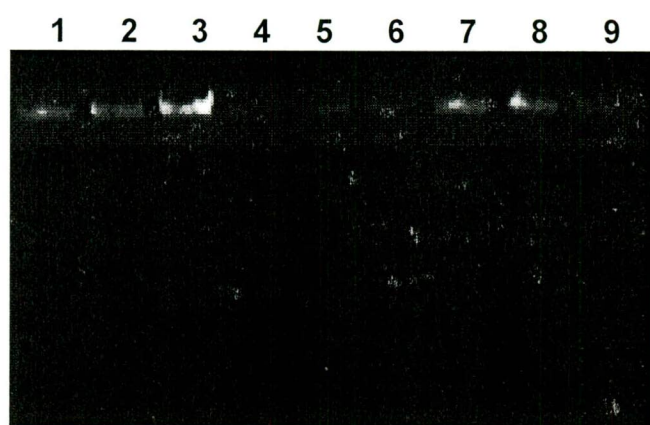
Rancho “El Verdineño”. De las 82 muestras analizadas se determinó que se encontraban infectadas con *A. marginale*.

Cuadro IV. Resultados de la amplificación del gen *msp5*.

"La Joya"		"El Verdineño"	
+	-	+	-
30	54	82	0



(A)



(B)

Fig. 15. Verificación de la integridad del ADN; 5  $\mu$ l de cada una de las muestras extraídas se cargaron en geles de agarosa al 1%, se dejaron correr a 100V/ 50 min. (A) Número de animales correspondientes al rancho "El Verdineño" En el carril 1. 1572, carril 2. 8536, carril 3. 4531, carril 5. 5585, carril 6. 3607, carril 7. 4507, carril 8. 1562, carril 9. 1546. (B) Muestras del rancho "La Joya" en el carril 1-3. 06B, carril 4. 12R, carril 5. 37A, carril 6. 10V, carril 7. 24 R, carril 8. 40N, carril 9. 90N.

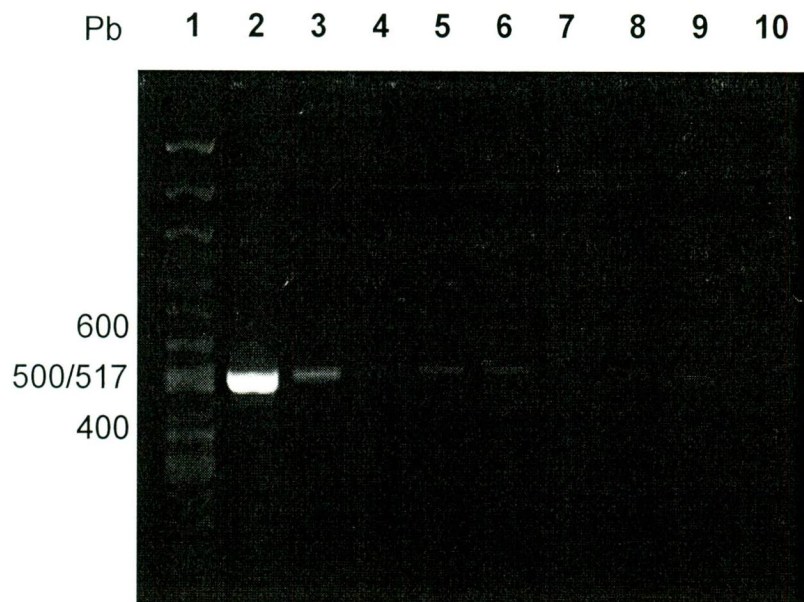


Fig. 16. Amplificación por PCR del gen *msp5* de *A. marginale*. El gen se amplificó con oligonucleótidos específicos utilizando como templado ADN<sub>g</sub>. Posterior a 30 ciclos de amplificación, la muestra de 25  $\mu$ l se corrió en un gel de agarosa al 2% a 100 V/ 50 min. Productos de PCR de muestras de Nayarit; rancho "El Verdineño" en el carril 1. Marcador de 100 Pb, carril 2. Control positivo, (los siguientes carriles contienen muestras de animales correspondientes al rancho "El Verdineño" carril 3. 5591, carril 4. 0049, carril 5. 3600, carril 6. 8536, carril 7. 4592, carril 8. 3598, carril 9. 1562, carril 10. Control negativo de la reacción de PCR.

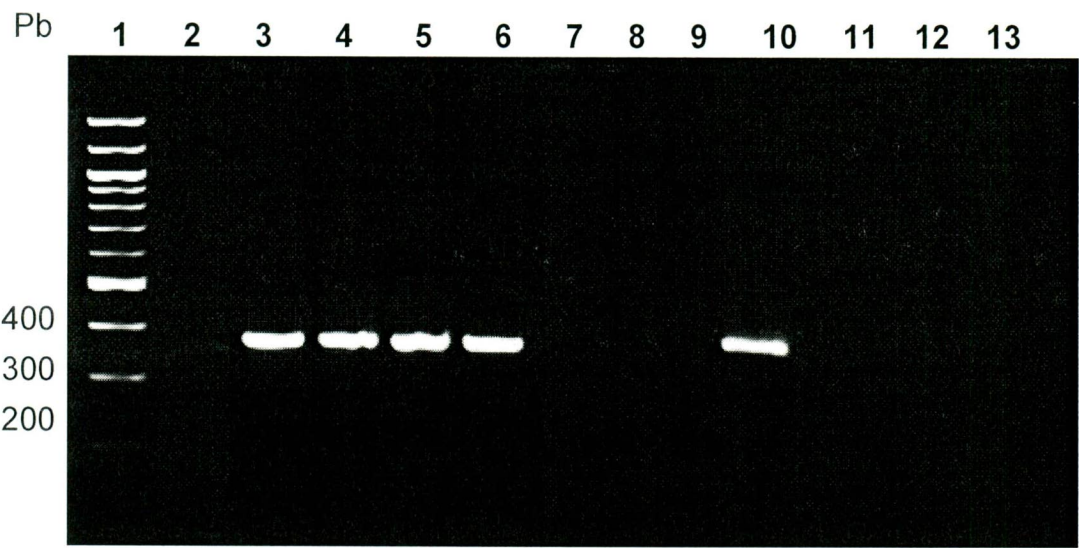


Fig. 17. Amplificación por nPCR del gen *msp5* de *Anaplasma marginale*. El gen se amplificó con oligonucleótidos internos específicos utilizando como templado producto de PCR. Posterior a 35 ciclos de amplificación, la muestra de 25  $\mu$ l se corrió en un gel de agarosa al 2% a 100 V/ 50 minutos, las bandas se visualizaron con luz UV. Productos de nPCR de muestras del rancho de Nayarit; "El Verdineño" y de Jalisco rancho "la Joya" en el carril 1. Marcador de 100 Pb, carril 2. Control positivo, carril 3. 1520, carril 4. 1560, carril 5. 01N, carril 6. 01A, carril 7. 4534, carril 8. 23R, carril 9. 94 R, carril 10. 19R, carril 11. 14R, carril 12. 17R, carril 13. Control negativo de la reacción de PCR

Con los resultados obtenidos de las muestras analizadas por los métodos de cELISA y PCR se realizó una comparación de los mismos para determinar la eficiencia en el diagnóstico de la enfermedad. La comparación se muestra en una tabla de contingencia 2x2

Cuadro V. Comparación de los resultados obtenidos con el cELISA y el PCR.

		PCR		Total
		+	-	
cELISA	+	91	2	93
	-	21	52	73
		102	54	166

El valor de  $\kappa$  obtenido fue de 0.77 con un nivel de confianza del 95%. Se utilizó el programa Win Episcopo 2.0.

## GENOTIPIFICACIÓN DE AISLADOS DE *A. marginale* DE ANIMALES DE CAMPO.

- **Amplificación del gen *msp1 $\alpha$***

La amplificación con PCR y nPCR del gen *msp1 $\alpha$*  se llevó a cabo empleando oligonucleótidos específicos que flanquean la región de los repetidos en tándem del gen con un total de 23 muestras amplificadas correspondientes al rancho “La joya” y del rancho “El Verdineño” se amplificaron 84 muestras. En la Fig.18 se observa un ejemplo de algunas de las muestras amplificadas con PCR.

Como se puede observar en la Fig. 18, cada una de las muestras amplificadas con esta metodología muestra la presencia de varios amplicones que difieren en el tamaño. Además el número de amplicones obtenidos para distintas muestras es diferente. Algunas de las muestras amplificaron más de una banda y otras solamente mostraron un amplicón como en el caso del control positivo, la muestra 05A y la muestra 5552.

Cuando alguna de las muestras no pudo ser amplificada mediante el PCR convencional se realizó una segunda amplificación del gen utilizando oligonucleótidos internos específicos y como templado el producto de un primer PCR. En la Fig.19 se observa un ejemplo de algunas muestras amplificadas mediante nPCR.

Con los resultados obtenidos de cada una de las muestras se determinó el patrón de bandas amplificadas en cada una de ellas. En total se amplificaron 105 muestras. De las cuales 14 muestras mostraron la presencia de un amplicón y en 91 muestras se identificaron 2 o más amplicones de diferentes tamaños.

Un total de 21 muestras fueron seleccionadas para ser secuenciadas: 18 del rancho “El Verdineño y 3 del rancho “La Joya”. Se purificaron de geles de agarosa,

los amplicones de cada una de las muestras, se clonó en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen), y se transformaron células competentes *Escherichia coli* TOP 10.

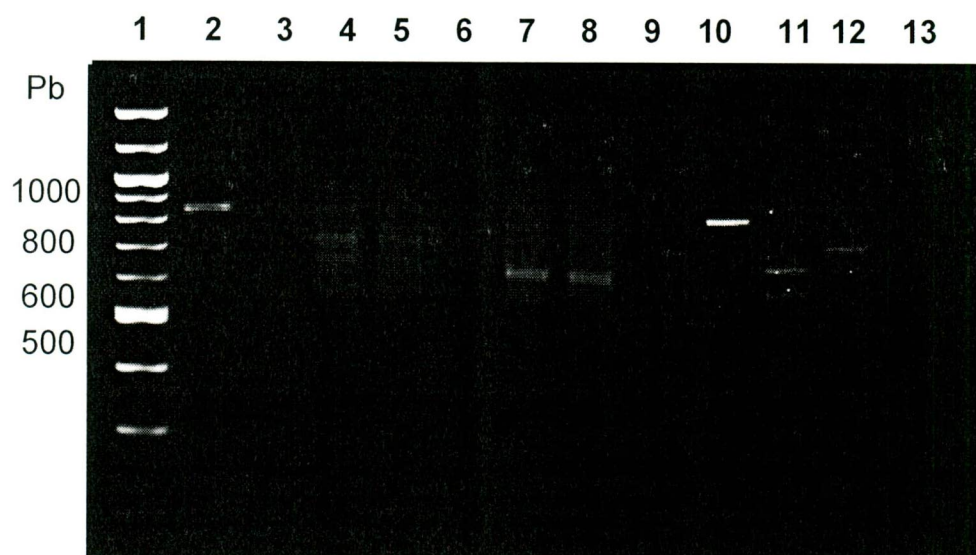


Fig. 18. Amplificación por PCR del gen *msp1 $\alpha$*  de *Anaplasma marginale*. El gen se amplificó con oligonucleótidos específicos que flanquean la región de los repetidos, utilizando como templado ADN g. Posterior a 30 ciclos de amplificación, la muestra de 50  $\mu$ l (repartidas en 2 pozos) y de 25  $\mu$ l se corrieron en un gel de agarosa al 2% a 100 V/ 50 min. Productos de PCR de muestras del rancho de Nayarit; "El Verdineño" y de Jalisco rancho "La Joya" en el carril 1. Marcador de 100 Pb, carril 2. Control positivo, carril 4-5. 1527, carril 7-8. 1562, carril 10. 05A, carril 11. 1572, carril 12. 5552, carril 13. Control negativo de la reacción de PCR.

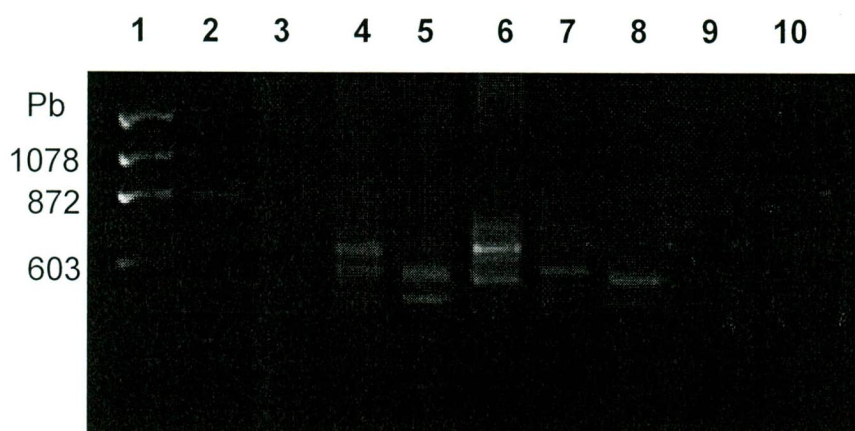


Fig. 19. Amplificación por PCR anidado del gen *msp1 $\alpha$*  de *Anaplasma marginale*. El gen se amplificó con oligonucleótidos internos específicos que flanquean la región de los repetidos, utilizando como templado producto de PCR. Posterior a 30 ciclos de amplificación, las muestras de 25  $\mu$ l se corrieron en un gel de agarosa al 2% a 100 V/ 50 min. Productos de PCR de muestras del rancho de Nayarit; "El Verdineño" en el carril 1. Marcador Phix, carril 2. Control positivo, carril 4. 1546, carril 5. 3607, carril 6. 3539, carril 7. 4538, carril 8. 5514, carril 10. Control negativo de la reacción de PCR.

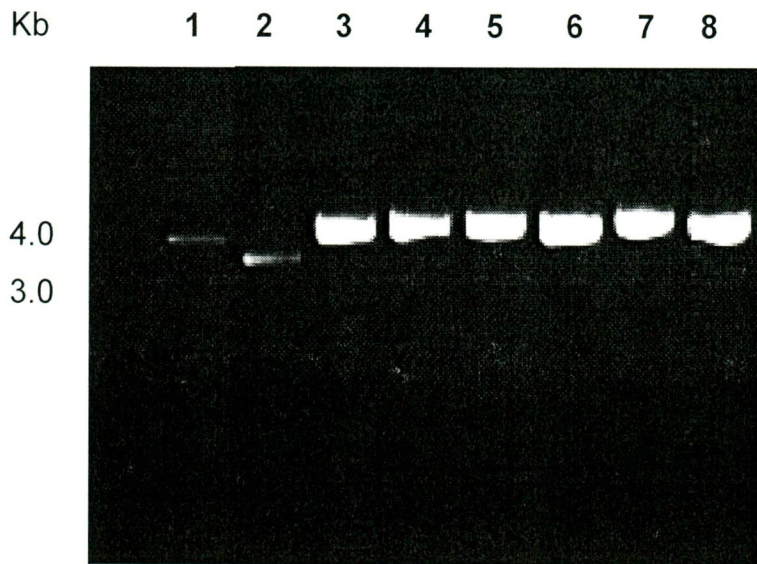
- **Identificación de las clonas con el inserto de interés a partir de DNA plasmídico purificado.**

Las células transformadas con el vector pCR4-TOPO (Invitrogen), se cultivaron en placas de LB con Ampicilina, posteriormente se seleccionaron 3 colonias de cada una de las muestras y se realizó la purificación del ADN de las mismas, mediante la técnica de minipreps (se realizaron aproximadamente 300 purificaciones), una vez obtenido el ADN purificado, se corrieron en geles de agarosa al 1% para determinar si contenían el inserto comparando el tamaño de la muestra con un control de plásmido nativo. En la Fig. 20 A y B se muestran ejemplos de los plásmidos purificados correspondientes a tres colonias de dos muestras diferentes.

Una vez identificadas las muestras que contenían el fragmento de interés se sometieron a digestión con la enzima *EcoRI*; ésta reconoce dos sitios de restricción en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen) flanqueando el inserto. Los productos de la restricción se corrieron en geles de agarosa al 2% y fueron visualizados por tinción con bromuro de etidio.

El clón positivo se identificó por la presencia de un fragmento. En la Fig. 21 se muestra una imagen representativa de las muestras analizadas, en la cual se puede apreciar la presencia de bandas de diferentes tamaños en el caso de la muestra 3616 y la de una banda del mismo peso en las clonas de la muestra 54N.

A.



B.

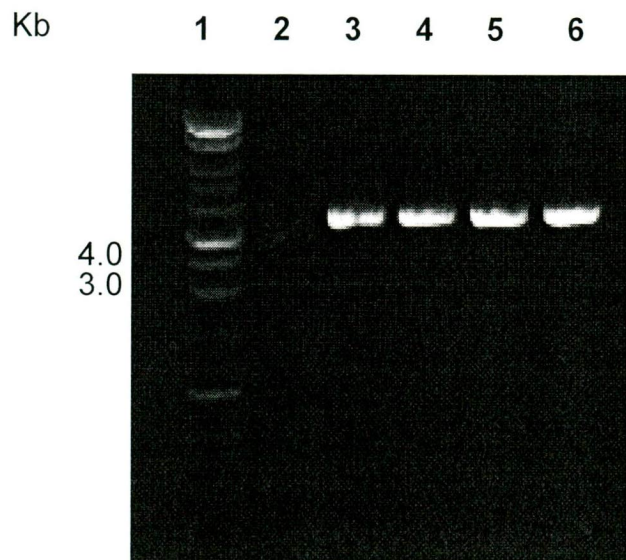
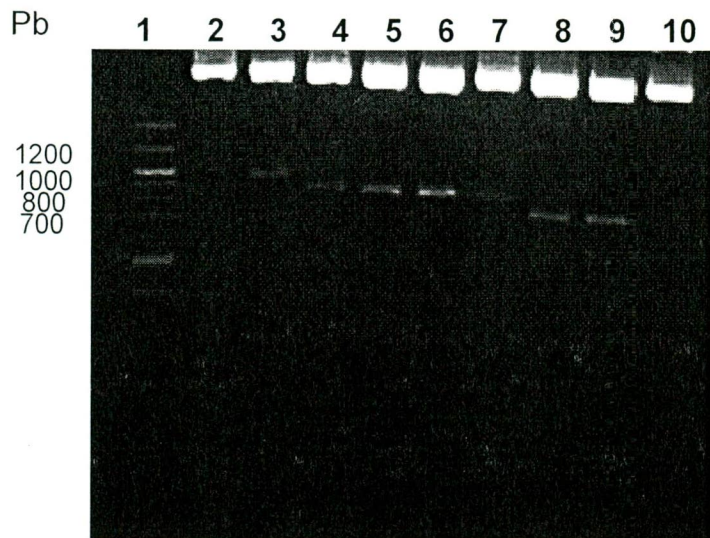


Fig. 20. Análisis del ADN plasmídico purificado por minipreps. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1% a 100 V/ 35 min. (A) Muestras de las clonas transformadas del animal 4519 del rancho "El Verdineño" de Nayarit, En el carril 1. Marcador de 1.0 Kb, carril 2. Control de plásmido nativo religado, carril 3. 4519 U1, carril 4. 4519 U2, carril 5. 4519 U3, carril 6. 4519 D1, carril 7. 4519 D2, carril 8. 4519 D3. (B) Muestras de clonas transformadas del animal 06B del rancho "La Joya" de Jalisco. Carril 1. Marcador de 1.0 Kb, carril 2. Control del plásmido nativo, carril 3. 06B clona 1, carril 4. 06B clona 3, carril 5. 06B clona 3, carril 6. 06B clona 4.

A.



B.

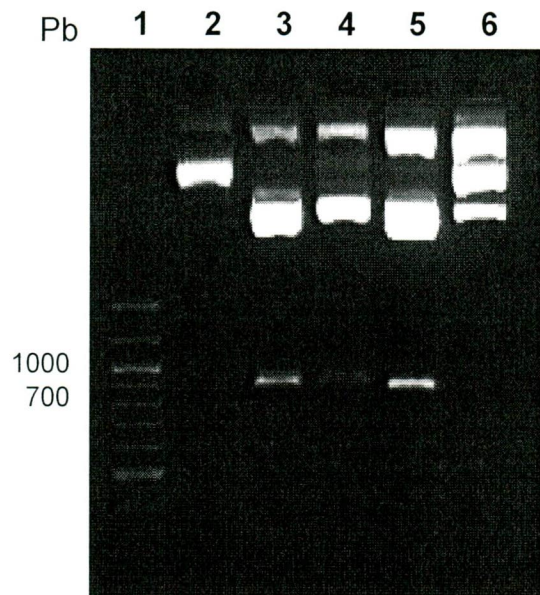


Fig. 21. Análisis de la restricción con la enzima *EcoRI* de los plásmidos pCR4-TOPO (Invitrogen). Con insertos del gen *msp1 $\alpha$* , El ADN plasmídico purificado se sometió a digestión con la enzima de restricción *EcoRI* a 37° C durante 2 horas. El producto de digestión (10  $\mu$ l) se corrió en un gel de agarosa al 2% a 100V/ 50 min. (A) Muestra 3616 correspondiente al rancho "El Verdineño", carril 1. Marcador de 100 Pb, carril 2. 3616 U1, carril 3. 3616 U2, carril 4. 3616 U3, carril 5. 3616 M1, carril 6. 3616 M2, carril 7. 3616 M3, carril 8. 3616 D1, carril 9. 3616 D2, carril 10. 3616 D3. (B) Muestra 54 N del rancho "La Joya Carril 1 M de 1,000 Pb, carril 2. 54 N clona 1, carril 3. 54N clona 2, carril 4. 54N clona 3, carril 5. 54 N clona 4, carril 6. 54N clona 5.

Una vez que la presencia de inserto se confirmó, se cuantificaron las muestras mediante espectrofotometría a 260 nm y 280 nm para determinar la relación de ADN /proteínas presentes en las muestras, se eligieron las muestras que contenían una relación de proteínas entre 1.8 y 1.9 para preparar las muestras de secuenciación; además se determinó la cantidad de ADN necesaria para llevar a cabo la reacción de secuenciación.

Cuadro 6. Ejemplo de los resultados de la relación 260/280 (ADN/proteínas) de algunas de las muestras analizadas.

ID de la muestra	Relación 260/280	Concentración de ADN	Concentración de proteínas
1572 U1	1.911	132.2	164.7
1572 U2	1.836	120.8	246.2
1572 U3	1.907	179.6	231.5
049 M1.1	1.810	155.7	362.6
049 M1.2	1.904	148.3	194.9
049 M1.3	1.925	137.0	151.1
049 M2.1	1.936	240.1	241.0
049 M2.2	1.902	220.7	295.6
049 M2.3	1.934	233.8	238.4
8536 D1	1.795	457.7	394.7
8536 D2	1.903	146.5	194.2
8536 D3	1.840	154.7	307.3
2085 M2.1	1.831	191.5	401.0
2085 M2.2	1.308	24.1	292.1
2085 M2.3	1.916	161.5	192.6
06 B1	1.818	77.6	173.3
06 B2	1.880	82.3	128.3
06 B3	1.950	156.0	135.5

Se prepararon 261 muestras de reacción para secuenciar, correspondientes a cada una de las bandas purificadas de las muestras seleccionadas para la identificación de los genotipos distribuidos en los dos ranchos anteriormente mencionados.

- **Secuenciación del gen *msp1 $\alpha$*  de *A. marginale*.**

Las reacciones de secuenciación analizadas en el equipo de Secuenciación de Applied Biosystems, HITACHI, 3130 Genetic Analyzer y se obtuvieron electroferogramas de cada una de las muestras seleccionadas, para ser analizadas con herramientas bioinformáticas, que nos permitieron identificar la presencia de los repetidos en tándem del gen *msp1 $\alpha$* ...

En la Fig. 22 se observa un ejemplo de un electroferograma correspondiente a la muestra 1562 U1 designado por la posición de la banda en el gel de agarosa y 1 refiriéndome a el número de clona a secuenciar.

Cuadro VI Clonas secuenciadas.

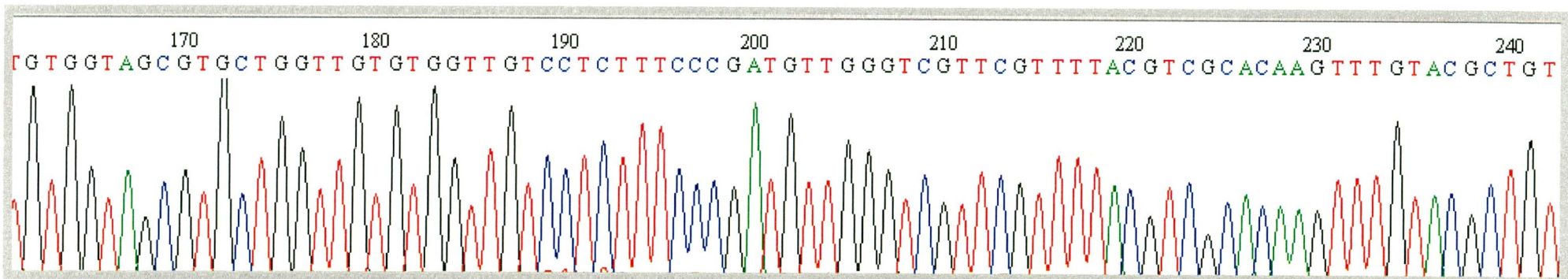
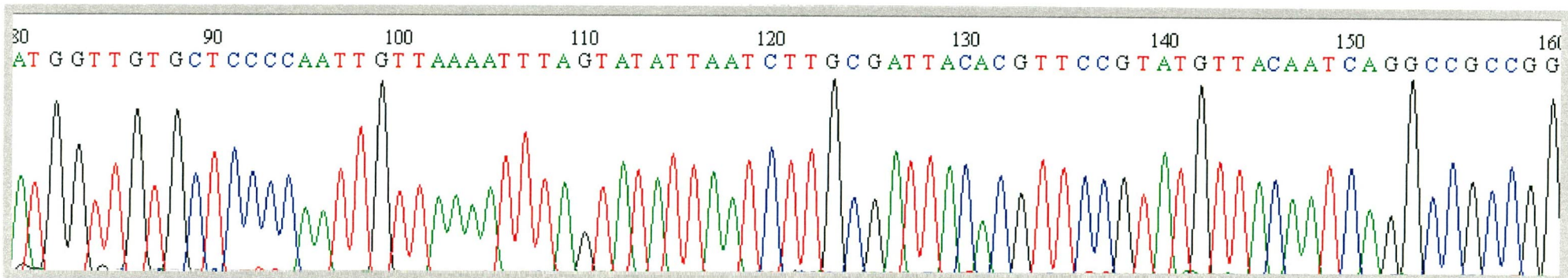
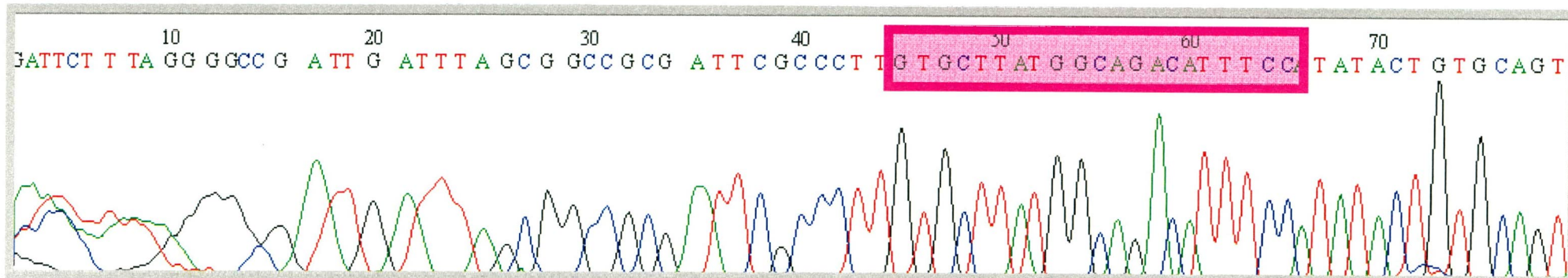
Muestras del rancho "El Verdineño"

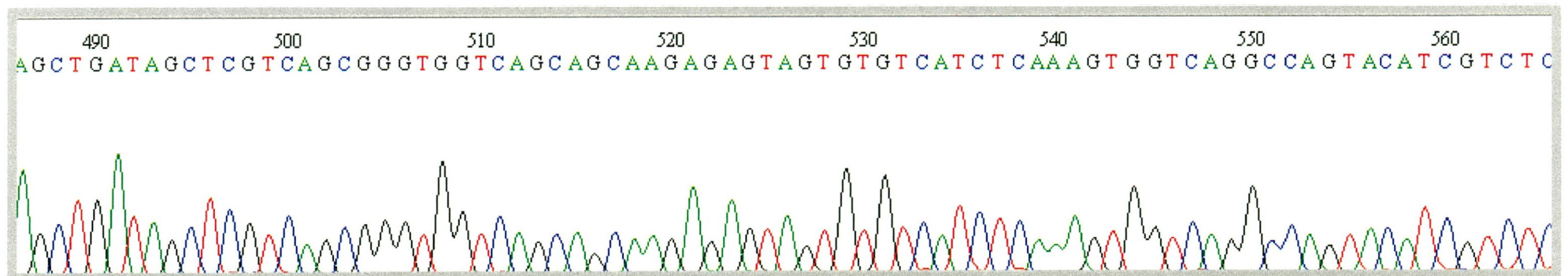
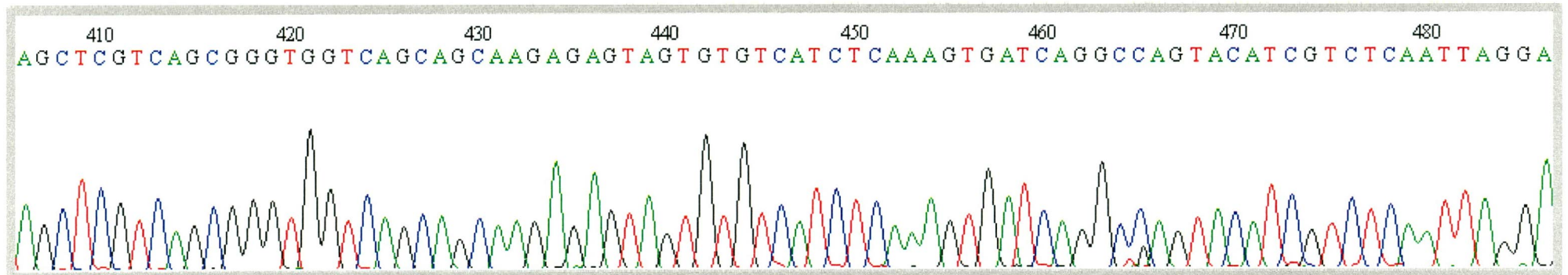
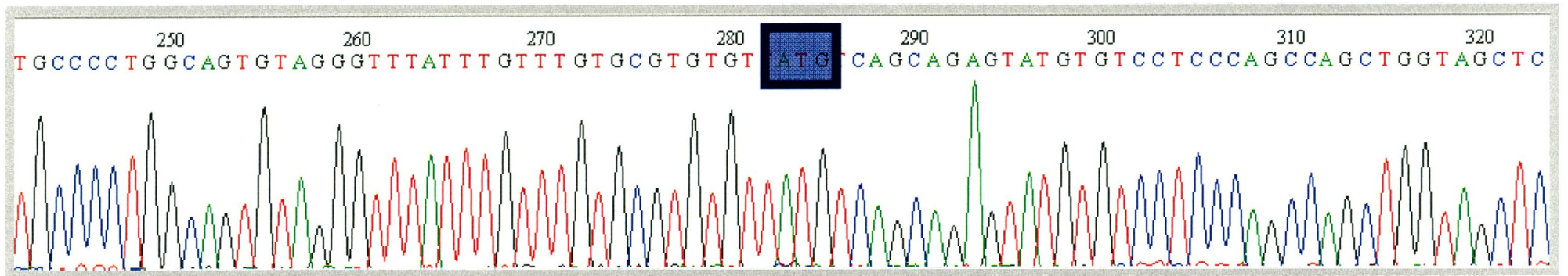
No. del animal seleccionado	Nombre de las bandas cortadas y secuenciadas	No. de clonas secuenciadas
43	U M2 D	9
49	M1 M2	6
3600	U M1 M2 D	12
5591	U M1 M2 D	12
8536	U D	6
3592	U	9
3615	M2 D A	3

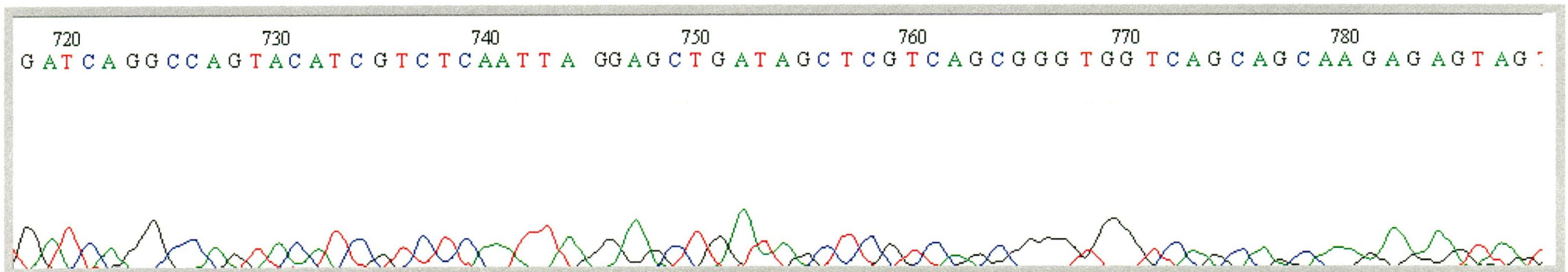
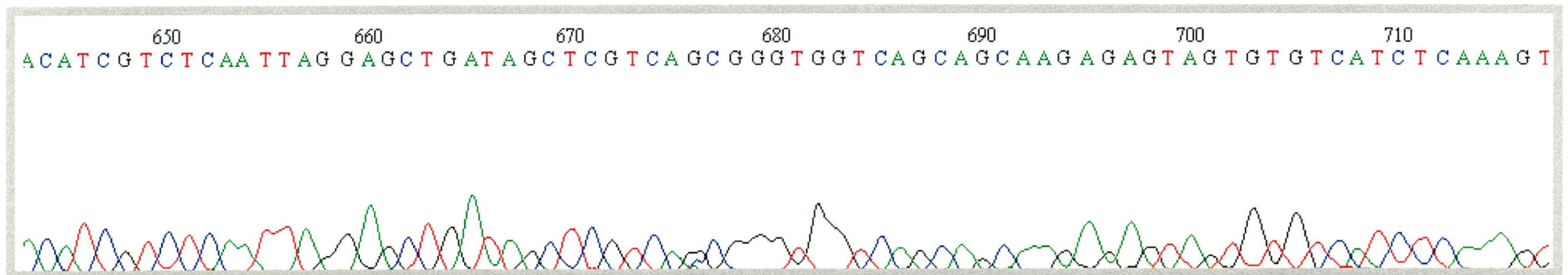
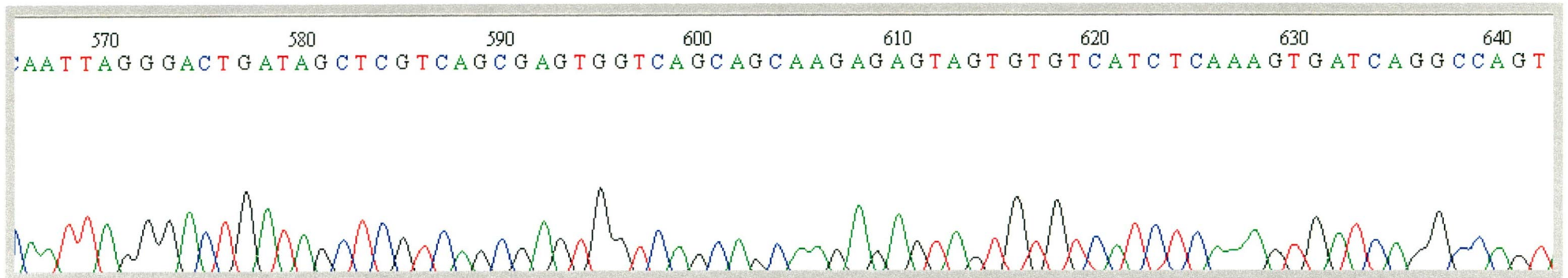
No. del animal seleccionado	Nombre de las bandas cortadas y secuenciadas	No. de clonas secuenciadas
1572	U M D	9
5552	U D	6
5585	U M D	9
1562	U M	6
3533	B	3
3616	U M D	9
3597	C	3
4517	U M1 M2 M3 D	15
4519	U D	6
3579	E	3
1538	F	3
1527	U M D	9

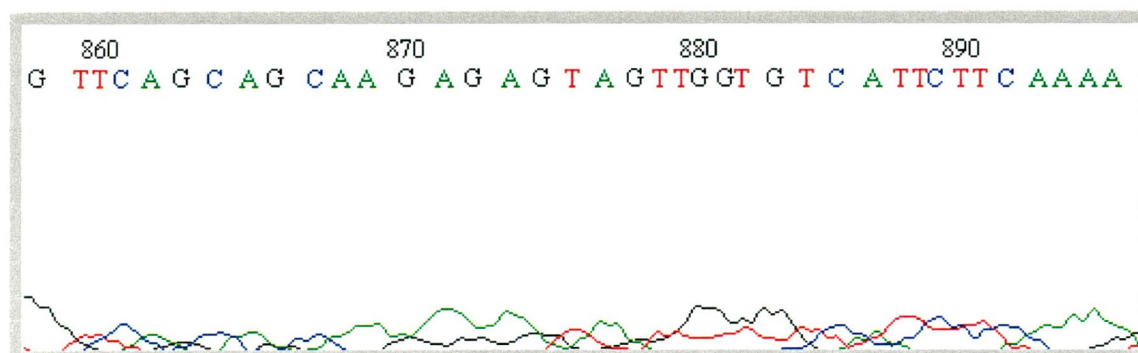
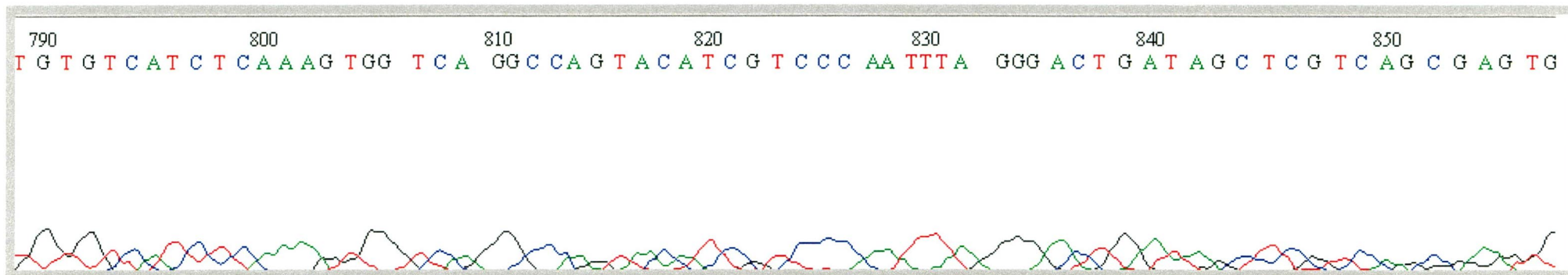
Muestras del rancho "La Joya"

No. del animal seleccionado	Nombre de las bandas cortadas y secuenciadas	No. de clonas secuenciadas
05A	A	3
06B	B	3
54 N	C	3









{ XE "Fig. 21 Electroferograma de la muda la muestra 1563 u" \b }Fig. 21. Electroferograma obtenido de la muestra 1562U1, correspondiente al rancho "El Verdineño". Secuencia correspondiente a la muestra secuenciada con el oligonucleótido sentido. En el nucleótido 44 se identificó la secuencia del oligonucleótido, utilizado para llevar a cabo la amplificación del gen de interés (se encuentre ubicado dentro de una caja de color rosa); en el nucleótido número 283 se identificó al ATG el cual nos indica el inicio de la secuencia correspondiente a los repetidos en tándem.

- **Identificación del genotipo**

La secuencia de nucleótidos obtenida de cada muestra fue analizada mediante herramientas bioinformáticas. En primera instancia utilizando BioEdit se corroboró la presencia del fragmento de interés mediante la identificación de los oligonucleótidos específicos empleados en la amplificación de *msh1α*, en el fragmento clonado. Posteriormente se identificó la posición del Marco de Lectura Abierto del gen analizado, para llevar a cabo la traducción de la secuencia de nucleótidos a aminoácidos (aa) mediante la aplicación del programa Translate-Tools, lo que nos permitió identificar la presencia de los repetidos en tándem; los cuales fueron analizados con la base de datos KANSAS. Esta base de datos identifica la secuencia de los repetidos y proporciona el genotipo correspondiente a cada una de las muestras analizadas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en cada uno de los análisis de secuencias de cada una de las muestras se identificaron 18 genotipos diferentes distribuidos dentro de los hatos de bovinos. De los cuales 7 genotipos identificados fueron considerados nuevos debido a que estos no se encuentran reportados en las bases de datos; y 11 genotipos previamente identificados y reportados. Los cuales se encuentran esquematizados en la Fig. 23.

De las secuencias de aa obtenidas de cada una de las clonas analizadas, se seleccionó una representativa del genotipo identificado para llevar a cabo alineamientos múltiples con el programa MEGA 3.1.

El alineamiento múltiple de las secuencias nos permitió identificar las regiones características de los repetidos en tandem de *A. marginale*, como son: las regiones conservadas en los extremos 3' y 5' (información no mostrada), la presencia de repetidos en tandem y las regiones ricas en serina y treonina y la presencia del epítipo sensible a neutralización ANA15D Fig.23.

Genotipo Identificado	Representación de repetidos	Animales	# de animales
$\tau$ , NR4, NR5		3600, 5591, 8536, 5585, 3597, 4517.	6
TBCNBCF		043, 05A, 1562, 4517, 4519	5
13 (x4)		043, 3600, 1572, 1562, 049	5
$\alpha\beta\beta\beta\Gamma$		5591, 1572, 5552, 4517	4
13(x6)		3533, 3616, 54N, 4519	4
$\alpha\beta\beta\beta\Gamma\Gamma$		3600, 54N, 1527	3
$\alpha\beta\Gamma\Gamma$		5552, 4517	2
$\alpha\beta\beta\Gamma$ (México, Morelos, Veracruz)		8536	1
$\alpha\beta\beta\beta\beta\Gamma$		5591	1

Fig. 22. Representación esquemática de cada uno de los repetidos identificados en las muestras analizadas y animales que contiene dicho genotipo, Cada uno de los repetidos se encuentra representado por un color o diseño característico. Se designó con las siglas NR (no reconocido) a los repetidos que no se identificaron en la base de datos del programa Kansas)

Genotipo Identificado	Representación de repetidos	Muestras	# de veces
TQCNBCF		1527	1
Israelí -4, NR2(x4) NR4, Israelí-3		3592	1
$\tau$ , NR10, NR5		3592	1
NR7(x2), NR20(x2), NR8, MF		049	1
NRa, 13, NRb		06B	1
NR1, NR16(x2), NR24, NR2		1572	1
NR1, NR16(x2), NR17		043	1
NR3, NR18 (x4)		3600	1
NR0, 13 (x4)		3592	1

Continuación de la Fig. 22.



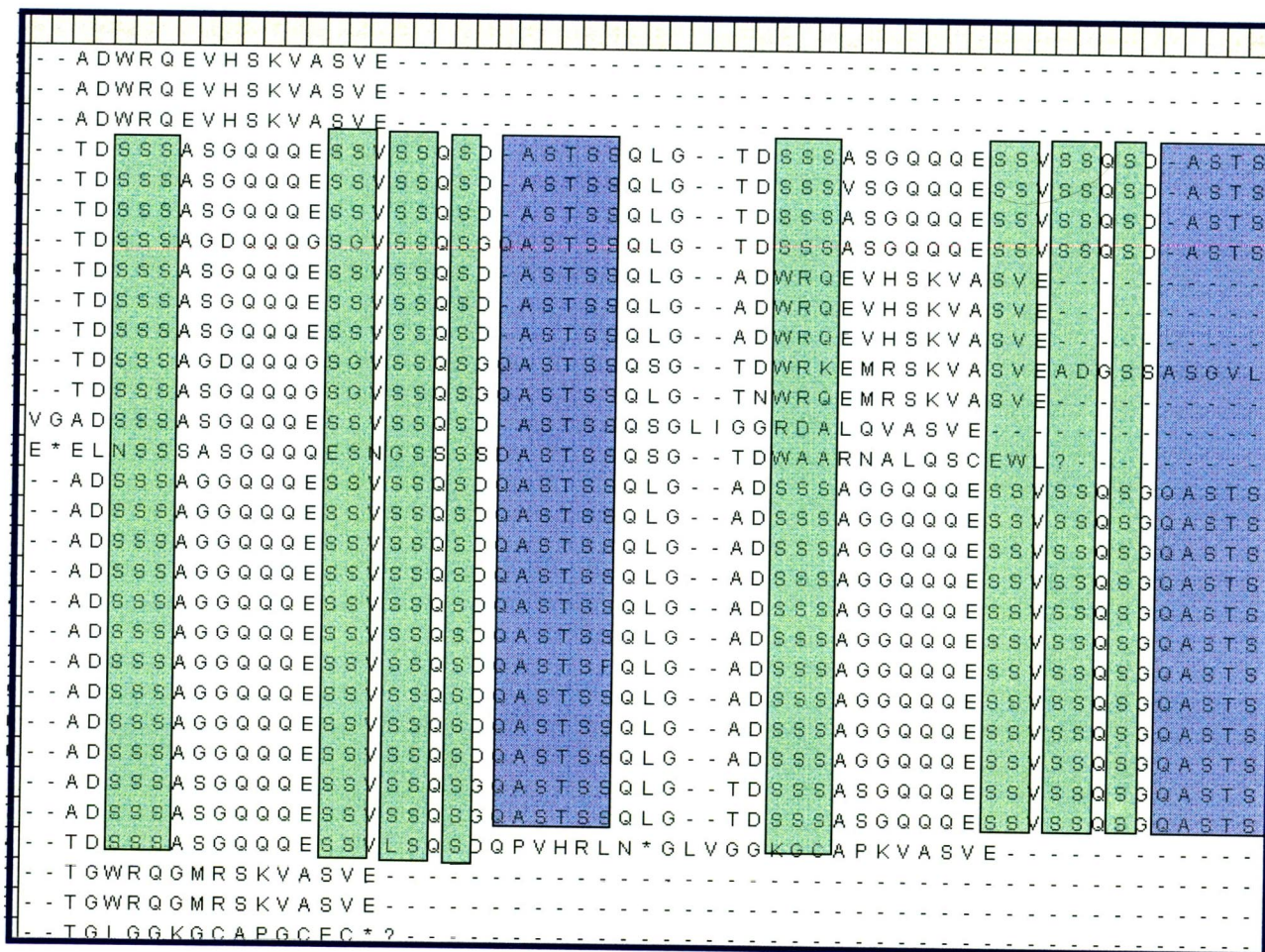


Continuación del alineamiento Fig. 24

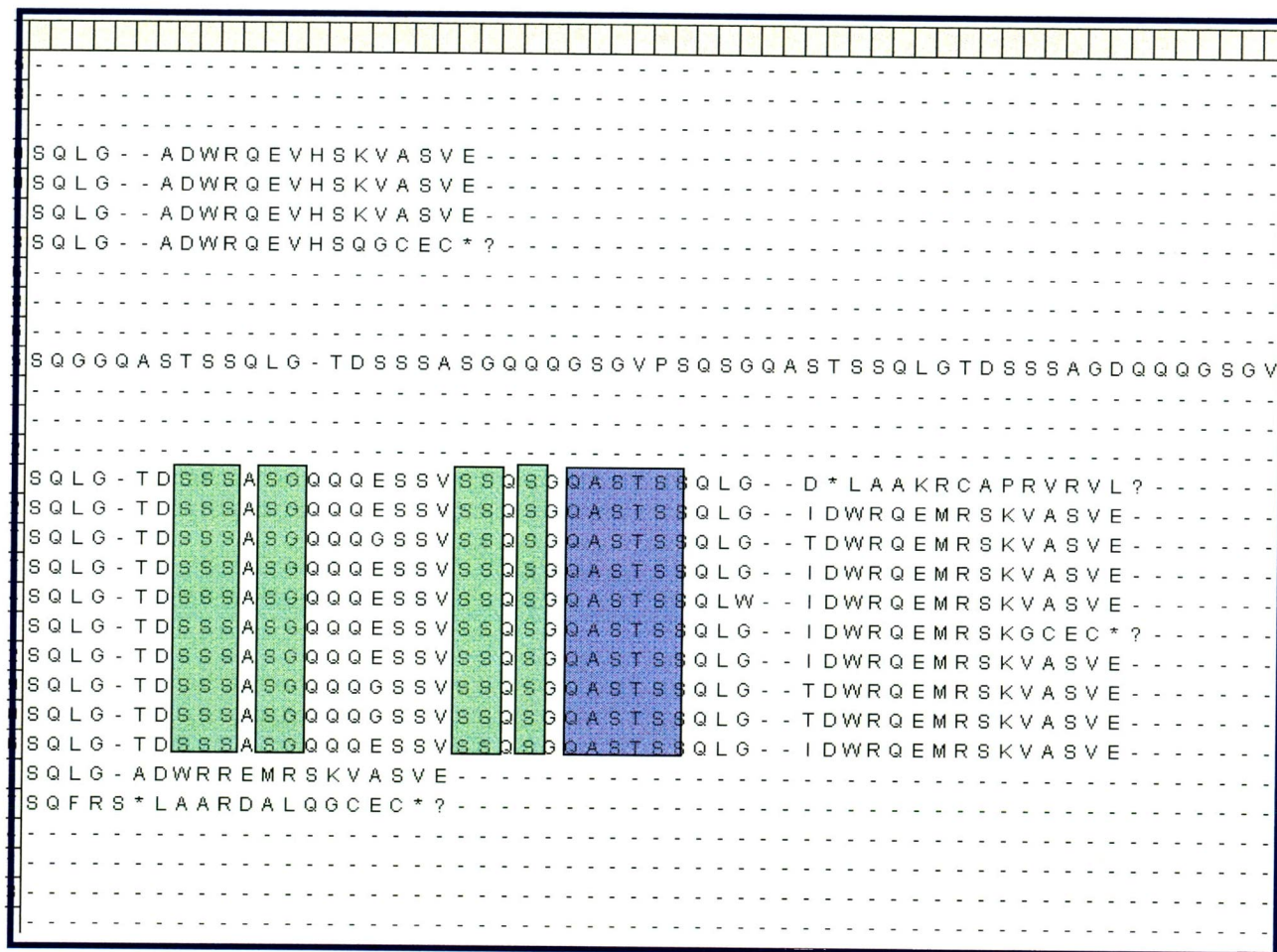
117

174

4517 M1 (117)  
 8536 D (117)  
 3600 M2 (117)  
 3600 U (117)  
 5552 U (117)  
 1572 M1 (117)  
 5591 U (117)  
 5591 D (117)  
 4517 M3 (117)  
 2085 (117)  
 5591 M2 (117)  
 3600 M1 (117)  
 043 M2 (117)  
 1572 D (117)  
 043 U (117)  
 05 A (117)  
 5585 D (117)  
 4517 M2 (117)  
 4517 U (117)  
 1562 U (117)  
 1527 M2 (117)  
 1538 (117)  
 1527 U (117)  
 4517 M2 (117)  
 049 M1 (117)  
 8536 U (117)  
 3592 M2 (117)  
 1572 U (117)  
 1572 D (117)  
 043 D (117)



4517 M1 (175)  
 8536 D (175)  
 3600M2 (175)  
 3600 U (175)  
 5552 U (175)  
 1572 M1 (175)  
 5591 U (175)  
 5591 D (175)  
 4517 M3 (175)  
 2085 (175)  
 5591 M2 (175)  
 3600 M1 (175)  
 043 M2 (175)  
 1572 D (175)  
 043 U (175)  
 05 A (175)  
 5585 D (175)  
 4517 M2 (175)  
 4517 U (175)  
 1562 U (175)  
 1527 M2 (175)  
 1538 (175)  
 1527 U (175)  
 4517 M2 (175)  
 049 M1 (175)  
 8536 U (175)  
 3592 M2 (175)  
 1572 U (175)  
 1572 D (175)  
 043 D (175)



## DETERMINACIÓN DE SI LA SUPERINFECCIÓN ES UN EVENTO QUE PUEDE PRESENTARSE EN MUESTRAS DE CAMPO.

- **Estimación del por ciento de superinfección**

Del total de animales correspondientes al segundo muestreo (Noviembre 2006) que se identificaron como positivos a la infección con *A. marginale* 104 animales; se determinó el patrón de bandeo por la amplificación del gen *msp1 $\alpha$* , identificando en el rancho “La Joya” que el 57% de los animales se encontraban infectados con más de una cepa de *A. marginale*, y del rancho “El Verdineño” el 87.7%. El resto solamente amplificó una banda.

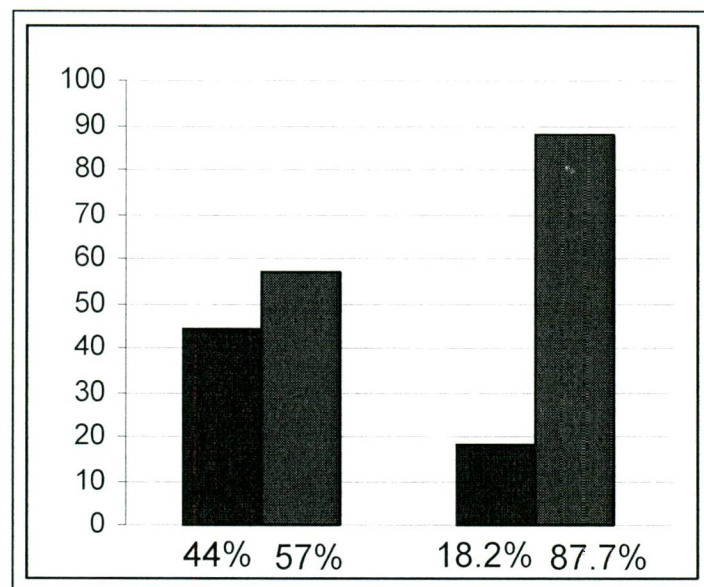


Fig. 24. % de superinfección en los ranchos analizados. En color azul se representa a los animales infectados con un solo genotipo, en rojo los que se encontraron con más de un genotipo.

## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La Anaplasmosis bovina es una enfermedad que se puede transmitir con facilidad entre los bovinos que se encuentran dentro de un hato, sobre todo cuando las condiciones de manejo de los animales no son las adecuadas; de acuerdo a lo reportado por Rodríguez–Vivas en el año 2004. La comparación entre las condiciones de manejo de los ranchos, de los cuales se obtuvieron las muestras con las que se desarrolló esta investigación confirma lo mencionado anteriormente. En el caso de uno de ellos “La Joya” en el que se proporcionan baños acaricidas y se llevan a cabo fumigaciones regulares con la finalidad de controlar a los vectores biológicos y mecánicos, se encontró un número menor de animales infectados con *A. marginale*. En contraste con en el rancho “El Verdineño” en el cual no se toma ningún tipo de medida de manejo con los animales, y en el que constantemente hay entrada de bovinos al hato.

Los resultados obtenidos de cada uno de los métodos empleados para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina (cELISA y PCR) se compararon con una tabla de contingencia 2 x 2 (anteriormente mostrada) con la cual se obtuvo un valor de  $\kappa=0.77$  lo que indica que ambas metodologías son adecuadas para identificar la presencia de *A. marginale*. Previamente se encontraron que el diagnóstico realizado con estas metodologías no mostró diferencia alguna para llevar a cabo la identificación de la infección mencionando que ambas técnicas son “excelentes” para este tipo de estudios (Torini y col., 1998), no obstante, en nuestro trabajo algunas muestras se identificaron como positivas a la infección mediante PCR y no así mediante el cELISA, lo que podría deberse a que la cantidad de anticuerpos presentes en las muestras en el momento en el que se tomaron éstas, no fue suficiente para la detección serológica, lo que podría estar ocasionado posiblemente porque la muestra haya sido tomada en el momento en que decae el pico de la rickettsemia, característico de la fase crónica de la enfermedad, (Palmer y col., 2000) en los que la cantidad del microorganismo

disminuye dramáticamente, ocasionando una variación en la cantidad de anticuerpos presentes.

- **Genotipificación de aislados de *A. marginale* de animales de campo.**

Palmer y col., en 2001 reportaron las características fundamentales de la secuencia de aminoácidos del extremo aminoterminal de la proteína MSP1a y describieron por primera vez, la existencia de repetidos que varían en número y tamaño pero conservan algunas características fundamentales, que permite genotipificar los aislados de *A. marginale*. Al analizar el alineamiento de las secuencias de aminoácidos obtenidos en nuestro trabajo, se observa que coincide con lo descrito en la literatura (Palmer y col., 2001, García-García y col., 2004). De forma general, se conservan las características fundamentales de los repetidos, en cuanto a la longitud, a las regiones ricas en Ser/Thr, a los sitios de glicosilación y a la presencia del epítotope que reconoce el anticuerpo monoclonal ANA15D.

La evidencia de que los genotipos de *msp1* y secuenciación, son genotipos verdaderos, se encuentra apoyada por el hecho de que las secuencias difieren solamente en el número y secuencia de los repetidos pero sin cambio en el marco abierto de lectura y además se conserva la secuencia de los extremos 3' y 5' de la región analizada en todas las muestras. Por otra parte varias muestras fueron reextraídas, reamplificadas y resecuenciadas con resultados idénticos.

De la Fuente y col., han descrito numerosos repetidos y a la vez diversos genotipos en aislados de *A. marginale* estudiados en diferentes regiones geográficas (de la Fuente y col., 2007), lo que ha evidenciado la diversidad de cepas en el mundo. Nuestros resultados evidencian que esta diversidad de repetidos y genotipos también puede estar presentes en un mismo sitio

geográfico, lo que no ha sido aún reportado, y que podría deberse al movimiento del ganado bovino (de la Fuente y col., 2007).

Es importante destacar que, en las muestras analizadas en nuestro trabajo, se identificaron repetidos nuevos que difieren de uno a tres aminoácidos con los descritos anteriormente, lo que concuerda con las diferencias en los repetidos reportados por de la Fuente y col., 2007. La existencia de estos repetidos nuevos trae como consecuencia genotipos no reportados aún, éstos se deben en algunos casos a la presencia de dichos repetidos, a la combinación de repetidos conocidos con los nuevos encontrados y al número diferente de repetidos encontrados.

Por la gran diversidad en los repetidos obtenidos y el arreglo de éstos en los genotipos, nos es imposible hipotetizar que estos genotipos puedan haber surgido de un precursor común, pero podría sugerirse que esta diversidad es producto de eventos de transmisión separados, por la introducción de los genotipos en el ganado, que después es mantenido durante el mismo proceso de transmisión. A pesar de que uno de los genotipos *msp1* los animales analizados, no contamos con suficiente evidencia experimental para determinar si el genotipo mas frecuente en nuestros resultados, es el más transmisible.

La generación de la diversidad de los genotipos en animales persistentemente infectados, ha sido explicada por Palmer y col (2001); ellos plantean que los genotipos podrían aparecer durante los ciclos de rickettsemia que caracteriza a la fase de la persistencia o alternativamente durante la replicación en el intestino y glándulas salivales de la garrapata trasmisora.

- **Superinfección en animales de campo crónicamente infectados con *A. marginale*.**

En 2004 Palmer y col., reportaron por primera vez la presencia de más de un genotipo en un mismo animal, es decir la superinfección. Este tipo de evento se presenta al encontrarse dos genotipos que difieren en los productos génicos de *msh2* que son expresados; que le permiten a la cepa del patógeno evadir la respuesta inmune establecida contra la primera cepa que infectó al animal. Estudios posteriores relacionados con el establecimiento de la superinfección establecen que el hecho de que exista diferencia en un solo alelo en los pseudogenes de *msh2* del microorganismo le conferirá características suficientes para establecerse dentro del hospedero evadiendo la respuesta inmune (Futse y col., 2008).

Al analizar nuestros resultados, de la identificación de los genotipos de cada una de las muestras secuenciadas, podemos aseverar que algunos animales de los ranchos estudiados, se encuentran infectados con más de un genotipo.

Considerando los resultados obtenidos de la secuenciación y correlacionándolos con los patrones de bandas amplificadas que se observaron en los PCRs y nPCRs de las muestras, se determinó que el hecho de que existiera la amplificación de más de una banda del gen *msh1 $\alpha$*  podría indicar la presencia de más de un genotipo estableciendo la infección en el bovino analizado, y que la presencia de un solo amplicón podría correlacionarse a un solo genotipo presente en el animal analizado.

Inicialmente, cuando se obtuvo más de un amplicón en el PCR de se realizaron varios experimentos con diferentes controles, para verificar que la presencia de más de un amplicón, no se debía a la falta de optimización de las condiciones de PCR sino más bien a la presencia de varios genotipos en el mismo

animal. Dos de las muestras con patrones de amplificación conocidas (una que presentaba un solo amplicón vs. una con más de un amplicón) fueron sometidas a un gradiente de temperatura de alineamiento en el PCR. El resultado obtenido del gradiente nos indicó que la amplificación de más de una banda no era efecto del PCR lo que nos permitió poder predecir, en las muestras que no se secuenciaron, la existencia de más de un genotipo teniendo en cuenta el patrón de bandeo de la reacción de PCR.

El análisis del patrón de bandeo del PCR de *msp1* nos permitió hacer una estimación del porcentaje de superinfección del total de muestras positivas a *A. marginale* en los dos ranchos estudiados. El rancho con un mayor porcentaje de los animales con más de un genotipo es “El Verdineño” que a su vez es el rancho donde el número de animales infectados con *A. marginale* es mayor, podríamos sugerir que las condiciones sanitarias y de manejo de este rancho favorece la superinfección y que podría estar dado por la diversidad en la expresión de las variantes del gen *msp2* de los aislados circulantes, aunque para poder aseverar lo anterior tendríamos que analizar la expresión de estas variantes.

La superinfección se había descrito como un fenómeno raro para *A. marginale* hasta el presente estudio, ya que solo se había identificado este fenómeno en pocos animales en zonas de prevalencia alta en la infección y transmisión (Palmer y col., 2001; Palmer y col; 2004). Los resultados obtenidos en el presente trabajo, son una aportación a la investigación de *A. marginale* en cuanto al comportamiento del microorganismo en condiciones de campo, en especial cuando existe un tránsito constante de animales (egreso de animales nuevos al hato) y cuando las condiciones de manejo de los mismos no resultan ser del todo adecuadas.

Aunque el significado epidemiológico de la superinfección aún es poco comprensible, los resultados obtenidos justifican que habrá que desarrollar investigaciones más amplias y profundas al respecto.

## IX . CONLCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en los experimentos realizado podemos concluir que las condiciones de manejo del ganado bovino son determinantes para la distribución y transmisión de la enfermedad así como la presencia de los diferentes genotipos de *A. marginale* identificados.

Además de que se determino que los métodos empleados para llevar a cabo el diagnóstico de la enfermedad son eficientes para la detección de la misma.

Algunos de los repetidos identificados en las muestras, difieren de los ya reportados en las bases de datos, por lo que se puede pensar que se tratan de genotipos que pueden ser específicos del país y por lo tanto estos pudiesen estar confiriendo características específicas a las cepas analizadas para permitir el establecimiento de infecciones con mayor eficiencia o bien determinar por medio de que vía se lleva a cabo su transmisión, recordando que cada uno de los repetidos están involucrados en procesos de adhesión e infección a las células de sus hospederos.

Por otra parte, de acuerdo a los resultados obtenidos, el evento de la superinfección es capaz de establecerse, las condiciones de manejo de los animales son extremadamente relevantes para que se puedan establecer este tipo de infección de los animales con múltiples genotipos del parásito. Sin embargo, aún se desconoce como es que se pueden establecer este tipo de eventos en los hospederos.

## X. PERSPECTIVAS

- Estudio longitudinal de los genotipos de *Anaplasma marginale* que permitan conocer la dinámica de la infección del microorganismo en poblaciones en condiciones de campo e identificar los genotipos evolutivamente dominantes.
- Analizar el repertorio de variantes de *msp2* en los genotipos previamente identificados.
- Genómica comparativa entre los genotipos dominantes y no dominantes.

# { XE "Anexo" \b }Anexo.

## Ejemplo de los resultados obtenidos del lector de ELISA y diagnóstico de la enfermedad.

Muestras positivas y negativas a Anaplasmosis bovina.

ID del pozo	Pozo	M 630	Nb	Promedio	Des Std	CV (%)	Prom. X100	Prom.x100/OD C -	% inh.	# an
SPL1	B1	0.368	2	0.39	0.034	8.66	39.2	34.35	65.65	1A
	B2	0.416								
SPL2	C1	0.823	2	0.82	0.001	0.09	82.3	72.12	27.88	3A
	C2	0.824								
SPL3	D1	0.217	2	0.27	0.074	27.6	27	23.66	76.34	5A
	D2	0.322								
SPL4	E1	0.954	2	0.93	0.035	3.73	92.9	81.41	18.59	6A
	E2	0.905								
SPL5	F1	0.498	2	0.53	0.042	7.91	52.8	46.27	53.73	10A
	F2	0.557								
SPL6	G1	0.56	2	0.56	0.004	0.63	56.3	49.34	50.66	13A
	G2	0.565								
SPL7	H1	0.156	2	0.16	0.001	0.9	15.7	13.75	86.25	14A
	H2	0.158								
SPL8	A3	0.787	2	0.8	0.012	1.51	79.6	69.76	30.24	17A
	A4	0.804								
SPL9	B3	0.537	2	0.6	0.092	15.3	60.2	57.76	42.24	18A
	B4	0.667								
SPL10	C3	0.798	2	0.84	0.061	7.23	84.1	73.7	26.3	19A
	C4	0.884								
SPL11	D3	0.898	2	0.88	0.021	2.32	88.3	77.38	22.62	21A
	D4	0.869								
SPL12	E3	0.825	2	0.8	0.034	4.24	80.1	70.2	29.8	25A
	E4	0.777								

Las muestras se analizan en el lector de ELISA a una longitud de onda de 630 nm, posteriormente se realizan los siguientes cálculos para determinar si la muestra es positiva o no a la infección con *A. marginale*.

Considerando que el promedio de la O.D. del control negativo debe estar en un rango de 0.40 a 2.10. El por ciento de inhibición del control positivo debe ser

### Parámetros de adecuación para el índice kappa.

Valores de Kappa

Valoración del Índice Kappa	
Valor de k	Fuerza de la concordancia
< 0.20	Pobre
0.21 – 0.40	Débil
0.41 – 0.60	Moderada
0.61 – 0.80	Buena
0.81 – 1.00	Muy buena

Tablas de información de cada uno de los animales analizados en este trabajo (Correspondientes al segundo muestreo)

Rancho “El Verdineño”

No. Muestra	cELISA	Extracción ADN	PCR <i>msp5</i>	nPCR	PCR <i>msp1a</i>	Bandas cortadas	Clonadas	Minipreps	Secuenciación
39	-	sí		sí	sí				
43	+	sí	sí		sí	5	sí	sí	sí
49		sí	sí		sí	4	sí	sí	sí
50	+	sí	sí		sí				
62	+	sí		sí	sí				
64	+	sí	sí		sí				
1510	+	sí	sí		sí				
1518	+	sí	sí		sí				
1520	+	sí		sí	sí				
1527	+	sí	sí		sí	4	sí	sí	sí
1530	+	sí	sí	sí	sí				
1538	+	sí	sí		sí	1	sí	sí	sí
1545	+	sí		sí	sí				
1546	+	sí	sí		sí				
1549	+	sí	sí		sí				
1559	+	sí		sí	sí				
1560	+	sí		sí	sí				
1562	+	sí	sí		sí	4	sí	sí	sí
1569	+	sí	sí		sí				
1572	+	sí	sí		sí	3	sí	sí	sí
1576	+	sí	sí		sí				
1588	+	sí		sí	sí				
2075	+	sí		sí	sí				

2085	+	sí	sí	sí	4	sí	sí	sí
2087	+	sí	sí	sí				
2088	+	sí	sí	sí				
2089	+	sí	sí	sí				
3518	+	sí	sí	sí				
3533	+	sí	sí	sí	1	sí	sí	sí
3538	+	sí	sí	sí				
3539	+	sí	sí	sí				
3540	+	sí	sí	sí				
3571	+	sí	sí	sí				
3579	+	sí	sí	sí	2	sí	sí	sí
3582	+	sí	sí	sí				
3584	+	sí	sí	sí				
3590	+	sí	sí	sí	2	sí	sí	
3592	+	sí	sí	sí	5	sí	sí	sí
3597	+	sí	sí	sí				sí
3598	+	sí	sí	sí	5	sí	sí	
3600	+	sí	sí	sí	4	sí	sí	sí
3603 A	+	sí		sí				
3607	+	sí		sí				
3611	+	sí	sí	sí				
3615	+	sí	sí	sí	1	sí	sí	sí
3616	+	sí	sí	sí				sí
4503	+	sí	sí	sí				
4504	+	sí	sí	sí				
4506	+	sí	sí	sí				
4507	+	sí	sí	sí				
4509	+	sí	sí	sí				
4511	+	sí	sí	sí				
4517	+	sí	sí	sí	5	sí	sí	sí
4519	+	sí		sí				sí
4523	+	sí	sí	sí				

4525	+	sí	sí		sí				
4526	+	sí	sí		sí				
4531	+	sí	sí		sí				
4534	+	sí		sí	sí				
4536	+	sí	sí		sí	6	sí		
4538	+	sí	sí		sí				
4544	+	sí	sí		sí				
4548	+	sí	sí		sí				
4580	+	sí	sí		sí				
4591	+	sí	sí		sí				
4592	+	sí	sí		sí				
5503	+	sí	sí		sí				
5511	+	sí	sí		sí		sí		
5514	+	sí	sí		sí		sí		
5519	+	sí		sí	sí				
5522	+	sí	sí		sí				
5545	+	sí		sí	sí				
5546	+	sí	sí		sí				
5552	+	sí	sí		sí	4	sí	sí	sí
5585	+	sí	sí		sí	3	sí	sí	sí
5591	+	sí	sí		sí	6	sí	sí	sí
8504	+	sí	sí		sí				
8513	+	sí	sí		sí				
8519	+	sí	sí		sí				
8521	+	sí	sí		sí				
8536	+	sí	sí		sí	2	sí	sí	sí
8601	+	sí	sí		sí				
8618	+	sí	sí		sí				

Rancho "La Joya"

Muestras AMARILLAS

No. Muestra	cELISA	Extracción ADN	PCR <i>msp5</i>	nPCR	PCR <i>msp1a</i>	Bandas cortadas	Clonación	Minipreps	Secuenciación
1A	+	sí	sí		sí				
5A	+	sí	sí	sí	sí	1	sí	sí	sí
17A	-	sí	sí	sí	sí	2	sí	sí	sí
18A	-	sí							
19A	-	sí	sí	sí	sí				
21A	-	sí							
25A	-	sí							
30A	-	sí							
37A	-	sí							
39A	-	sí							
42A	+	sí	sí	sí	sí				
44A	-	sí							
48A	-	sí							
50A	-	sí							
60A	-	sí							
71A	-	sí							
76A	-	sí							
78A	-	sí							
79A	-	sí							
80A	-	sí							
81A	-	sí							
83A	-	sí							

Muestras NARANJAS

No. Muestra	cELISA	extracción ADN	PCR <i>msp5</i>	nPCR	PCR <i>msp1a</i>	Bandas cortadas	Clonación	Minipreps	Secuenciación
1N	+	sí	sí		sí	3			
9N	+	sí	sí	sí					
12N	+	sí	sí		sí	3			
15N	-	sí	sí		sí	3			
21N	-	sí							
33N	-	sí							
40N	+	sí	sí	sí	sí				
41N	+	sí							
42N	-	sí							
43N	-	sí							
46N	-	sí							
47N	-	sí							
48N	-	sí							
50N	+	sí							
52N	-	sí							
54N	+	sí	sí	sí	sí	1	sí	sí	sí
55N	-	sí							
56N	-	sí							
60N	-	sí							
61N	-	sí							
62N	+	sí	sí	sí	sí				
65N	-	sí							
66N	-	sí							
68N	+	sí	sí	sí	sí	4			
75N	-	sí							
79N	-	sí							
80N	-	sí							
81N	-	sí							

83N	-	sí							
90N	-	sí							
95N	-	sí							
97N	-	sí							
100N	-	sí							

Muestras ROJAS

No. Muestra	cELISA	extracción ADN	PCR <i>msp5</i>	nPCR	PCR <i>msp1a</i>	Bandas cortadas	Clonación	Minipreps	Secuenciación
09R	-	sí							
12R	-	sí	sí		sí				
13R	-	sí							
14R	-	sí	sí	sí	sí				
17R	-	sí							
18R	-	sí	sí		sí				
19R	-	sí							
20R	-	sí							
21R	-	sí							
23R	-	sí							
24R	-	sí	sí	sí	sí				
94R	-	sí	sí						
95R	-	sí							
104R	-	sí	sí						
105R	-	sí		sí	sí				
107R	-	sí							
109R	-	sí							
112R	-	sí	sí	sí	sí				
114R	-	sí	sí		sí				
118R	-	sí	sí		sí				

Muestras BLANCAS

No. Muestras	cELISA	extracción ADN	PCR <i>msp5</i>	nPCR	PCR <i>msp1a</i>	Bandas cortadas	Clonación	Minipreps	Secuenciación
6B	+	sí	sí	sí	sí	1	sí	sí	sí
10B	-	sí							
27B	-	sí							
32B	-	sí							
35B	+	sí							
38B	-	sí	sí	sí	sí				
39B	-	sí							
43B	-	sí							

Muestras VERDES

No. Muestras	cELISA	Extracción ADN	PCR <i>msp5</i>	nPCR	PCR <i>msp1a</i>	Bandas cortadas	Clonación	Minipreps	Secuenciación
01V	-	sí							
02V	+	sí	sí	sí	sí				
06V	-	sí							
07V	-	sí							
09V	-	sí							
10V	+	sí	sí	sí	sí				

Tablas de resultados de la genotipificación de las muestras seleccionadas.

No Animal	Clonas sec	bpAmp.	Sec. de rep.	No. repetidos	genotipo	
O43	D1	703	TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	4 (29aa)	13	13
	D1-07		TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	4 (29aa)	13	13
M2		766	ADSSSAGGQQQESSVSSQSGASTSSQLG	1 (28)	NR1	
			TDSSSAGDQQQESSVSSQSDASTSSQLG	2 (28)	NR16	
			ADSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQSG	1 (28)	NR2	
			TDSSSAGDQQQESSVLSPSGHASTSSQLG	1 (29)	NR17	
M2-07			ADSSSAGGQQQESSVSSQSGASTSSQLG	1 (28)	NR1	
			TDSSSAGDQQQESSVSSQSDASTSSQLG	2 (28)	NR16	
			TDSSSAGDQQQESSVLSPSGHASTSSQLG	1 (29)	NR17	
U1		790	ADSSSAGGQQQESIVSSQSDQASTSSQLG	1 (29)	T	TBCNBCF
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2 (29)	C	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1 (29)	N	
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	2 (29)	B	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	1 (29)	F	
U1 (Placa 2)			AGSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1 (29)	T	TBCNBCF
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	2 (29)	B	
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2 (29)	C	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1 (29)	N	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	1 (29)	F	
3600	M2.1	399	ADSSSASGVLSQSGQASTSSQLG	1 (23)		
			TDSSSAGDQQQGSGVSSQSGQASTSSQLG	2 (29)		
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	1 (28)		
	M2.2(Placa 4)		TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	4(29)	13	13
	M2.2 (Placa 2)		TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQL	1(29)	13	13
U1		570	ADSSSASGVLSQSGQASTSSQLG	1 (23)		
			TDSSSAGDQQQGSGVSSQSGQASTSSQLG	3 (29)		
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	2 (28)		
U			TDSSSAGDQQQGSGVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	β	ββΓΓ
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	2(28)	Γ	

	U3 (Placa 4)		ADSSSASGVLSQSGQASTSSQLG	1(23)	
			TDSSSAGDQQQGGSGVSSQSGQASTSSQLG	3(29)	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	2(28)	
	U4 (Placa 4)		TDSSSAGDQQQGGSGVSSQSGQASTSSQL	1(29)	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	2(28)	
	M1.1	489	ADGSSASGVSSQSGQASTSSQLG	1 (23)	NR3
			TDSSSASGQQQGGSGVSSQSGQASTSSQLG	4 (29)	NR18
	M1.5	489	ADGSSASGVSSQSGQASTSSQLG	1 (23)	NR3
			TDSSSASGQQQGGSGVSSQSGQASTSSQLG	4 (29)	NR18
	M1.4		ADGSSASGVSSQSGQASTSSQLG	1(23)	NR3
			TDSSSASGQQQGGSGVSSQSGQASTSSQLG	4(29)	NR18
	D1	351	TDSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1 (29)	
			ADSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1 (29)	NR4
			ADSSSASGQQQESGVLSQSGQASTSSQLG	1 (29)	NR5
	D1		TDSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)	
			ADSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)	NR4
	D		TDSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQL	1(29)	
			ADSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)	NR4
	D5 (Placa 4)		TDSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)	
			ADSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG		NR4
			ADSSSASGQQQESGVLSQSGQASTSSQLG		NR5
5591	U1	574	ADSSSASGVLSQSGQASTSSQLG	1 (23)	
			TDSSSAGDQQQGGSGVSSQSGQASTSSQLG	4 (29)	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	1 (28)	
	U2 (Placa 2)		ADSSSASGVLSQSGQASTSSQLG	1(23)	
			TDSSSAGDQQQGGSGVSSQSGQASTSSQLG	4(29)	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	1(28)	
	M1.1 (Placa 4)		TDSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)	
			ADSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)	NR4
			ADSSSASGQQQESGVLSQSGQASTSSQLG	2(29)	NR5
	M1.2	423	TDSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1 (29)	

			ADSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1 (29)	NR4	
			ADSSSASGQQQESGVLSQSGQASTSSQLG	1 (29)	NR5	
	M1.5 (Placa4)		TDSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)		
			ADSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)	NR4	
			ADSSSASGQQQESGVLSQSGQASTSSQLG	2(29)	NR5	
	M1.2 (Placa3)		TDSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)		
			ADSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQL	1(29)	NR4	
			ADSSSASGQQQESGVLSQSGQASTSSQLG	2(29)	NR5	
	M2.1(Placa3)		ADGSSASGVLSQGGQASTSSQLG	1(23)		$\alpha\beta$ -
			TDSSSAGDQQQGGSGVSSQSGQASTSSQLG	3(29)		
	M2.2 (Placa 4)		ADGSSASGVLSQGGQASTSSQLG	1(23)		
			TDSSSAGDQQQGGSGVSSQSGQASTSSQLG	3(29)		
	D (Placa3)		ADSSSASGVLSRSGQASTSSQLG	1(23)		$\Gamma$
			TDSSSAGDQQQGGSGVSSQSGQASTSSQLG	3(29)		
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	1(28)	$\Gamma$	
8536	U3	722	AGSSSESGQQQESSVLSQSGQASTSSQLG	1 (29)	NR7	
			TDSSSASDQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2 (29)	NR20	
			ADSSSESGQQQESSVLSQSGQASTSSQLG	1 (29)	NR8	
			ADSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQL	1 (28)	NR9	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQFR	1	NR21	
	D1	414	ADSSSASGVLSQSGQASTSSQLG			
	1 (23)			1(23)		
			TDSSSAGDQQQGGSGVSSQSGQASTSSQLG	2 (29)		
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	1 (28)		
	U1 (placa7)		ADSSSASGVLSQSGQASTSSQLG	1(23)		Veracruz)
			TDSSSAGDQQQGGSGVSSQSGQASTSSQL	2 (29)		
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	1 (28)		
	U2 (placa7)		ADSSSASGVLSQSGQASTSSQLG	1(23)		Veracruz)
			TDSSSAGDQQQGGSGVSSQSGQASTSSQL	2 (29)		
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	1 (28)		
	D1 (placa7)		TDSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(28)		
			ADSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)	NR4	
			ADSSSASGQQQESGVLSQSGQASTSSQLG	1(29)	NR5	

	D2(placa 7)		TDSSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(28)		
			ADSSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)	NR4	
			ADSSSSASGQQQESGVLSQSGQASTSSQLG	1(29)	NR5	
	D3 (placa7)		TDSSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(28)		
			ADSSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)	NR4	
			ADSSSSASGQQQESGVLSQSGQASTSSQLG	1(29)	NR5	
3592	D1		TDSSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1 (29)		
			ADSSSSAGGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1 (29)	NR10	
			ADSSSSASGQQQESGVLSQSGQASTSSQLG	1 (29)	NR5	
	D2		TDSSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1 (29)		
			ADSSSSAGGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1 (29)	NR 10	
			ADSSSSASGQQQESGVLSQSGQASTSSQLG	1 (29)	NR 5	
	U1		TDSSSSASGQQQESSVLSQSGQASTSSQLG	1(28)	Israeli-4	
			ADSSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQSG	1 (28)	NR2	
			ADSSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1 (29)	NR4	
			ADSSSSASGQQQESSVLSQSGQASTSSQLG	1 (29)	Israeli3	
	U2		TDSSSSASGQQQESSVLSQSGQASTSSQLG	1(28)	Israeli-4	
			ADSSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQSG	4 (28)	NR2	
			ADSSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	2 (29)	NR4	
			ADSSSSASGQQQESSVLSQSGQASTSSQLG	1(29)	Israeli -3	
	U3		TDSSSSASGQQQESSVLSQSGQASTSSQLG	1(28)	Israeli-4	
			ADSSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQSG	4 (28)	NR2	
			ADSSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	2 (29)	NR4	
			ADSSSSASGQQQESSVLSQSGQASTSSQLG	1(29)	Israeli -3	
	M2.1		TDSSSSASSQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	1 (29)	NR0	
			TDSSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	4 (29)	13	
	M2.2		TDSSSSASSQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	1(29)	NR0	
			TDSSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	4(29)	13	
3615			ADSSSSASGVLSQSGQASTSSQLG	1 (23)		
			TDSSSSAGDQQQGSGVSSQSGQASTSSQLG	2 (29)		
	????		TDSSSSAGDQQQGSGVSSQSGQASTSSS			
1572	M4		TDSSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	4 (29)	13	13,13,13,13
	M1		ADSSSSAGGQQQESSVSSQSGASTSSQLG	1(29)	NR1	

		TDSSSAGDQQQESSVSSQSDASTSSQLG	2(29)	NR16	
		TDSSSAGDQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)	NR24	
		ADSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQSG	1(28)	NR2	
	M3 (Placa 3)	ADSSSASGVLSRSGQASTSSQLG	1(23)	(	
		TDSSSAGDQQQGSGVSSQSGQASTSSQLG	3(29)		
		TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	1(28)	Г	
	M1 (Placa 5)	ADSSSAGGQQQESSVSSQSGASTSSQLG	1(29)	NR1	
		TDSSSAGDQQQESSVSSQSDASTSSQLG	2(29)	NR16	
		TDSSSAGDQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)	NR24	
		ADSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQSG	1(29)	NR2	
	D5	ADSSSASGVLSRSGQASTSSQLG	1(23)		Г
		TDSSSAGDQQQGSGVSSQSGQASTSSQLG	3(29)		
		TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQL	1(28)	Г	
	U1 (placa7)	TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	4 (29)	13	
	U2 (placa7)	TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	4(29)	13	
	D1 (placa7)	TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	4(29)	13	
5552	U3	ADSSSASGVLSQSGQASTSSQLG	1 (23)		
		TDSSSAGDQQQGSGVSSQSGQASTSSQLG	3 (29)		
		TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	2 (28)		
	U4 (Placa4)	TDSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	N	NBCF
		ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	B	
		ADSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQL	1(28)	C	
		TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	1(29)	F	
	D1	ADSSSASGVLSQSGQASTSSQLG	1 (23)		
		TDSSSAGDQQQGSGVSSQSGQASTSSQLG	1 (29)		
		TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	2 (28)		
	D5	ADSSSASGVLSQSGQASTSSQLG	1 (23)		
		TDSSSAGDQQQGSGVSSQSGQASTSSQLG	2 (29)		
		TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	1 (28)		
	D1 (Placa 5)	ADSSSASGVLSQSGQASTSSQLG	1(23)		
		TDSSSAGDQQQGSGVSSQSGQASTSSQLG	1(29)		
		TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	2(28)		

	U1 (placa7)		ADSSSASGVLSQSGQASTSSQLG	1 (23)		
			TDSSSAGDQQQGGSGVSSQSGQASTSSQLG	3 (29)		
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	1 (28)		
5585	D2		TDSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1 (29)		
			ADSSSASGQQQESSVLSPSGQASI(T)SSQLG	1 (29)	NR4	
	D2(2° extr)		TDSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG			
			ADSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG		NR4	
			ADSSSASGQQQESGVLSQSGQASTSSQLG		NR5	
05A			TDSSSASGQQQGGSGVSSQSGQASTSSQLG	3 (29)	NR18	
	10		AGSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1 (29)	T	TQ(B)CNBC
			ADSSSAS(G)GQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	Q (B)	
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2 (29)	C	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1 (29)	N	
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1 (29) (2)	B	
	1		AGSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	T	TBCNBCF
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	2(29)	B	
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	C	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	N	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	1(29)	F	
	8		AGSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	T	TBCNBCF
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	2(29)	B	
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	C	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	N	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	1(29)	F	
2085	U2		ADSSSAGGQQQESSVSSQSGAGTSPQLG	1 (28)	NR14	
			TDSSSAGDQQQESSVSSQSDASTSSQLG	2 (28)	NR16	
	D2		TDSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1 (29)		
			ADSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQFRS	?????	NR15	
	D1 (Placa 5)		TDSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)		
			ADSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)	NR4	
			ADSSSASGQQQESGVLSQSGQASTSSQLG	1(29)	NR5	
	?(Placa 5)		ADSSSAGGQQQESSVSSQSGAG(S)TSSQLG	1(28)	Nr(1)	
			TDSSSAGDQQQESSVSSQSDASTSSQLG	4(28)	NR16	
			TDSSSAGDQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)	NR24	

			ADSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQL(S)G	1(28)	Nr(2)	
1562	M1	481	TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	1(29)	13	13
			TDSSSASGQQQESSILLSQSDQASTSSQLG	1(28)	NR23	
	M1( Placa2)		(TDSSS)ASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	1(23) (1(29))	nr(13)	
			TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	3(29)	13	
	U1		AGSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	T	TBCNBCF
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	2(29)	B	
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	C	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	N	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	1(28)	F	
	U1(Placa 5)		AGSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	T	TBCNBCF
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	2(29)	B	
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	C	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	N	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	1(28)	F	
	U1 (placa 7) 191007		AGSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	T	TBCNBCF
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	2(29)	B	
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	C	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	N	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	1(28)	F	
	U2 (Placa 7) 191007		AGSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	T	TBCNBCF
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	2(29)	B	
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	C	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	N	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	1(28)	F	
06B	1 (placa 6)	161007	TDSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQSG	1(29)	NRa	
			TDSSSASGQQQESSVLSPSGQARTSSQSG	1(29)	NRc	
			TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	1(29)	13	
			TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQSG	1(29)	NRb	
	2 ( placa 6)		TDSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQSG	1(29)	NRa	
			TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	1(29)	13	
			TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQSG	1(29)	NRb	
	3 (placa6)		TDSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQSG	1(29)	NRa	
			TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	1(29)	13	
			TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQSG	1(29)	NRb	

	4 (placa 6)		TDSSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQSG	1(29)	NRa	
			TDSSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	1(29)	13	
			TDSSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQSG	1(29)	NRb	
3533	1		TDSSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	6 (29)	13	13
	3		TDSSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	6 (29)	13	13
3616	U1		TDSSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	6(29)	13	
	U2		AGSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1 (29)	T	TQCNBC,NR(F)
			ADSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	Q	
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	C	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	N	
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	B	
			TDSSSASGQQQG(E)SSVSSQSGQASTSSQLG	1 (29)	Nr (F)	
	U3		TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	1(29)	13	
	M2		TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	6 (29)	13	13
	M3		TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	6(29)	13	13
	M1		TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	6(29)	13	13
	D1		TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	6(29)	13	13
	D2		ADSSSAGGQQQESSVSSQSGASTSSQLG	1(28)	NR1	
			TDSSSAGDQQQESSVSSQSDASTSSQLG	2(28)	NR16	
			TDSSSAGDQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)	NR24	
			ADSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQSG	1(28)	NR2	
	D3		TDSSSASSQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	1(29)	NR0	
			TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	4(29)	13	
049	M1.2		AGSSSESGQQQESSVLSQSGQASTSSQLG	2(29)	NR7	
			TDSSSASDQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	NR20	
			ADSSSESGQQQESSVLSQSGQASTSSQLG	1(29)	NR8	
			ADSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	1(29)	M	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	1(28)	F	
	M2.1 (placa7)		TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSRLG	1 (29)nr	(13)	
			TDSSSASGQQQESSVLSQSDQACTSSQLG	1(29)nr	(13)	
			TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	2 (29)	13	
	M2.2 (placa7)		TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	4(29)	13	

	M2.3 (placa 7)		ADSSSASGVLSR(Q)SGQASTSSQLG	1(23)		
			TDSSSAGDQQQGGSGVSSQSGQASTSSQLG	3(29)		
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	1(28)		
	M1.1		AGSSSESGQQQESSVLSQSGQASTSSQLG	2(29)	NR7	
			TDSSSASDQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	NR20	
			ADSSSESGQQQESSVLSQSGQASTSSQLG	1(29)	NR8	
			ADSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	1(29)	M	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	1(28)	F	
	M1.2		AGSSSESGQQQESSVLSQSGQASTSSQLG	2(29)	NR7	
			TDSSSASDQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	NR20	
			ADSSSESGQQQESSVLSQSGQASTSSQLG	1(29)	NR8	
			ADSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	1(29)	M	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	1(28)	F	
54N	4		ADSSSASGVLSQSGQASTSSQLG	1(23)		
			TDSSSAGDQQQGGSGVSSQSGQASTSSQLG	3(29)		
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	2(28)		
	2 (Placa 4)		ADSSSASGVLSQSGQASTSSQLG	1(23)		
			TDSSSAGDQQQGGSGVSSQSGQASTSSQLG	3(29)		
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	2(28)		
3597	1		TDSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)		
			ADSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)	NR4	
			ADSSSASGQQQESGVLSQSGQASTSSQLG	1(29)	NR5	
	2		TDSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)		
			ADSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)	NR4	
			ADSSSASGQQQESGVLSQSGQASTSSQLG	1(29)	NR5	
	3		TDSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)		
			ADSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)	NR4	
			ADSSSASGQQQESGVLSQSGQASTSSQLG	1(29)	NR5	
4517	M2.3		AGSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	T	T,B,C,(N),B,C,F
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	2(29)	B	
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	C	
			TDSSSASGQQQVSSVSSQSDQASTSPQLG	1(29)	NR(N)	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	1(29)	F	
	M2.1		AGSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	T	T,B,C, (N), B,C,F
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	2(29)	B	

		ADSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	C	
		TDSSSASGQQQVSSVSSQSDQASTSPQLG	1(29)	NR (N)	
		TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQL	1(28)	F	
	M3.1	ADSSSASGVLSQSGQASTSSQLG	1(23)		Γ
		TDSSSAGDQQQGSGVSSQSGQASTSSQLG	3(29)		
		TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	1(28)	Γ	
	M3.2	ADSSSASGVLSQSGQASTSSQLG	1(23)		Γ
		TDSSSAGDQQQGSGVSSQSGQASTSSQLG	3(29)		
		TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	1 (28)	Γ	
	M3.3	ADSSSASGVLSQSGQASTSSQLG	1(23)		Γ
		TDSSSAGDQQQGSGVSSQSGQASTSSQLG	3(29)		
		TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	1 (28)	Γ	
	D1	ADSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG	1(29)	NR4	
		ADSSSASGQQQESGVLSQSGQASTSSQLG	1(29)	NR5	
	M1.2	ADSSSASGVLSQSGQASTSSQLG	1(23)		
		TDSSSAGDQQQGSGVSSQSGQASTSSQLG	1(29)		
		TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	2(28)		
	U2	AGSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	T	TBCNBCF
		ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	2(29)	B	
		ADSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	C	
		TDSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	N	
		TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQL	1(28)	F	
	U3	TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	4(29)	13	13
	U2 (placa 7)	AGSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	T	TBCNBCF
		ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	2(29)	B	
		ADSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	C	
		TDSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	N	
		TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	1(28)	F	
	U3 (placa 7)	TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	4(29)	13	
	M1.2 (placa7)	ADSSSASGVLSQSGQASTSSQLG	1(23)		
		TDSSSAGDQQQGSGVSSQSGQASTSSQLG	1(29)		
		TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	2(28)		
	M2.1 (placa7)	AGSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	T	TBCNBCF
		ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	2(29)	B	
		ADSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	C	

		TDSSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	N	
		TDSSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	1(28)	F	
	D1 (placa7)	TDSSSSASGQQQESGVLSPSGQASTSSQLG	1 (29)	(	
		ADSSSSASGQQQESSVLSVPSGQASTSSQLG	1(29)	NR4 (28)	
		ADSSSSASGQQQESGVLQSGQASTSSQLG	1(29)	NR5 (29)	
1538	1	AGSSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	T	T,Q,C,N,B,C, NR
		ADSSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	Q	
		ADSSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	C	
		TDSSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	N	
		ADSSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	B	
	4	TDSSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	6(29)	13	
	1 (placa7)	AGSSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1 (29)	T	TQCNBC, nr
		ADSSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1 (29)	Q	
		ADSSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	C	
		TDSSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1 (28)	N	
		ADSSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1 (29)	B	
		TDSSSSASGQQQGSSVSSQSGQASTSSQLG	1 (29)	NR	
	2 ( placa 7) 191007	AGSSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1 (29)	T	TQCNBC, nr
		ADSSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1 (29)	Q	
		ADSSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	C	
		TDSSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1 (28)	N	
		ADSSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1 (29)	B	
		TDSSSSASGQQQGSSVSSQSGQASTSSQLG	1 (29)	NR	
1527	U1	AGSSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	T	TBCNBCF
		ADSSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	2(29)	B	
		ADSSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	C	
		TDSSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	N	
		TDSSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	1(29)	F	
	U2	AGSSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	T	TQCNBCF
		ADSSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	Q	
		ADSSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	C	
		TDSSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	N	
		ADSSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	B	
		TDSSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	1(29)	F	
	U3	AGSSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	T	TQCNBCF
		ADSSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	Q	
		ADSSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	C	

		TDSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	N	
		ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	B	
		TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	1(29)	F	
	U4 (placa7)	AGSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	T	TQCNBC, NR
	191007	ADSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	Q	
		ADSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	C	
		TDSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	N	
		ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	B	
		TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	nr		
	M1.1	ADSSSASGVLSQSGQASTSSQLG	1(23)		
		TDSSSAGDQQQGSGVSSQSGQASTSSQLG	3(29)		
		TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	2(28)		
	M1.2	AGSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	T	TQCNBC,(F)
		ADSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	Q	
		ADSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	C	
		TDSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	N	
		ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	B	
		TDSSSASGQQQ(E)SSVSSQSGQASTSSQLG	1(28)	NR(F)	
	M2.1	AGSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	T	T,B,C, N, (B), C,F
		ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	B	
		ADSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	C	
		TDSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	N	
		ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSF(S)QLG	1(29)	NR	
		TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQL	1(29)	F	
4519	U1 (placa6)	ADSSSASGVLSRSGQASTSSQLG	1(23)	NR ( )	
		TDSSSAGDQQQGSGVSSQSGQASTSSQLG	3(29)		
		TDSSSASGQQQESSVSSQSDASTSSQLG	1(28)		
	U2(placa6)	TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	6(29)	13	
	U3(placa6)	TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	6(29)	13	
	D1(placa6)	AGSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1 (29)	T	TBCNBCF
		ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	2(29)	B	
		ADSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	C	
		TDSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	N	
		TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	1(29)	F	
	D2(placa6)	TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	6 (29)	13	13

	D3(placa6)		TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	6 (29)	13	13
3579	1		AGSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	T	TQCNBC
			ADSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	Q	
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	2(29)	C	
			TDSSSASGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	N	
			ADSSSAGGQQQESSVSSQSDQASTSSQLG	1(29)	B	
	2		TDSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG	6(29)	13	

## BIBLIOGRAFÍA

- Alleman AR, Palmer GH, McGuire TC, McElwain TF, Perryman LE, Barbet AF (1997) *Anaplasma marginale* Major surface protein 3 is encoded by a polymorphic, multigen family. *Infect Immun* 65: 156-163.
- Allred DR, McGuire TC, Palmer GH, Leib SR, Harkins TM, McElwain TF, Barbet AF (1990) Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. *Proc Natl Acad Sci* 87: 3220-3224.
- Barbet AF, Palmer Gh, Myler PJ, McGuire TC (1987) Characterization of an Immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning expression of the gene coding and expression of the gene for polypeptide Am105L. *Infect and immun* 55: 2428-2435.
- Barbet AF, Lundgren A, Yi J, Rurangirwa FR, Palmer GH (2000) Antigenic variation of *Anaplasma marginale* by expression of MSP2 mosaics. *Infect Immun* 68:6133-6138.
- Blanc G, Ogata H, Robert C, Audic S, Suhre K, Vestris G, Claverie JM, Raoult D (2007) Reductive genome evolution from the mother of Rickettsia. *PLoS Genet* 3:e14.
- Brayton KA, Knowles DP, McGuire TC, Palmer GH (2001) Efficient use of a small genome to generate antigenic diversity in tick-borne ehrlichial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4130-4135.
- Brayton KA, Palmer GH, Lundgren A, Yi J, Barbet AF (2002) Antigenic variation of *Anaplasma marginale* msp2 occurs by combinatorial gene conversion. *Mol Microbiol* 43:1151-1159.
- Reayton KA, meeus PFM, Barbet AF, Palmer GH (2003) Simultaneous variation of the immunodominant outer membrane proteins, MSP2 and MSP3, during *Anaplasma marginale* persistence in vivo. *infect Immun* 71:6627-6632.
- Brayton KA, Kappmeyer LS, Herndon DR, Dark MJ, Tibbals DL, Palmer GH, McGuire TC, Knowles DP, Jr. (2005) Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:844-849.
- Brayton KA, Palmer GH, Brown WC (2006) Genomic and proteomic approaches to vaccine candidate identification for *Anaplasma marginale*. *Expert Rev Vaccines* 5:95-101.

- Brown WC, McGuire TC, Mwangi W, Kegerreis KA, Macmillan H, Lewin HA, Palmer GH (2002) Major histocompatibility complex class II DR-restricted memory CD4(+) T lymphocytes recognize conserved immunodominant epitopes of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a. *Infect Immun* 70:5521-5532.
- Camacho Nuez Minerva, 1999 Estudios de algunos aspectos moleculares de *Anaplasma marginale*. Tesis de la Doctorado en Genetica y Biología Molecular.
- Cringoli G, Otranto D, Testini G, Buono V, Di Giulio G, Traversa D, Lia R, Rinaldi L, Veneziano V, Puccini V (2002) Epidemiology of bovine tick-borne diseases in southern Italy. *Vet Res* 33:421-428.
- de La Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Rodriguez SD, Garcia MA, Kocan KM (2001) Evolution and function of tandem repeats in the major surface protein 1a of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Anim Health Res Rev* 2:163-173.
- de la Fuente J, Kocan KM (2001) Expression os *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants in persistently infected ticks. *Infect Immun* 69: 5151-5156
- de la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Kocan KM (2003) Characterization of thr functional domain of major surface protein 1a involve in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* ti host cells. *Vet Microbiol* 91: 265-283.
- de la Fuente J, Blouin EF, Kocan KM (2003a) Infection exclusion of the rickettsial pathogen *Anaplasma marginale* in the tick vector *Dermacentor variabilis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 10:182-184.
- de La Fuente J, Golsteyn Thomas EJ, Van den Bussche RA, Hamilton RG, Tanaka EE, Druhan SE, Kocan KM (2003b) Characterization of *Anaplasma marginale* isolated from North American bison. *Appl Environ Microbiol* 69:5001-5005.
- de la Fuente J, Van Den Bussche RA, Prado TM, Kocan KM (2003) *Anaplasma marginale msp1 $\alpha$*  genotypes evolved under positive selection pressure but are not morkers for geographic isolates. *J Clin Microbiol* 41:1609-1616.

- de la fuente J, Garcia-Garcia JC, Barbet AF, Blouin EF, Kocan KM (2004) Adhesion of outer membrane proteins containing tandem repeats of *Anaplasma marginale* and *Ehrlichia* species (Rickettsiales: Anaplasmataceae) to tick cells. *Vet Microbiol* 98:313-322.
- Eid G , French DM, Lundgred AM, Barbet AF, McElwain TF, Palmer GH (1996) Expression of major surface protein 2 antigenic variants during scute *Anaplasma marginale* rickettsemia. *Infect Immun* 64:836-841.
- Eriks IS, Palmer GH, McGuire TC, Allred DR, Barbet AF (1989) Detection and Quantification of *Anaplasma marginale* carrier cattle by using a nucleic acid probe. *J Clin Microbiol* 27:279-284.
- Eriks IS, Stiller D, Palmer GH (1993) Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. *J Clin Microbiol* 31:2091-2096.
- French DM, McElwain TF, McGuire TC, Palmer GH (1998) Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. *Infect Immun* 66:1200-1207.
- French DM, Brown WC, Palmer GH (1999) Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. *Infect Immun* 67:5834-5840.
- Futse JE, Ueti MW, Knowles DP, Palmer GH (2003) Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: Retention of vector competence in the absence of vector pathogen interaction. *J. Clin Microbiol* 41:3829-3834.
- Futse JE, Brayton KA, Knowles DP, Jr., Palmer GH (2005) Structural basis for segmental gene conversion in generation of *Anaplasma marginale* outer membrane protein variants. *Mol Microbiol* 57:212-221.
- Futse JE, Brayton KA, Dark MJ, Knowles DP, Palmer GH (2008) Superinfection as a driver of genomic diversification in antigenically variant pathogens; in press.
- Garcia-Garcia JC, de la Fuente J, Bell-Eunice G, Blouin EF, Kocan KM (2004) Glycosylation of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and its putative role in adhesion to tick cells. *Infect Immun* 72:3022-3030.
- Garcia-Garcia JC, de la Fuente J, Kocan KM, Blouin EF, Halbur T, Onet VC, Saliki JT (2004) Mapping of B-cell epitopes in the N-terminal repeat peptides of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and characterization of the humoral immune response of cattle immunized with recombinant and whole organism antigens. *V Immun Immunopathology* 98:137-151.

- Hofmann-Lehmann R, Meli ML, Dreher UM, Gonczi E, Deplazes P, Braun U, Engels M, Schupbach J, Jorger K, Thoma R, Griot C, Stark KD, Willi B, Schmidt J, Kocan KM, Lutz H (2004) Concurrent infections with vector-borne pathogens associated with fatal hemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland. *J Clin Microbiol* 42:3775-3780.
- Kieser ST, Eriks IS, Palmer Gh (1990) Cyclic Rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infect Immun* 58:1117-1119.
- Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Garcia-Garcia JC (2002) Adaptation of the tick-borne pathogen, *Anaplasma marginale*, for survival in cattle and ticks. *Experimental and Applied Acarology* 28:9-25.
- Kocan KM, de la Fuente J, Guglielmone AA, Melendez RD (2003) Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin Microbiol Rev* 16:698-712.
- Lahmers KK, Norimine J, Abrahamsen MS, Palmer GH, Brown WC (2005) The CD4+ T cell immunodominant *Anaplasma marginale* major surface protein 2 stimulates gamma delta T cell clones that express unique T cell receptors. *J Leukoc Biol* 77:199-208.
- Levinson G, Gutman GA (1987) High frequencies of short frameshifts in poly-CATG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research* 15:5323-5338.
- Lôhr CV, Rurangirwa FR, McElwain TF, Stiller D, Palmer GH (2002) Specific expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 salivary gland variants occurs in the midgut and is an early event during tick transmission. *Infect Immun* 70:114-120.
- Lôhr CV, Brayton KA, Barbet AF, Palmer GH (2004) Characterization of the *Anaplasma marginale* *msp2* locus and its synteny with the *omp/p30* loci of *Ehrlichia chaffensis* and *E. canis*. *ELSEVIER Gene* 325:115-121.
- López JE, Palmer GH, Brayton KA, Dark MJ, Leach SE, Brown WC (2007) Immunogenicity of *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins in a protective outer membrane vaccine. *Infect Immun* 75:2333-2342.
- McGarey DJ, Barbet AF, Palmer GH, McGuire TC, Allred DR (1994) Putative adhesions of *Anaplasma marginale*: Major surface polypeptides 1a and 1b. *Infect and Immun* 62: 4594-4601.

- McGuire TC, Palmer GH, Goff WL, Johnson MI, Davis WC (1984) Common and Isolate-Restricted antigens of *Anaplasma marginale* detected with monoclonal antibodies. *Infect and Immun* 45: 697-700.
- McGuire TC, Davis WC, Brassfield AL, McElwain TF, Palmer GH (1991). Identification of *Anaplasma marginale* long-term carrier cattle by detection of serum antibody to isolated MSP3. *J. Clin Microbiol.* 29:788-793.
- Macmillan H, Brayton KA, Palmer GH, McGuire TC, Munske G, Siems WF, Brown WC (2006) Analysis of the *Anaplasma marginale* major surface protein 1 complex protein composition by tandem mass spectrometry. *J Bacteriol* 188:4983-4991.
- Meeus PF, Brayton KA, Palmer GH, Barbet AF (2003) Conservation of a gene conversion mechanism in two distantly related paralogues of *Anaplasma marginale*. *Mol Microbiol* 47:633-643.
- Mtshali MS, de la fuente J, Ruybal P, Kocan KM, Vicente j, Mbatia PA, Shkap V, Blouin EF, Mohale NE, Moloi TP, Spickett AM, Latif AA (2007) Prevalence and genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains in cattle in South Africa. *Zoonoses and Public Health* 54:23-30
- Mwangi W, Brown WC, Splitter GA, Davies CJ, Howard CJ, Hope JC, Aida Y, Zhuang Y, Hunter BJ, Palmer GH (2007) DNA vaccine construct incorporating intercellular trafficking and intracellular targeting motifs effectively primes and induces memory B- and T-cell responses in outbred animals. *Clin Vaccine Immunol* 14:304-311.
- Noh SM, Brayton KA, Knowles DP, Agnes JT, Dark MJ, Brown WC, Baszler TV, Palmer GH (2006) Differential expression and sequence conservation of the *Anaplasma marginale* msp2 gene superfamily outer membrane proteins. *Infect Immun* 74:3471-3479.
- Tebele N, McGuire T, Palmer GH (1991) Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infect and Immun* 59: 3199-3204.
- Palmer GH, McElwain TF (1995) Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Vet Parasitol* 57:233-253.
- Palmer GH, Brown WC, Rurangirwa FR (2000) Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Microbes Infect* 2:167-176.

- Palmer GH, Rurangirwa FR, McElwain TF (2001) Strain composition of the ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a mammalian reservoir for tick transmission. *J Clin Microbiol* 39:631-635.
- Palmer GH, Knowles DP, Jr., Rodriguez JL, Gnad DP, Hollis LC, Marston T, Brayton KA (2004) Stochastic transmission of multiple genotypically distinct *Anaplasma marginale* strains in a herd with high prevalence of *Anaplasma* infection. *J Clin Microbiol* 42:5381-5384.
- Palmer GH, Brayton KA (2007) Gene conversion is a convergent strategy for pathogen antigenic variation. *Trends Parasitol* 23:408-413.
- Rajpu ZI, Hu S, Chen W, Arijo AG, Xiao C (2006) Importance of tick and their chemical and immunological control in livestock. *J of Zhejiang University Science B* 7(11) 912-921.
- Rodriguez SD, Gacia MA, Aboytes RG, Cantò J, Barigye R (2003) Inmunología e inmunoprofilaxis de la anaplasmosis bovina. *Ciencia Veterinaria*. 9:123-148.
- Rodriguez-Vivas RI, Mata-Mendez Y, Perez-Gutierrez E, Wagner G (2004) The effect of management factors on the seroprevalence of *Anaplasma marginale* in *Bos indicus* cattle in the Mexican tropics. *Trop Anim Health Prod* 36:135-143.
- Rodriguez JL, Palmer GH, Knowles DP, Jr., Brayton KA (2005) Distinctly different *msp2* pseudogene repertoires in *Anaplasma marginale* strains that are capable of superinfection. *Gene* 361:127-132.
- Rurangirwa FR, Stiller D, Palmer GH (2000) Strain diversity in major surface protein 2 expression during tick transmission of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 68:3023-3027.
- Schofield LN, Saunders JR (1987) Attempted transmission to cattle of *Anaplasma marginale* from overwintered *Dermacentor andersoni* ticks. *Can J Vrt Res* 51:379-382.
- Shkap V, Molad T, Brayton KA, Brown WC, Palmer GH (2002) Expression of major surface protein 2 variants with conserved T-cell epitopes in *Anaplasma centrale* vaccines. *Infect Immun* 70:642-648.
- Stich RW, Olah GA, Brayton KA, Brown WC, Fechheimer M, Green-Church K, Jittapalapong S, Kocan KM, McGuire TC, Rurangirwa FR, Palmer GH (2004) Identification of a novel *Anaplasma marginale* appendage-associated

- protein that localizes with actin filaments during intraerythrocytic infection. *Infect and Immun* 72:7257-7264.
- Torini de Echaide S, Knowles DP, McGuire TC, Palmer GH, Suarez CE, McElwain TF (1998) 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* 36:777-782.
- Tuo W, Palmer Gh, McGuire TC, Zhu D, Brown WC (2000) Interleukin-12 and an adjuvant promotes immunoglobulin G and Type 1 Cytokine recall responses to major surface protein 2 of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 68:270-280
- Ueti MW, Reagan JO, Knowles DP, Scoles GA, Shkap V, Palmer GH (2007) Identification of midgut and salivary glands as specific and distinct barriers to efficient tick-borne transmission of *Anaplasma marginale*. *Infect and Immun* 75: 2959-2964.
- Zhuang Y, Fitse JE, Brown WC, Brayton KA, Palmer GH (2007) Maintenance of antibody to pathogen epitopes generated by segmental gene conversion is highly dynamic during long-term persistence infection. *Infect Immun* 75:5185-5190.
- Zweygarth E, Josemans AI, Spickett AM, Steyn HC, Putterill J, Troski PC, Mtshali MS, Bell-Sakyi L, Shkap V, Kocan KM, Blouin EF (2006) *In vitro* cultivation of South Africa isolate of an *Anaplasma* sp. In tick cell cultures. *Onderspot J. Vet Research* 73: 251-255.

## APÉNDICE

### Soluciones

#### Gel de agarosa al 1%

Para 100 ml

Agarosa (Invitrogen)	1g
TAE 1X	100 ml
Bromuro de etidio* (Bio-Rad)	4 µl

#### Gel de agarosa al 2%

Para 100 ml

Agarosa (Invitrogen)	2 g
TAE 1X	100 ml
Bromuro de etidio* (Bio-Rad)	4 µl

#### TAE 50X

Trizma base (Invitrogen)	242 g
Ácido acético glacial	27.1 ml
EDTA	37.2 g

Se afora a 1 litro con H<sub>2</sub>O destilada, se ajusta el pH a 8.5

#### TAE 1X

Para 1000 ml

TAE 50X	20 ml
H <sub>2</sub> O destilada	980 ml

## **Proteínasa K**

**20mg/ml**

Resuspender 10 mg de polvo de proteínasa K en 50 mM de Tris HCl y 10 mM CaCl<sub>2</sub>.

## **Solución de CaCl<sub>2</sub> 1M para 10 ml**

Pesar 1.214 g de CaCl<sub>2</sub> y resuspender en 10 ml de agua destilada estéril.

## **Etanol al 70%**

Para 100ml

Ethanol al 100% 70ml

H<sub>2</sub>O destilada 30ml

\*El Bromuro de etidio (Bio-Rad) que se utilizó se encuentra a una concentración de 10mg/ml.

## **MEDIOS DE CULTIVO**

### **Medio Luria Bertani (LB) (Sigma)**

Luria agar 20g

H<sub>2</sub>O 1000mL

Se esteriliza por autoclave

### **Ampicilina (50µg / ml) (Sigma)**

Se filtra por 0.22µm, para esterilizarla.

Almacenamiento a -20°C , se protege de la luz.

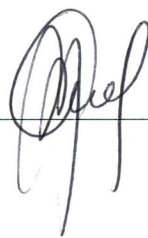
### **Placas LB (Sigma) – Amp**

Luria Agar	40g
H <sub>2</sub> O	1000 ml

Después de haber esterilizado por autoclave y a una temperatura de 45° C aproximadamente, se adiciona Amp (50µg/ml) y se transfiere a cajas de Petri en esterilidad.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 29 de Enero del 2008, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestra en Ciencias Genómicas, a la Q.F.B. Elizabeth Jacqueline Castañeda Ortiz.

Dra. Minerva Camacho Nuez



---

Dr. Jose Joel Mosqueda Gualito

---

Dr. Guy H. Palmer

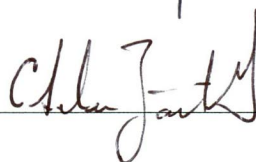
---

Dra. Maria Elizabeth Álvarez Sanchez



---

Dra. Selene Zárate Guerra



---

Coordinación de Certificación y Registro

**UACM**  
Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

---

*Nada Humano me es ajeno*