

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

DOCTORADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**“Estudio de la diversidad génica en diversos aislados de
Anaplasma marginale”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A

M. EN C. ELIZABETH JACQUELINE CASTAÑEDA ORTIZ

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Minerva Camacho Nuez

México, D.F. Abril, 2015.

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.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

DOCTORADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**“Estudio de la diversidad génica en diversos aislados de
Anaplasma marginale”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A

M. EN C. ELIZABETH JACQUELINE CASTAÑEDA ORTIZ

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Minerva Camacho Nuez

ASESORES DE TESIS

Dr. Guy H. Palmer

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Dra. Claudia Selene Zárate Guerra

Dr. Mario César López Camarillo

Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez

MÉXICO D.F.

ABRIL 2015.

El presente proyecto de investigación se realizó gracias al apoyo otorgado por: la Universidad Autónoma de la Ciudad de México. Así como del Proyecto de la Welcome Trust del Dr. Guy H. Palmer de la Universidad del estado de Washington EUA (GR075800M), de el Instituto de Ciencia y tecnología del Distrito Federal (número de proyecto 15 del Fondo de Apoyo para Proyectos Culturales y Científicos Juveniles de la Ciudad de México) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto 78921, Ciencia Básica).

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

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, gracias por confiar en mí y permitirme realizar este proyecto de investigación que resultó apasionante. A la Dra. Minerva Camacho por todos sus consejos y orientación para el proyecto pero especialmente por brindarme su amistad y confianza; al Dr. Guy H. Palmer por sus ideas, su tiempo y por permitirme ser parte de su grupo de investigación.

A los asesores del proyecto por el tiempo brindado y sus valiosas aportaciones; Dr. Juan Mosqueda agradezco mucho comentarios, apoyo y sobretodo la comprensión y empatía con los estudiantes; Dra. Selene Zárate por su tiempo, comentarios y sus asesorías que resultaron muy útiles para el proyecto. Al Dr. César López, por sus consejos y especialmente por el apoyo y tiempo que me brindo, muchas gracias. A la Dra. Elizabeth Álvarez gracias por sus aportaciones.

Al Dr. Massaro Ueti por toda su ayuda, enseñanzas y tiempo destinado al proyecto.

A todos y cada uno de los Doctores del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, por todos los conocimientos y comentarios aportados para mi formación.

A las secretarías del Posgrado por toda la ayuda proporcionada: Vivi, Caty y Lulú muchas gracias por todo.

A todos los compañeros del Posgrado en Ciencias Genómicas, muchas gracias por las charlas compartidas, consejos y ayuda, que hacen la estancia en los laboratorios muy agradable.

A mi familia por su apoyo y amor.

A la vida por permitirme concluir esta etapa.

A todos y cada uno de ustedes muchas gracias.

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
<i>aaap</i>	Proteínas asociadas a apéndices de actina de las siglas en inglés appendages actin associated proteins
ab	Anticuerpos de las siglas en inglés antibodies
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RNA _t	Ácido ribonucleico de transferencia
ATP	Adenosin trifosfato
BAC	Cromosomas artificiales de bacterias de las siglas en inglés Bacteria artificial chromosomes
pb	Pares de bases
CDS	Secuencias codificantes de las siglas en inglés Coding Sequences
cELISA	Ensayo competitivo de inmunoabsorción ligado a enzimas
CF	Fijación del complemento de las siglas en inglés Complement fixation test
Co60	Cobalto 60
C-terminal	Carboxilo terminal
CTR	Pruebas en placas
DAP	Diamilopimelato

DDT	Dicloro difenil- tricloroetano
EIV	El Verdineño
ES	Sitio de expresión de las siglas en inglés Expression Site
X g	Gravedades
HVR	Regiones hipervariables de las siglas en inglés Hypervariable Regions
IFA	Ensayo de inmunofluorescencia de las siglas en inglés Immunofluorescence
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Kb	Kilobases
kDa	Kilo daltones
LaJ	La Joya
LPS	Lipopolisacáridos
Mbp	Mega pares de bases
MLPs	Proteínas parecidas a las MSPs de las siglas en inglés MSP1a-like proteins
MSP's	Proteínas principales de superficie de las siglas en inglés Major Surface Proteins
OC	Organoclorados
OF	Organofosforados
OMP	Proteínas de membrana externa de las siglas en inglés Outer Membrane Proteins
ORF	Marco abierto de lectura de las siglas en inglés Open Reading Frame

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PS	Piretroides sintéticos
rxn	Reacción
SAGARPA	Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación
SNP	Polimorfismos de un solo nucleótido de las siglas en inglés Single Nucleotide Polymorphism
TCA	Ciclo del Ácido tricarboxílico de las siglas en inglés Tricarboxylic acid cycle
UTR	Región sin traducir de las siglas en inglés Untranslated región

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	4
Distribución geográfica de la Anaplasmosis bovina.....	4
Características de la Anaplasmosis bovina	7
Transmisión de la Enfermedad	9
Via iatrogénica.....	9
Vía mecánica.....	10
Via vector biológico	10
Medidas de control de la Anaplasmosis bovina	12
Prevención de la enfermedad por vía iatrogénica.....	13
Manejo de los animales.....	13
Administración de antibióticos	15
Vacunas.....	15
Vacunas atenuadas.....	16
Vacunas muertas	16
Vacunas vivas	17
Control de vectores en los animales	19
Características de la <i>Anaplasma marginale</i>	20
Taxonomía de <i>Anaplasma marginale</i>	22
Ciclo de vida de <i>Anaplasma marginale</i> en el vector biológico.....	24
Características del genoma de <i>Anaplasma marginale</i>	26
Identificación de proteínas de membrana	29
Superfamilia <i>msp1</i>	30
Superfamilia <i>msp2</i>	32
Pseudogenes.....	34
Características generales de proteínas principales de superficie (MSP's)	37
ESTADO DEL ARTE	41
Diversidad genómica entre aislados de <i>Anaplasma marginale</i>	41
Modificaciones en la estructura de <i>msp1-alfa</i> y su asociación con la transmisión.....	44
Variación antigénica y persistencia en el hospedero vertebrado.....	45
Superinfección.....	48
JUSTIFICACIÓN	50
HIPÓTESIS	51
OBJETIVOS	52
OBJETIVO GENERAL	52
OBJETIVOS PARTICULARES.....	52
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	53
MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
Obtención de las muestras.....	57
Diagnóstico de la infección con <i>Anaplasma marginale</i>	58
Extracción de ADN de <i>Anaplasma marginale</i>	58
Determinación del genotipo <i>msp1-alfade</i> <i>Anaplasma marginale</i>	59
Identificación del aislado dominante en los hatos de estudio	64
Identificación del repertorio de pseudogenes de <i>msp2</i> del aislado dominante	64
Reconocimiento de epítomos de <i>msp2</i> de la cepa St. Maries	66
Análisis Estadístico	66

RESULTADOS	67
Identificación de la Anaplasmosis bovina en los hatos de estudio	67
Genotipificación de aislados de <i>Anaplasma marginale</i>	68
Identificación del genotipo dominante de <i>Anaplasma marginale</i>	74
Determinación de los niveles de superinfección en los hatos de estudio	76
Identificación del repertorio de pseudogenes <i>msp2</i> de <i>Anaplasma marginale</i>	77
Identificación de los microdominios de <i>msp2</i>	86
Reconocimiento de epítomos de <i>Anaplasma marginale</i> con sueros de bovinos crónicamente infectados	85
DISCUSIÓN	88
CONCLUSIONES	95
PERSPECTIVAS	96
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXOS	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microscopía electrónica de una vacuola parasitófora formada por <i>A. marginale</i>	7
Figura 2. Representación esquemática de las fases Aguda y Persistente de la Anaplasmosis bovina.	9
Figura 3. Ejemplos de las diferentes vías de transmisión de <i>A. marginale</i>	11
Figura 4. Microscopía óptica de eritrocitos bovinos infectados con diferentes organismos intracelulares	21
Figura 5. Árbol filogenético con algunos miembros del orden Rickettsiales.	22
Figura 6. Representación del ciclo de transmisión de la Anaplasmosis bovina	25
Figura 7. Representación gráfica del genoma circular de <i>Anaplasma marginale</i>	29
Figura 8. Representación gráfica de la superfamilia 1.	31
Figura 9. Representación gráfica de la superfamilia 2.	33
Figura 10. Localización de pseudogenes <i>msh2</i> en cepas de <i>Anaplasma marginale</i>	36
Figura 11. Ejemplos de algunas secuencias de los repetidos en tándem de MSP1a	42
Figura 12. Representación gráfica de la estructura 2D de algunos repetidos de MSP1a.	43
Figura 13. Representación de la conversión génica que se experimenta en el sitio de expresión de <i>msh2</i>	47
Figura 14. Alineamiento de las variantes alélicas de MSP2.	49
Figura 15. Diagnóstico de la Anaplasmosis Bovina con las metodologías cELISA y PCR.	67
Figura 16. Amplificación por nPCR del gen <i>msh1a</i> de <i>Anaplasma marginale</i>	68
Figura 17. Verificación de la presencia del inserto en el vector TOPO-TA..	69
Figura 18. Análisis de las secuencias MSP1a.	70
Figura 19. Genotipos identificados en las muestras del rancho “La Joya”	72
Figura 20. Representación gráfica de los genotipos de MSP1a distribuidos dentro del rancho “El Verdineño”.	73
Figura 21. Diagrama de Venn que representa el resultado de la comparación de los genotipos MSP1a identificados en los ranchos	74
Figura 22. Representación gráfica de la cantidad de animales superinfectados..	76
Figura 23. Obtención de los amplicones <i>msh2</i> y verificación de la clonación para la obtención de las secuencias de interés.	78
Figura 24. Estimación del número mínimo de secuencias para la identificación de los alelos <i>msh2</i>	80
Figura 25. Comparación de las secuencias <i>msh2</i> entre las muestras seleccionadas..	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución geográfica y seroprevalencia de la Anaplasmosis bovina en países de América.	6
Tabla 2. Técnicas para el diagnóstico de Anaplasmosis bovina	14
Tabla 3. Ejemplos de algunas especies clasificadas en la familia <i>Anaplasmataceae</i>	23
Tabla 4. Aspectos generales del genoma de <i>A. marginale</i> y comparación de las cepas St. Maries, Florida y la subespecie <i>A. centrale</i>	27
Tabla 5. Pseudogenes <i>msp2</i> comparados entre diferentes cepas de <i>Anaplasma marginale</i>	35
Tabla 6. Lista de oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen <i>msp1α</i>	59
Tabla 7. Secuencias de los oligonucleótidos M13 utilizados para la secuenciación y PCR colonia. 62	
Tabla 8. Lista de oligonucleótidos para los alelos <i>msp2</i>	64
Tabla 9. Secuencias de los repetidos MSP1a nuevos.	71
Tabla 10. Genotipos MSP1a principalmente distribuidos en los hatos “La Joya” y “El Verdineño” ..	75
Tabla 11. Animales seleccionados para determinar el repertorio de alelos <i>msp2</i>	77
Tabla 12. Compilado de datos considerados para hacer las matrices para realizar los análisis estadísticos y determinar el repertorio de pseudogenes <i>msp2</i>	81
Tabla 13. Frecuencia de los alelos MSP2.	82
Tabla 14. Reconocimiento inmunogénico con la HVR con sueros de animales de campo..	86

ABSTRACT

Bovine Anaplasmosis is a disease with a high economical impact on the cattle industry at different geographic regions. Even though several strategies have been developed to control the disease, they have been unable to generate protection against the high heterogeneity of strains. At endemic regions $\geq 70\%$ of the animals are in risk of being infected by *Anaplasma marginale*. The disease persistence is maintained by generation of multiple antigenic variants that evade the host immune response. These variants are generated by segmental gene conversions between the *msp2* expression site and *msp2* pseudogenes that are located across the genome.

A. marginale strains differ at sequence level as well as the amount of pseudogenes distributed in the genome (7 to 9). The difference between *msp2* repertoires allows the establishment of superinfection only when a second infecting strain expresses a different *msp2* allele repertoire. The new variants of the repertoires will be able to avoid the immune response mounted against the strain that established the first infection.

In this study we analyzed the molecular marker MSP1a to determine the circulating genotypes in the herds. More than 50% of the samples were superinfected with 2 or more genotypes of *A. marginale*. By considering the sequence of MSP1a tandem repeat we identified a dominant isolate (composed by the repeats NR14/10/15).

By sequencing a region of the *msp2* gene we obtained several sequences and considering their frequencies, we identified 7 alleles that could represent the dominant isolated pseudogene repertoire. Even though we found 2 common alleles between the 3 analyzed samples, the pseudogen repertoire couldn't be verified with other samples that were also infected with the dominant genotype. All *msp2* obtained variants were analyzed to identify microdomain sequences and they were compared with previously reported variants. This analysis allowed us to identify shared sequences between strains. Based on the St. Maries MSP2 alleles sequences we synthesized peptides to determine if there were differences or not in the epitope recognition using serum obtained from infected bovines with different *A. marginale* isolates. Surprisingly the antibodies in the samples displayed a very different recognition pattern, even though the tested serums were infected with the dominant isolate. In conclusion with these results we identified new variants of MSP1a and MSP2 and correlate the superinfection event with prevalence and the presence of tick vectors.

RESUMEN

La Anaplasmosis bovina es una enfermedad que genera estragos millonarios en el sector ganadero de diferentes regiones del mundo. A pesar de múltiples esfuerzos realizados para controlar a esta enfermedad ha sido imposible desarrollar una estrategia que resulte completamente efectiva para proteger contra la amplia diversidad de cepas distribuidas en diferentes regiones geográficas. En regiones en donde la enfermedad es endémica $\geq 70\%$ de los animales se encuentran en riesgo de contraer la infección. La persistencia de la enfermedad es mantenida mediante la expresión de múltiples variantes antigénicas que permiten evadir la respuesta inmune del hospedero. Estas variantes se generan mediante mecanismos de conversión génica de segmentos que se llevan a cabo entre un sitio único de expresión de *msh2* y el conjunto de pseudogenes *msh2*.

Diferentes cepas de *A. marginale* presentan variaciones tanto a nivel de secuencia como en la cantidad de los pseudogenes que se encuentran dispersos en el genoma (de 7 a 9). La diferencia entre el repertorio *msh2* permite establecer superinfecciones en los animales. Cuando una cepa contiene alelos diferentes a los de la cepa que estableció la primera infección en el hospedero, esta será capaz de evadir la respuesta previamente generada por las variantes reconocidas por el sistema inmune.

En el presente trabajo utilizamos la secuencia del marcador molecular MSP1a para identificar los genotipos de los aislados que se encontraban estableciendo la infección en dos hatos nacionales. Entre las muestras analizadas identificamos que $\geq 50\%$ de los animales estaban superinfectados con 2 o más genotipos de la *A. marginale*. Con base en esta secuencia MSP1a se identificó un aislado dominante (constituido por los repetidos NR14/10/15) entre las muestras analizadas.

Posteriormente múltiples secuencias del gen *msh2* se obtuvieron mediante secuenciación y con base en la frecuencia de cada una de las variantes obtenidas, se identificaron 7 alelos que probablemente representan el repertorio de pseudogenes del aislado dominante. A pesar de que se encontraron 2 alelos en

común entre 3 de las muestras analizadas, el repertorio de pseudogenes no pudo ser corroborado en su totalidad basándonos en las variantes obtenidas de otras muestras. Las variantes de *msp2* se analizaron para identificar los microdominios y compararlos con variantes previamente reportadas, lo que nos permitió identificar secuencias en común con otros aislados. Posteriormente, basándonos en la secuencia de los alelos de MSP2 de la cepa St. Maries se sintetizaron péptidos para identificar similitudes o diferencias en el reconocimiento de epítomos mediante la interacción con sueros de bovinos infectados con distintos aislados de esta bacteria. Sorpresivamente los anticuerpos presentes en las muestras presentaron patrones de reconocimiento muy diferentes a pesar de tener en común la infección con el aislado dominante. En conclusión nuestros hallazgos nos han permitido identificar nuevas variantes de MSP1a y MSP2 y de esta forma se correlacionó el establecimiento de la superinfección con la prevalencia de la infección y la presencia de vectores.

INTRODUCCIÓN

Anaplasmosis bovina

Distribución geográfica

A nivel mundial, las enfermedades infecciosas transmitidas por garrapatas generan costos económicos anuales estimados en \$7 mil millones de dólares, entre éstas se incluye a la Anaplasmosis bovina (Brayton, 2012). La Anaplasmosis bovina es una enfermedad ocasionada por *Anaplasma marginale* la cual infecta a rumiantes domésticos y silvestres como bovinos, búfalos de agua, bisontes, antílopes africanos y ciervos. Esta enfermedad tiene una alta morbilidad y mortalidad y se han reportado casos en todos los continentes (Kocan y cols., 2003).

A. marginale se encuentra distribuida principalmente en regiones tropicales y subtropicales en las que la enfermedad resulta una limitante para la producción agropecuaria de muchos países, ya que el 70% del ganado localizado en estas zonas se encuentra en riesgo de adquirir la infección (Futse y cols., 2008)

En Europa, principalmente en el Mediterráneo, la infección se ha reportado tanto en ganado bovino como en especies silvestres. En Sicilia, Italia donde el clima es ideal para el desarrollo de garrapatas, se reportan niveles de Anaplasmosis que van desde 6.3 a 16.8% en la parte Este y en el Oeste 38.9 – 52.3% (de la Fuente y cols., 2005; Torina y cols., 2008).

En regiones de África la Anaplasmosis bovina es endémica, se estima que el 99% de los bovinos están en riesgo de contraer la enfermedad. Además, al menos cinco especies de garrapatas han sido identificadas en esta región como transmisoras de *A. marginale*; también se reporta la transmisión por vía mecánica y iatrogénica (De Wall, 2000).

En Asia, específicamente en Okinawa, la infección con *A. marginale* era endémica hasta 1994, año en el que se erradicó a la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; desde entonces solo se ha reportado un brote que se controló rápidamente (Ooshiro y cols., 2009). En Filipinas, aproximadamente 19% de la

población rumiante es positiva a la infección con *A. marginale* (Ybanez y cols., 2014).

En Estados Unidos, la anaplasmosis es endémica en los estados localizados a las orillas del Atlántico y en las Costas del Golfo. En los estados localizados al Oeste del país la enfermedad se considera severa, aunque se han reportado casos en casi todos los estados (Kocan y cols., 2010). En 1997 esta enfermedad fue responsable de al menos 50,000 - 100,000 muertes de ganado, con pérdidas económicas estimadas entre 30 - 60 millones de dólares (Brayton, 2012).

En el centro y el sur de América, así como en las Islas del Caribe, la anaplasmosis bovina es endémica. En toda Latinoamérica se han reportado casos excepto en las zonas desérticas y montañosas como los Andes y los costos económicos ocasionados por Anaplasmosis y Babesiosis ascienden a los \$875 millones de dólares por año (Guglielmone, 1995; Kocan y cols, 2003; Almazan y cols., 2008; Ruybal y cols., 2009; Jiménez Ocampo y cols., 2012).

En Argentina la anaplasmosis causa pérdidas económicas estimadas entre 8 y 20 millones de dólares anuales, considerando tratamientos terapéuticos, pérdida de peso que disminuye la producción y muerte de los animales (Ruybal y cols, 2009).

En México los estudios económicos realizados en 1980 respecto a la enfermedad, estimaron pérdidas por más de 3000 millones de pesos, cifra que actualmente ascenderían a más de 130 millones de dólares al año (Kocan y cols, 2003). En 1995 se responsabilizó a *A. marginale* por el 26% de la mortalidad total registrada en bovinos incorporados en el programa de mejora del ganado. Estudios serológicos señalan a las zonas tropicales y subtropicales del Sureste y del Golfo de México, con prevalencias superiores al 50% (Almazan y cols, 2008; Jiménez Ocampo y cols, 2012).

La actual demanda de bovinos favorece el movimiento de ganado, lo que puede influir en el incremento de los casos al transportarse hospederos asintomáticos que ponen en riesgo al resto de los animales. México exporta cerca de 1.3 millones de cabezas de bovinos en pie a Estados Unidos, lo que requiere que los

animales estén libres de ectoparásitos, así como de cualquier tipo de enfermedad, de lo contrario se niega el paso de los animales afectando fuertemente al sector ganadero del país (Domínguez-García y cols., 2010).

La distribución de la enfermedad en diversas regiones de América ha sido determinada utilizando diferentes técnicas de diagnóstico (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución geográfica y seroprevalencia de la Anaplasmosis bovina en países de América (Modificada de Kocan y cols, 2003).

País	Prevalencia (%)	Técnica para el diagnóstico
USA (Lousiana)	5.6	CTR
USA (Oklahoma)	4.7 – 17.6	CF
Costa Rica	61 – 90	cELISA, PCR
Venezuela	57.7	IFA
Colombia	64 – 100	IFA
Brasil	67.3	IFA
Paraguay	92	CTR
Argentina	7 – 61	Blood smears
Jamaica	69.9	CTR
Antillas menores (Caribe)	18 – 71	Dot ELISA
México (Veracruz)	69	PCR
México (Yucatán)	50 – 76	PCR

CTR pruebas en placas, CF, fijación de complemento, cELISA ensayo competitivo por inmunoabsorción ligado a enzimas, IFA, ensayo de inmunofluorescencia, PCR Reacción en cadena de la polimerasa (Modificado de Kocan y cols, 2003).

La mejora genética del ganado es una actividad comúnmente practicada en el sector ganadero, pero en zonas tropicales y sub-tropicales la Anaplasmosis impide llevarla a cabo, ya que generalmente se importan animales provenientes de zonas templadas los cuales resultan ser extremadamente susceptibles a las especies de *A. marginale* presentes en el área. Por lo general el ganado importado muere al poco tiempo de haber sido incorporado al hato (Rodriguez Camarillo y cols., 2003).

Características de la enfermedad

El periodo de incubación de la Anaplasmosis bovina varía entre 7 y 60 días, dependiendo del inoculo de *A. marginale* que infecte al bovino, con un promedio de 28 días. En los rumiantes, los glóbulos rojos son las únicas células conocidas susceptibles de ser infectadas por *A. marginale*; alojándose dentro de inclusiones unidas a la membrana, denominadas vacuolas parasitóforas. Estas vacuolas pueden contener de 3 a 8 rickettsias, cada rickettsia tiene un diámetro de 0.2 a 0.4 μm y se replica por fisión binaria para posteriormente ser liberadas e infectar nuevos eritrocitos. (Figura 1) (McGarey y cols., 1994). Una vez que *A. marginale* se reproduce e infecta nuevos eritrocitos, la respuesta inmune del hospedero reconoce y lisa los eritrocitos parasitados ocasionando los signos clínicos característicos de la fase aguda de la Anaplasmosis bovina; anemia, abortos y muerte (French y cols., 1999; Kocan y cols, 2003).

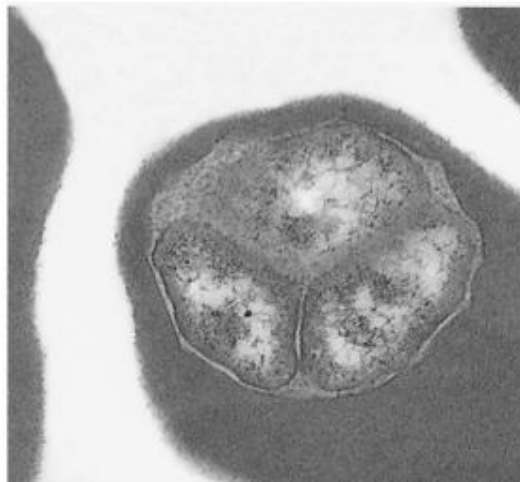


Figura 1. Microscopía electrónica de una vacuola parasitófora formada por *A. marginale*. En esta imagen se le puede apreciar adherida a las paredes del eritrocito bovino; dentro de la vacuola se aprecian tres cuerpos iniciales del organismo (Kocan y cols, 2003).

En los bovinos, los signos clínicos de la infección resultan ser más evidentes que en el resto de los rumiantes (Kuttler, 1984; Silva y cols., 2014). Las razas puras de

Bos taurus como Holstein, Pardo Suizo o Hereford, son más propensas a desarrollar Anaplasmosis aguda que las razas provenientes de cruzas como el ganado cebú y el ganado criollo (Kocan y cols, 2003).

Bovinos de todas las edades son susceptibles a infectarse con *A. marginale* pero la severidad de la enfermedad se incrementa con la edad (Pruneau y cols., 2014). Cuando la infección se establece en animales menores de 6 meses, los signos clásicos de la enfermedad son prácticamente imperceptibles e incluso la infección puede pasar por desapercibida. A partir de los 6 meses hasta los 3 años los signos pueden ser moderados o severos y se presentan más muertes conforme mayor sea la edad del hospedero. Después de los 3 años de edad del 30 al 50% del ganado que se infecta muere (Aubry Geale, 2011b; Howden y cols., 2010).

Durante la **fase aguda** de la Anaplasmosis los signos de la enfermedad incluyen: el aumento de la temperatura corporal que puede llegar hasta los 41 °C, palidez en la piel que se encuentra alrededor de los ojos, la nariz, el hocico y las ubres, debilidad, letargo, inapetencia, pérdida de peso y eventualmente la muerte. Los eritrocitos infectados son fagocitados por las células retículo endoteliales del bovino, resultando en el desarrollo de anemia que va de media a severa e ictericia sin presentarse hemoglobinemia ni hemoglobinuria (Kocan y cols, 2003). En esta fase hasta el 70% de los eritrocitos se encontrarán infectados, el alto grado de parasitemia que se alcanza permite detectar la presencia de *A. marginale* mediante microscopia óptica de los eritrocitos teñidos con Giemsa (Eriks y cols., 1993; Kocan y cols., 2010).

Los animales capaces de superar la fase aguda de la enfermedad comienzan a recuperarse lentamente (en un periodo de 2 a 3 meses) y desarrollan la **fase persistente** de la infección. Durante ésta se observan oscilaciones cíclicas en la cantidad de microorganismos presentes en el animal, las cuales van desde 10^{-2} hasta 10^{-7} parásitos por ml de sangre; en esta etapa ya no se aprecian signos clínicos. (Figura 2) (Palmer y cols., 2000).

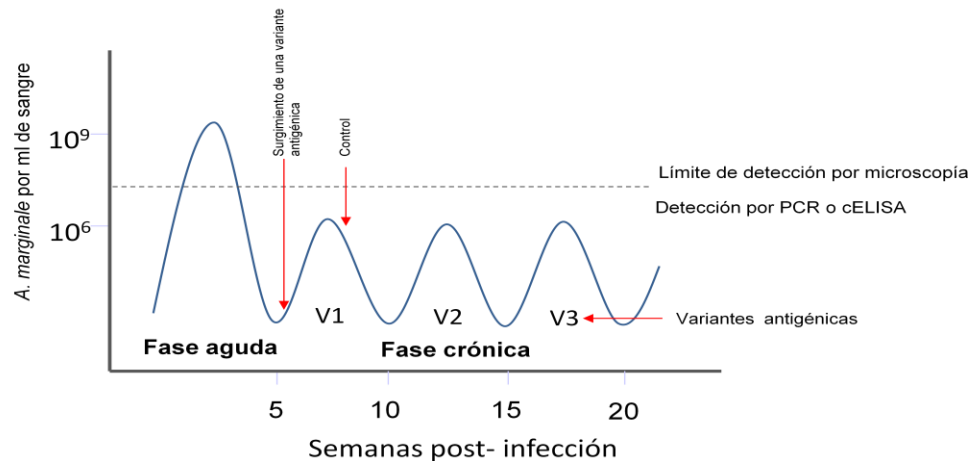


Figura 2. Representación esquemática de las fases aguda y persistente de la Anaplasmosis bovina. La gráfica muestra los niveles de parasitemia alcanzados en la fase aguda y las variaciones en la cantidad de parásitos a lo largo de la fase persistente; las fluctuaciones son ocasionadas por el surgimiento de nuevas variantes antigénicas (V_n) que se expresan aproximadamente cada 5 semanas. La enfermedad puede ser diagnosticada con diferentes metodologías pero se condicionan por la cantidad de parásitos presentes en la muestra (Modificado de Palmer y cols, 2000).

Las fluctuaciones parasitarias son ocasionadas por el surgimiento de nuevas variantes de proteínas de membrana. En esta fase los niveles de parasitemia pueden ser muy bajos, por lo que la detección o diagnóstico de la enfermedad se debe realizar con técnicas de biología molecular (Pruneau y cols, 2014). La fase persistente resulta ser de vital importancia considerando que los animales sobrevivientes serán portadores asintomáticos de por vida y constituyen un reservorio para la transmisión de este microorganismo; la transmisión depende de los animales infectados considerando que el paso transovárico de *A. marginale* dentro de la garrapata no ocurre (Pruneau y cols, 2014; Brayton, 2012).

Transmisión de *A. marginale*

La trasmisión de esta bacteria puede ocurrir por diferentes vías:

Iatrogénica: Este tipo de transmisión ocurre cuando instrumental de uso veterinario como agujas de jeringas, pinzas para el descorné, pinzas para la nariz,

instrumentos para el tatuaje de los bovinos, dispositivos para etiquetar las orejas o bien instrumentos para la castración, no es debidamente desinfectado, lo que facilita la transmisión de sangre de un bovino infectado a otro a través de fómites (Figura 3A) (Kocan y cols, 2003).

Normalmente, cuando el brote es generado vía iatrogénica una gran cantidad de bovinos del hato presentan los signos de la Anaplasmosis en un periodo de 4 a 6 semanas post – tratamiento. Este tipo de transmisión puede ser prevenido siempre y cuando se mantengan buenas prácticas en el manejo de los animales, pero se debe considerar que este tipo de transmisión es difícil de controlar (Gill, 2005).

Mecánica: A pesar de que en esta vía de transmisión intervienen insectos hematófagos para diseminar la enfermedad, *A. marginale* es incapaz de establecer infección en los insectos, es decir solo los utiliza como “vehículos de transportación”. Los insectos hematófagos son considerados los transmisores de mayor importancia en zonas en donde se han erradicado las garrapatas. Entre estos se encuentran dípteros hematófagos como moscas de los géneros *Tabanus*, *Haematobia* y *Stomoxys*; mosquitos del genero *Psosophora* y *Siphona*; pulgas y moscas de establo (Figura 3B) (Hofmann-Lehmann y cols., 2004; Scoles y cols., 2005a; Silva y cols, 2014). Cuando la enfermedad es transmitida por este tipo de insectos se observan pocos casos clínicos dentro del hato, pero se pueden incrementar considerando las condiciones en las que se encuentren los animales por ejemplo proximidad entre ellos, condiciones de las áreas en las que habitan, etc. (Gill, 2005).

Biológica: La ocurrencia de la enfermedad se asocia a la presencia de garrapatas; éstas son reservorios de *A. marginale* y permiten diseminar al microorganismo dentro de un hato. La bacteria establece infecciones en tejidos específicos del artrópodo (epitelio intestino y glándulas salivales), permitiendo así ser transmitido al hospedero mamífero en el momento en que la garrapata se adhiere y comienza a alimentarse.

Actualmente, se han descrito al menos 20 especies de garrapatas capaces de transmitir a *A. marginale* incluyendo *Argas persicus*, *Ornithodoros lahorensis*, *Boophilus annulatus*, *Boophilus decoloratus*, *Dermacentor albipictus*, *Dermacentor occidentalis*, *Hyalomma excavatum*, *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus sanguineus* y *Rhipicephalus simus*. Estas especies se encuentran distribuidas en diferentes zonas geográficas (Rajput y cols., 2005; Mtshali y cols., 2007). Específicamente en USA, *A. marginale* es transmitida principalmente por los géneros *Dermacentor andersoni* y *Dermacentor variabilis*. En las regiones tropicales y subtropicales del mundo como en Australia, África y América del Sur es *R. microplus* el vector más importante. (Figura 3C) (Brayton, 2012; Rajput y cols, 2005).

En México los géneros identificados como transmisores de *A. marginale* son *R. microplus* y *R. annulatus*, ambos géneros se encuentran distribuidos en casi todo el territorio nacional (SAGARPA, 2014). Actualmente, en México se trabaja en la campaña de erradicación del género *R. microplus*; los informes referentes a las fases del programa reportan que zonas del norte y centro del país están libres de garrapatas, correspondiendo al 47.8% del territorio nacional. El 0.57% del país se encuentra en la fase de erradicación y el 51.5% de país se encuentra en la fase de control (SAGARPA, 2014).



Figura 3. Ejemplos de las diferentes vías de transmisión de *A. marginale*. (A) Vía iatrogénica en la que se muestra material de uso veterinario, (B) Vía mecánica, fotografía del mosquito *Psorophora* (C) Vía biológica, fotografía de la especie de garrapata *R. microplus*.

Las garrapatas macho se consideran más importantes para la transmisión de *A. marginale* que las hembras; teniendo en cuenta que las hembras se adhieren al hospedero bovino y se alimentarán de él hasta que están repletas y listas para ovopositar, no así los machos que solamente se alimentan por un periodo de 4 a 8 días y se transfieren a otro bovino dentro del hato, facilitando la diseminación de la Anaplasmosis (Eriks y cols, 1993).

Medidas de control de la Anaplasmosis bovina.

En zonas con baja endemicidad es posible mantener los hatos libres de Anaplasmosis. Los brotes de la infección están relacionados con la falta de un programa de control, la proporción de animales portadores de anaplasmosis y animales susceptibles dentro del hato así como la cantidad de vectores de transmisión.

Brote = No control + Portadores + Animal susceptible + Vectores

El incremento en la relación entre portadores y animales susceptibles, o un incremento en el número de vectores, aumentarán la severidad del brote. Con estos factores en mente los productores deberán considerar la aplicación de estrategias para el control de vectores, para evitar la infección tendrán que emplear medidas de prevención y/o tratamientos. Otra importante estrategia es evitar el estrés de los animales proporcionándoles una alimentación y un ambiente óptimo (Aubry Geale, 2011b).

Diferentes alternativas para el control de la Anaplasmosis bovina han sido probadas, entre las que se incluyen:

❖ Prevención de la transmisión de la enfermedad por vía iatrogénica.

La transmisión iatrogénica como ya se había descrito anteriormente, es a través de fómites contaminados con sangre que contribuyen al esparcimiento de *A. marginale* (y otros patógenos) dentro del hato; se sugiere evitar el uso de jeringas de repeticiones; se deben utilizar agujas nuevas con cada uno de los animales o bien administrar vacunas o antibióticos que no requieran el uso de jeringas (Aubry Geale, 2011b). Además, la limpieza y desinfección en el material quirúrgico empleado entre los bovinos se debe realizar inmediatamente después de haber sido utilizado, no obstante estas medidas son complicadas considerando la cantidad de animales que deben tratarse dentro del hato.

❖ Mantenimiento de los hatos libres de Anaplasmosis a través del diagnóstico y la eliminación de los animales infectados, controlando la importación y el movimiento del ganado. Los ranchos que deseen mantenerse libres de Anaplasmosis deberán realizar pruebas de diagnóstico en todos los animales incluyendo los de nueva adquisición, cualquier bovino que resulte ser positivo deberá ser eliminado del hato considerando que estos se convierten en reservorios para la transmisión de la enfermedad. Alternativamente se les puede separar del hato para proporcionar tratamiento farmacológico y posteriormente confirmar la quimio-erradicación. Diversas metodologías han sido desarrolladas para realizar el diagnóstico de la Anaplasmosis bovina (Tabla 2).

Tabla 2. Técnicas para el diagnóstico de Anaplasmosis bovina

Nombre de la Técnica	Características	Ventajas	Desventajas
Tarjetas de aglutinación (CAT)	Se debe preparar un antígeno que contiene partículas de <i>A. marginale</i> , con el que se preparan laminillas que interactúan con suero de los animales a diagnosticar. El resultado se considera positivo cuando se forman aglutinados.	La prueba se puede realizar tanto en campo como en laboratorio. Los resultados se obtienen en 30 minutos.	La preparación del antígeno puede ser complicada. Además existen variaciones entre lotes y laboratorios.
Inmunofluorescencia Indirecta (IFA)	Requiere la preparación de un antígeno para la elaboración de laminillas, en las que se coloca el suero del animal a diagnosticar.	Prueba sensible que detectan parasitemias bajas (2-5%).	La cantidad de análisis que se pueden realizar por día es limitada. Se requiere equipo y personal especializado.
Microscopia óptica	Laminillas con barridos de sangre para posteriormente teñir eritrocitos con la técnica de Giemsa.	Las laminillas se pueden almacenar hasta por una semana a temperatura ambiente.	Está técnica solamente permite detectar al parásito cuando los niveles de parasitemia son $\geq 10^7$ organismos por ml de sangre.
Ensayo competitivo por inmuoabsorción ligado a enzimas (cELISA)	Utiliza un antígeno recombinante (<i>rmmsp5</i>) y anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos contra <i>A. marginale</i> en sueros.	Alta sensibilidad (96%) y especificidad (95%). Los resultados se obtiene en 2.5 horas.	Algunos reportes señalan que no hay diferenciación entre especies de la familia <i>Anaplasmataceae</i> .
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	Muestras de sangre se procesan para la obtención de ADN y su posterior amplificación con oligonucleótidos específicos.	La sensibilidad analítica de la técnica permite diagnosticar muestras hasta con 0.0001% de eritrocitos infectados.	Solamente permitirá diagnosticar una parte de los bovinos infectados. En algunas ocasiones se requiere realizar PCR anidados.
Reacción en cadena de la polimerasa anidado (nPCR)	A partir de productos de PCR como templado se amplifica el gen de interés.	Identificación de la infección con niveles muy bajos de parasitemia.	Algunas muestras pueden contaminarse por el uso de varios tubos en el paso de las reacciones.
Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT – PCR)	Procesamiento de muestras de sangre para la extracción de ARN.	Detección de la infección con parasitemias muy bajas. Se obtiene un resultado semi-cuantitativo y se evita el riesgo de contaminación ya que la reacción se realiza solo en 1 tubo.	Es costoso, requiere de personal y equipo especializado que resulta costoso.

❖ Administración de Antibióticos

La terapia química es proporcionada a los animales que muestran signos de la Anaplasmosis bovina con la finalidad de reducir la severidad de la enfermedad. Estas mediadas son costosas y existen reportes controversiales respecto a la eficiencia del tratamiento farmacológico. Los animales a los que se les proporciona un antibiótico se deben monitorear por un periodo no menor a los 6 meses, si después de este periodo el animal sigue siendo positivo a la Anaplasmosis se considera que ha fallado la quimioterapia. Los animales que respondan satisfactoriamente al tratamiento siguen siendo susceptibles a infectarse nuevamente con *A. marginale* pero mostrarán signos clínicos leves. Esta estrategia se recomienda cuando la temporada del vector termina, como tratamiento preventivo (Aubry Geale, 2011b).

Entre los fármacos se incluyen a las tetraciclinas (oxitetraciclinas y clorotetraciclinas), al imidocarb que es un derivado de la urea, a la erofloxacina, agentes quimioterapéuticos como: arsénicos, anti-malarios, derivados del antimonio y pigmentos. Los tratamientos son prolongados (5 – 60 días) dependiendo la vía de administración seleccionada (oral o intramuscular). Esta estrategia además de ser costosa podría incrementar el riesgo de generar cepas resistentes a los antibióticos (Aubry Geale, 2011a). Actualmente no existe un medicamento aprobado por las autoridades que contribuya a eliminar a *A. marginale* del hospedero y algunos de los mencionados anteriormente solamente controlan la severidad de la enfermedad pero no eliminan al microorganismo (Gill, 2005).

❖ Vacunas

El desarrollo de una vacuna efectiva para prevenir la Anaplasmosis bovina es complicada debido al creciente número de aislados de *A. marginale* distribuidos en determinadas zonas geográficas. (Aubry Geale, 2011b).

En un intento de prevenir la infección con *A. marginale*, se han desarrollado diferentes tipos de vacunas, no obstante éstas solamente previenen y/o reducen los signos clínicos (fase aguda) pero ninguna evita el establecimiento de la fase persistente de la enfermedad que es de vital importancia en la diseminación de la infección en el hato (Kocan y cols, 2010).

- Vacunas atenuadas

Las cepas de *A. marginale* se atenúan realizando pases del organismo en ovejas o ciervos o bien mediante la irradiación con Co⁶⁰; pero existe controversia respecto al uso de estas vacunas considerando que algunos reportes señalan que no proporcionan protección, o bien que los animales presentan efectos secundarios como disminución de la producción de leche. Las cepas atenuadas de *A. marginale* no confieren protección contra todos los aislados que se encuentran distribuidos en diversas regiones geográficas; además existe la posibilidad de que la cepa revierta la virulencia también existe el riesgo de transmitir otros microorganismos (Edds y cols., 1964).

- Vacunas muertas

Este tipo de vacuna se desarrolló desde 1960 pero no se liberó al mercado hasta 1999. Los animales son inoculados con *A. marginale* previamente purificada de eritrocitos obtenidos a partir de sangre total de un animal infectado con el microorganismo. En el proceso de purificación es necesario eliminar la mayor cantidad de contaminantes procedentes de las células para evitar que se presente desarrollo de isoanticuerpos contra los eritrocitos en bovinos y anemia hemolítica en becerros (Kocan y cols, 2003). Este tipo de vacuna mostró ser eficiente en el sur de Estados Unidos, donde los animales presentaban protección cruzada con aislados de otras regiones geográficas. Sin embargo, los costos de purificación, la necesidad de utilizar animales vivos como fuente de antígenos, el requerir inmunizar en múltiples ocasiones, así como, la dificultad de estandarizar las

inmunizaciones encarecen la producción de este tipo de vacunas (Aubry Geale, 2011b).

Algunas ventajas que presentan las vacunas muertas sobre las vacunas vivas son:

- * Menor riesgo a transmitir otros patógenos.
- * El almacenamiento de la muestra es económico.
- * Las reacciones a la inoculación muestran poca relevancia médica.

Entre las desventajas están:

- * Es necesario inocular anualmente a los animales que se desean proteger.
- * El costo para la purificación de *A. marginale* es elevado.
- * No hay protección contra todos los aislados de *A. marginale* que se encuentran distribuidos en diferentes áreas geográficas.
- * La protección que ofrecen las vacunas muertas es menor que la de las vacunas vivas.

- Vacunas vivas

El uso de vacunas vivas para el control de la Anaplasmosis fue iniciado por Sir Arnold Theiler a inicios del siglo XX (Kocan y cols, 2010). Las vacunas vivas involucran la inoculación de bovinos con eritrocitos infectados con una cepa menos patógena de *A. marginale* o bien con *A. centrale* y en algunos casos se administra tratamiento con tetraciclinas (Brayton, 2012; Kocan y cols, 2010). La producción de esta vacuna requiere de bovinos esplenectomizados, mantenidos en cuarentena, los cuales sirven de fuente para la obtención de sangre infectada que será utilizada para las inoculaciones (Kocan y cols, 2003). La respuesta inmune en los animales vacunados es muy similar a la observada en la infección natural, desarrollando infecciones de medias a inaparentes con el posterior establecimiento de la fase persistente por el asilado con el que se inmunizó (Aubry Geale, 2011b).

En África, Australia, Israel y algunos países de Latinoamérica *A. centrale* es utilizada como vacuna, no obstante, no ofrece protección contra todos los aislados. En México se ha reportado el uso de cepas poco patogénicas para tratar

de controlar la severidad de la enfermedad. El uso continuo de vacunas vivas ocasiona la producción de isoanticuerpos contra los eritrocitos, además existe un alto riesgo de transmitir otros patógenos que infecten al bovino (Kocan y cols, 2003).

Actualmente se utiliza un sistema de cultivo derivado de embriones de garrapatas *Ixodes scapularis* para la propagación de *A. marginale*. Los microorganismos cultivados en estas líneas celulares se probaron en bovinos, y los animales muestran inmunidad al ser retados con sangre infectada y garrapatas infectadas, ya los bovinos no presentaron signos clínicos de la Anaplasmosis; sin embargo la protección fue parcial porque la infección no se evitó (Aubry Geale, 2011b).

También se han desarrollado vacunas producidas con proteínas recombinantes, por ejemplo, bovinos inmunizados con el complejo MSP1 muestran una protección significativa contra la Anaplasmosis bovina. El complejo contribuye a la activación del sistema inmune; y controla los niveles de rickettsemia en animales que adquieren la infección con cepas heterólogas; también se han empleado virus que expresan antígenos de *A. marginale*; estas estrategias parecen ser candidatos potenciales para controlar la infección, sin embargo es necesario establecer las condiciones de inmunización antes de emplear y comercializar estas vacunas (Mwangi y cols., 2007).

La vacuna ideal contra la Anaplasmosis debe prevenir la infección así como inducir la protección inmune contra cepas heterólogas. La posibilidad de bloquear la transmisión biológica de *A. marginale* requiere de un mayor entendimiento del ciclo de desarrollo de *A. marginale* en los bovinos y garrapatas para diseñar una vacuna que prevenga la infección (Aubry Geale, 2011b).

El éxito para el desarrollo de nuevas vacunas mediante técnicas de biología molecular dependerá de la habilidad para mimetizar o redireccionar la respuesta inmune del hospedero durante la infección natural o bien bloquear la infección de las células.

El reciente avance en áreas de la proteómica y la genómica han permitido identificar 21 nuevas proteínas localizadas en la superficie de la membrana, además de las ya bien caracterizadas proteínas principales de superficie MSP-1, -MSP2, MSP-3, MSP-4 y MSP-5 (MSP- son la siglas en inglés Major Surface Protein) las cuales se están investigando para determinar si pudieran ser utilizados como blancos terapéuticos (Lopez y cols., 2005).

❖ Control de vectores en los animales

En zonas en donde las garrapatas y las moscas son las responsables de diseminar a *A. marginale*, es necesario utilizar productos o una combinación de éstos que resulten efectivos para controlar ambas poblaciones. Los animales se deben mantener en ambientes que impidan la supervivencia de las garrapatas, interrumpiendo su ciclo normal de vida. El control de garrapatas y moscas es una labor intensa y costosa. Además, la aplicación continua de acaricidas puede resultar en el desarrollo de resistencia a los compuestos químicos, así como generar susceptibilidad en el ganado (Aubry Geale, 2011b).

Entre los productos utilizados para controlar a los ectoparásitos se encuentran los piretroides, organofosforados (OF), organoclorados (OC), Dicloro defenil-tricloro etano (DDT), Piretroides sintéticos (PS), arsénicos, flumetrina, delmamestrina, amidina y cipermetrina. La resistencia es uno de los mayores problemas considerando que la disponibilidad de nuevos antiparasitarios es cada vez más limitado y el desarrollo de la resistencia es exponencial con respecto al desarrollo de nuevos insecticidas (Alonso-Díaz y cols., 2006). En México ésta es una práctica ampliamente utilizada, el método de control consiste en la aplicación de los compuestos mediante aspersión o baños de inmersión, pero el control químico se ha vuelto ineficaz en algunas regiones debido a la aparición de garrapatas resistentes a estos productos (Alonso-Díaz y cols, 2006).

Otra alternativa empleada actualmente en el control de las garrapatas, es el desarrollo de vacunas contra los ectoparásitos (Mulenga y cols., 1999; Almazan y cols., 2012; Torina y cols., 2014; Bensaci y cols., 2012). Un ejemplo es la vacuna denominada GAVAC® que contiene el antígeno recombinante Bm-86, el cual se

emplea para inmunizar bovinos, las garrapatas que se alimentan de los animales inmunizados presentan perforaciones en el intestino, disminución en el peso de las garrapatas y disminución en la ovoposición (Willadsen, 1990). Esta vacuna ha sido comercializada en diversos países como Cuba, Colombia, Brasil, República Dominicana y México; los reportes relacionados con la eficacia de esta vacuna indican que a diez años de ser utilizada se ha observado disminución en la infestación de los bovinos; y por lo tanto también una disminución en las enfermedades que transmiten las garrapatas a los bovinos (Anaplasmosis y Babesiosis) (de la Fuente y cols., 1999). Los valores de infestación disminuyeron entre un 55 hasta 100% en algunos de los hatos tratados. Cabe mencionar que en los hatos tratados con la vacuna GAVAC® se continuaron realizando labores de “fumigación” empleando diversos tipos de compuestos químicos, aunque el consumo de estos también disminuyó hasta una cuarta parte aproximadamente.

En un intento de controlar a esta enfermedad se han desarrollado múltiples estrategias, sin embargo hasta el momento no existe una que resulte 100% eficaz para eliminar a los ectoparásitos o para bloquear la transmisión de organismos patógenos a los bovinos.

Características de *Anaplasma marginale*

Las bacterias intracelulares se caracterizan por tener nichos en donde sobrevivir ya sea en el citoplasma o en compartimentos de la célula blanco, esta estrategia tiene múltiples ventajas, los patógenos son inaccesibles a los anticuerpos y no son blanco fácil de las células fagocíticas. Dentro de las células hospederas las bacterias intracelulares se encuentran libres de competencia con otros microorganismos; sin embargo, este estilo de vida demanda al patógeno desarrollar mecanismos para ingresar al hospedero, para encontrar un nicho en donde replicarse y salir de las células para diseminar la infección (Alberts B. y cols 2002).

A. marginale es una bacteria Gram – negativa intracelular obligada que infecta a los glóbulos rojos de los hospederos mamíferos y también el bazo, a pesar de que

al alojarse el patógeno se expone continuamente a efectores inmunológicos (Palmer Brayton, 2013).

Inicialmente se pensaba que *A. marginale* era un estadio de desarrollo del protozooario *Piroplasma bigeminum* (actualmente *Babesia bigemina*) la confusión se debía a que comúnmente ambos organismos co-infectan a los rumiantes (Figura 4A). En el año de 1908, Sir Arnold Theiler, identificó que *A. marginale* (*Rickettsiales Anaplasmataceae*) era un patógeno intraeritrocítico diferente a *B. bigemina*, ya que logró establecer infecciones independientes con ambos microorganismos en bovinos de Sudáfrica (Kocan y cols, 2010; Palmer, 2009).

Theiler describió a *A. marginale* como puntos localizados al margen de los eritrocitos bovinos (Figura 4B). Unos años después Theiler, también describió a la subespecie *A. centrale*, la cual se caracteriza por ser menos patogénica que *A. marginale* y porque los cuerpos iniciales se localizan al centro del eritrocito (Figura 4C) (Palmer y cols, 2000; Kocan y cols, 2010; Kocan y cols, 2003).

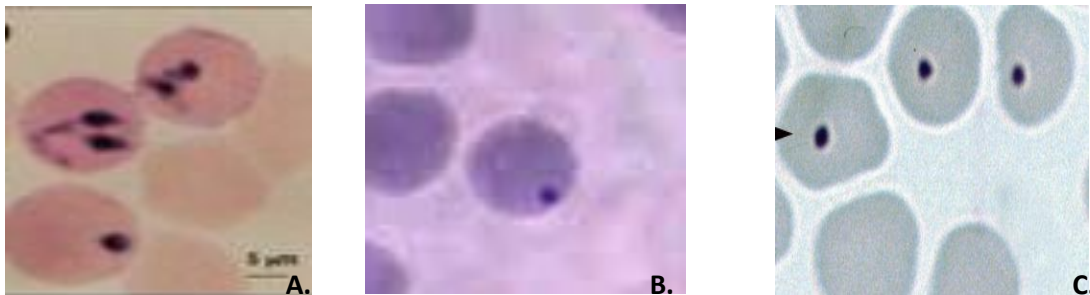


Figura 4. Microscopía óptica de eritrocitos bovinos infectados con diferentes organismos intracelulares. (A) Co-infección de *B. bigemina* y *A. marginale*. (B) Eritrocito infectado con *A. marginale* tinción con Giemsa (Fotografía donada por Dr. Juan Joel Mosqueda). (C) Eritrocito infectado con *A. centrale* tinción con Giemsa.

Taxonomía de *A. marginale*

A. marginale es una bacteria intracelular obligada que pertenece al orden de los *Rickettsiales* y ha sido clasificada en la familia *Anaplasmataceae*. Los *Rickettsiales* incluyen α -proteobacterias intracelulares obligadas que están muy relacionadas

con las mitocondrias. Estas bacterias ocasionan múltiples enfermedades infecciosas emergentes en humanos y animales con un gran impacto en la salud pública así como en la economía. En la familia *Anaplasmataceae* se incluye a los géneros; *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Aegyptianella*, *Wolbachia*, *Neorickettsia* y “*Candidatus Neoehrlichia*” (Figura 5). Estos organismos se clasificaron con base en la secuencia de ARN 16S ribosomal (Murray y cols., 2007).

Las bacterias de la familia *Anaplasmataceae*s infectan hospederos invertebrados que generalmente son abundantes y ubicuos en el ambiente como por ejemplo: garrapatas, insectos, tremátodos, nemátodos o moluscos. Todos estos géneros, excepto *Wolbachia*, también infectan a hospederos vertebrados; estos microorganismos infectan tipos celulares específicos de sus hospederos, como neutrófilos, monocitos, macrófagos, plaquetas, eritrocitos o células endoteliales dependiendo de la especie (Murray y cols, 2007).

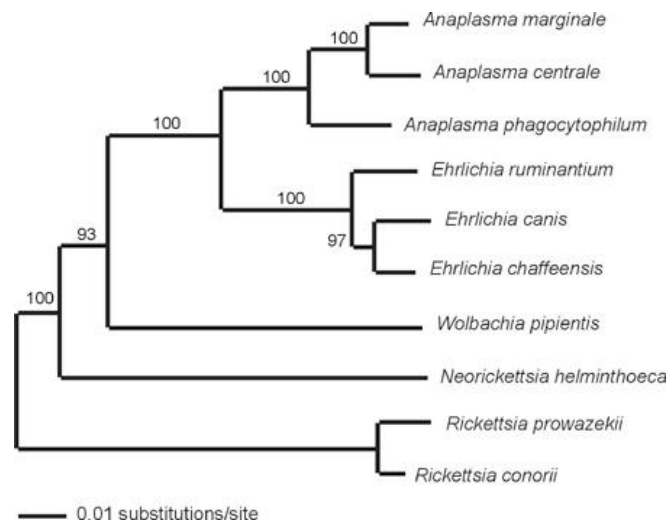


Figura 5. Árbol filogenético con algunos miembros del orden Rickettsiales. Basados en las secuencias de ARN 16S de cada organismo (Brayton y cols., 2005).

En la Tabla 3 se presentan algunos organismos pertenecientes a la familia de los *Anaplasmataceae* en donde se muestran los hospederos y vectores capaces de transmitirlos, la enfermedad que ocasionan así como la distribución geográfica de la enfermedad.

Tabla 3. Ejemplos de algunas especies clasificadas en la familia *Anaplasmataceae*.

Especie	Hospedero	Vector principal	Enfermedad	Distribución geográfica
<i>A. marginale</i>	Bovinos, rumiantes silvestres	Garrapatas <i>R. microplus</i> , y <i>Dermacentor</i> spp.	Anplasmosis bovina	Mundialmente distribuida en zonas tropicales y sub-tropicales
<i>A. phagacytophilum</i>	Humanos, venados, perros, gatos, caballos, rumiantes, roedores	Garrapatas <i>Ixodes</i> spp	Anaplasmosis granulocítica humana, Anaplasmosis y fiebre de los rumiantes asociada a garrapatas	USA, Europa y Asia
<i>E. chaffeensis</i>	Humanos , venados, perros	<i>Amblyoma americanum</i>	Ehrlichiosis monocitica humana, Ehrlichiosis canina	USA. Sudamérica y Asia
<i>E. ruminantium</i>	Bovinos, ovejas, cabras, rumiantes silvestres	Garrapatas <i>African Amblyomma</i> spp. Incluyendo <i>A. variegatum</i> y <i>A. hebraeum</i>	Heartwater	Sub Sahara Africa, Comoros, Mayote Isla Reunión, Madagascar, El Caribe
<i>Wolbachia</i> spp	Nematodo <i>Brugia malayi</i> , Artrópodo <i>Anopheles gambiae</i>	NA	NA	Distribución mundial

Las bacterias de la familia *Anaplasmataceae* se desarrollan dentro de vacuolas citoplasmáticas localizadas en las células del hospedero y presentan diferentes etapas de desarrollo en las que el ADN se reorganiza para dar lugar a la forma densa es decir la forma infectiva o a la forma reticulada o vegetativa. La forma reticulada se multiplica por fisión binaria y forma una mórula que posteriormente cambia a forma densa para ser liberada de la célula (Pruneau y cols, 2014).

Ciclo de vida de *A. marginale* en el vector biológico.

La bacteria *A. marginale* tiene dos hospederos: el hospedero bovino y un vector transmisor donde los parásitos se reproducen por fisión binaria.

Diversos patógenos dependientes de vectores requieren invadir uno o más órganos del vector, sobrevivir a la respuesta inmune de éste, replicarse intra o extra celularmente y desarrollar infectividad para transmitirse eficientemente en el momento en el que el vector se alimenta del hospedero mamífero (Ueti y cols., 2007).

La transmisión de *A. marginale* requiere la invasión y replicación eficiente en los tejidos de la garrapata y culmina en el desarrollo de la infección en las glándulas salivales (Ueti y cols, 2007). El ciclo de vida de esta bacteria resulta ser complejo y está coordinado con la adhesión y el ciclo de alimentación de la garrapata (Kocan y cols, 2010; Brayton, 2012). Cuando la garrapata ingiere sangre infectada, el parásito primeramente invade y coloniza el epitelio intestinal del artrópodo mediante un proceso que es mediado por receptores en los que participan proteínas de superficie del parásito. Dentro de las células epiteliales del intestino medio de la garrapata, este microorganismo debe replicarse dentro de vacuolas intracelulares para formar colonias constituidas por varios cientos de organismos, alcanzando aproximadamente 10^6 anaplasmas por intestino (Ueti y cols, 2007). La colonización del intestino es clave para establecer la infección y es por ello que se le considera la primera barrera que debe superar la bacteria para lograr su futura transmisión.

Después de la replicación inicial en el intestino, el parásito entra en la hemolinfa e invade diversos tejidos; en cada tejido infectado la bacteria se desarrolla dentro de membranas vacuolares o colonias; cuando llega a las glándulas salivales, el microorganismo infecta a las células acinares y dentro de éstas establece ciclos de replicación, por lo que este órgano también es considerado barrera para la

transmisión de este organismo. Los niveles de parasitemia que se alcanzan son de hasta 10^6 organismos por glándula salival. Cuando la garrapata se fija al rumiante e inicia la alimentación, el microorganismo es inoculado en el hospedero junto con la saliva del artrópodo que es secretada (Figura 6) (Brayton, 2012).

La primera forma de *A. marginale* observada dentro de las vacuolas es la **reticulada** o forma vegetativa, que se divide por fisión binaria. Posteriormente la forma reticulada cambia a forma **densa**, la cual es la forma infectiva que puede sobrevivir fuera de las células del hospedero (Kocan y cols, 2003).

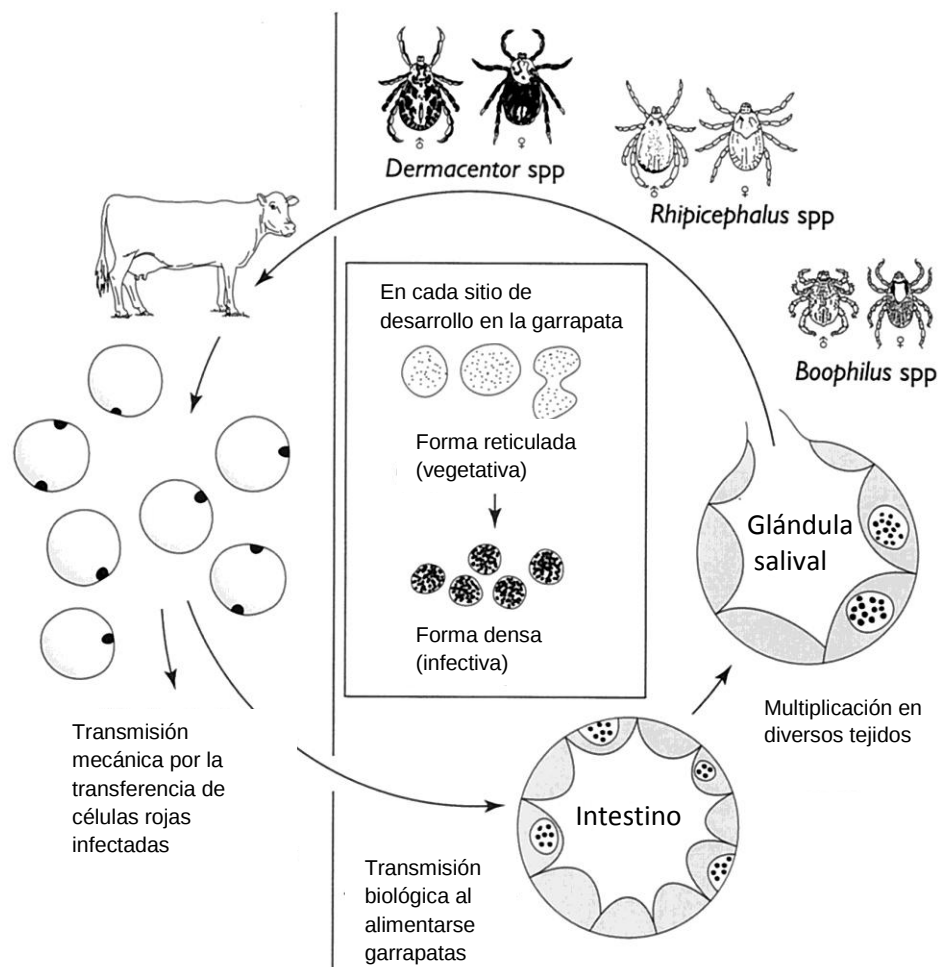


Figura 6. Representación del ciclo de transmisión de la Anaplasmosis bovina (Modificada de Kocan y cols, 2003)

Genoma de *A. marginale*

En el año de 2005 se obtuvo la primera secuencia del genoma completo de *A. marginale* de la cepa St. Maries; en 2009 el de la cepa Florida y secuencias parciales (96%) de otras tres cepas de *A. marginale* (Mississippi, Puerto Rico y Virginia). Los primeros dos genomas se obtuvieron generando bibliotecas genómicas clonadas en Cromosomas Artificiales de Bacterias (BAC de las siglas en inglés Bacteria Artificial Chromosomes) y empleando técnicas de secuenciación. Las secuencias parciales de los genomas de *A. marginale* de las cepas Mississippi, Puerto Rico y Virginia se obtuvieron mediante pirosecuenciación (Dark y cols., 2009; Brayton y cols, 2005).

En general, *A. marginale* contiene un genoma circular pequeño compuesto por ≈ 1.2 Mbp con un contenido de G + C de 49.8%. El valor de C+G resulta inusual para organismos intracelulares obligados, ya que generalmente para las *Rickettsias* se reportan valores del contenido C+G de 31% en promedio (Tabla 4).

El origen de replicación que normalmente se identifica localizando a los genes próximos: *dnaA*, *gyrA*, *gyrB*, *rpmH*, *dnaN* fue elegido arbitrariamente por el grupo de investigación debido a que en *A. marginale* esos genes se encuentran dispersos en el genoma y ninguno presenta cambios en el contenido de C + G ni en el valor “octamer skew”. El genoma de *A. marginale* tiene un elevado porcentaje de genes que codifican para proteínas, el cuál es del 86%, típico de las bacterias intracelulares que deben mantenerse en un nicho particular (Brayton y cols, 2005).

Tabla 4. Aspectos generales del genoma de *A. marginale* y comparación de las cepas St. Maries, Florida y la subespecie *A. centrale*.

	Cepas		
	St. Maries	Florida	Subsp. <i>A. centrale</i>
Tamaño del genoma (pb)	1,197,687	1,202,435	1,206,806
% de G + C	49.8	49.86	NR
Proteínas codificadas, %	85.40	85.50	NR
Genes que codifican proteínas	949	942	925
Pseudogenes funcionales	16	17	19
Densidad génica	0.79	0.79	NR
Promedio de longitud del gen	1,077	1,091	NR
ARN's ribosomales	3	3	1
ARN's de transferencia	37	37	37

NR no reportado. (Modificada de Brayton y cols, 2005; Dark y cols, 2009; Herndon y cols., 2010)

Las secuencias de los genomas de las cepas St. Maries y Florida se analizaron usando genómica comparativa, lo que permitió identificar que dos genes hipotéticos en el genoma de St. Maries se encuentran fusionados en la cepa Florida. Cuatro pequeños marcos de lectura abierto (ORFs por las siglas en inglés Open Reading Frames) (AM380, AM395, AM974 y AM976) con tamaños entre 204 y 378 están ausentes en Florida; estos ORFs se encuentran flanqueados por secuencias de ADN repetitivo y al parecer faltan por eventos de recombinación (Dark y cols, 2009).

La secuencia de los genomas hizo posible realizar la construcción metabólica de *A. marginale*, la identificación de componentes de la pared celular, de transportadores y de familias de proteínas de membrana.

La construcción metabólica determinó que este microorganismo utiliza primordialmente la gluconeogénesis. La respiración aeróbica de *A. marginale* se realiza a través del ciclo del ácido cítrico (TCA de las siglas en inglés tricarboxylic acid cycle) En el genoma se identificaron los genes para las enzimas de la ruta de las pentosas fosfato no oxidativa; también se identificaron las enzimas para la síntesis de ácidos grasos y las rutas completas para la biosíntesis *de novo* de las purinas y pirimidinas (Brayton y cols, 2005).

En cuanto a los transportadores solamente se identificó el del aminoácido prolina y uno hipotético para la alanina. Aunque el genoma de *A. marginale* codifica muchos transportadores tipo cassette con uniones a ATP (Adenosin trifosfato) que podrían cumplir esta función.

Varios sistemas de transporte para cationes, aniones u oligopéptidos están presentes. Los sistemas de transporte para ribonucleótidos y fosfatasa están codificados en el genoma. La ruta sec para la secreción de polipéptidos y el sistema de transportación *tat* también se encuentran presentes (Brayton y cols, 2005).

También se identificó un sistema de secreción tipo IV; los sistemas III y IV son particularmente prevalentes en bacterias Gram negativas, en este parásito puede jugar un papel importante en la invasión y patogénesis, translocando proteínas efectoras a través de la membrana hospedera (Herndon y cols, 2010). Además, se identificaron dos bombas de resistencia a fármacos fueron identificados (Brayton y cols, 2005).

En relación a los componentes de la pared celular se identificó que en el genoma se encuentran todos los genes para la síntesis de diaminopimelato (DAP) y algunos para la síntesis de murein sacculus (*ddlB*, *glmU*, *mraY1*, *murA*, *-B*, *-D*, *-E*, *.F* y *-G* y *slt*) que es una macromolécula de glicanos que se encuentra alrededor de la membrana citoplásmica y que proporciona protección a la célula contra lisis y presión osmótica. En la familia *Anaplasmataceae* la ausencia de paredes celulares tradicionales es común, no así en otros miembros del orden de las *Rickettsiales* ya que estos son capaces de sintetizar LPS y peptidoglicano.

Identificación de proteínas de membrana

Brayton y cols. (2005) describieron que en el genoma de la cepa St. Maries hay 163 secuencias codificantes (CDS de las siglas en inglés Coding sequences) que codifican un péptido señal, y todas excepto 3, tienen al menos un dominio transmembranal. En *A. marginale*, el 2% del total del genoma corresponde a genes que codifican para antígenos de superficie (Viseshakul y cols., 2000). Por identidad de secuencia se clasificaron 13 CDS's para proteínas de membrana externa (OMP de las siglas en inglés Outer Membrane Proteins). También se describieron dos superfamilias constituidas por algunas OMPs ya conocidas y algunas CDS's recién identificadas.

La superfamilia *msp1* contiene nueve integrantes y la superfamilia *msp2* contiene 56 miembros, incluyendo 16 pseudogenes (Figura 7), lo que da un total de 562 OMPs predichas (sin incluir a los pseudogenes) el cual resulta consistente con el número esperado para un genoma de ese tamaño.

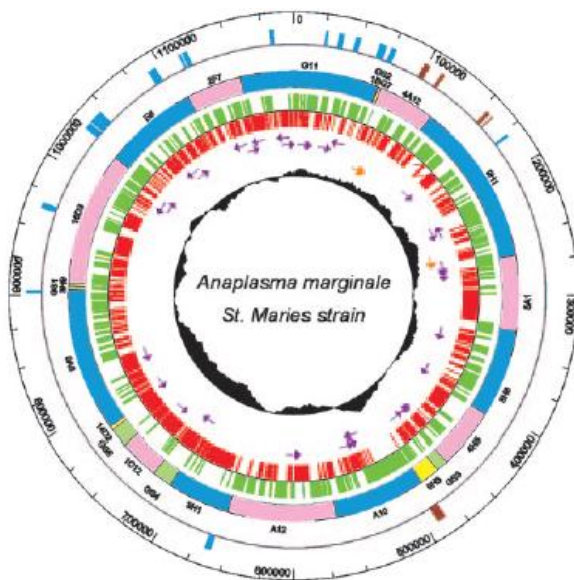


Figura 7. Representación gráfica del genoma circular de *A. marginale*. Del centro hacia afuera, el primer círculo de la imagen representa en color negro el skew de C+G. El segundo círculo en flechas anaranjadas se representa la posición y orientación de los rARNs, el tercer círculo la de los tARNs. El cuarto y quinto círculo representan las CDS en la hebra antisentido y en la hebra sentido. En el sexto círculo se representa las posiciones de los BACs (completos en azul y rosa) las regiones amarillas representan BACs parciales, las regiones verdes representan espacios amplificados por PCR y que

se secuenciaron. El séptimo círculo muestra la posición de los genes pertenecientes a la superfamilia *msp2* y la superfamilia *msp1α*. (Brayton y cols, 2005)

En *A. marginale* la secuencia terminadora de la transcripción *rho*, está duplicada; ambas copias se encuentran separadas por 333 kb. En otros organismos este terminador es de copia única. Al parecer este repetido se originó por un evento de inversión alrededor del origen de replicación. El gen que codifica para proteínas asociadas a la formación de filamentos de actina (*aaap* de las siglas en inglés Appendage Actin Associated Proteins) tiene dos genes parálogos localizados río arriba en el genoma (Brayton y cols, 2005).

Además en el genoma se identificaron dos pequeñas familias putativas de genes que codifican para proteínas de superficie constituidas por dos o tres miembros. En el genoma de *A. marginale* no se han encontrado inserciones (Brayton y cols, 2005).

- La superfamilia *Msp1*

La superfamilia génica *msp1* se encuentra compuesta por nueve integrantes: *msp1 α* , tres denominados *mlp-2*, *mlp-3*, *mlp-4* (de las siglas en inglés MSP1 α -like protein), *msp1 β 1* y *msp1 β 2*; también hay tres pseudogenes de *msp1 β* .

El gen *msp1 α* es de copia única y presenta diferencias entre cepas, generadas por la variación en el número y la secuencia de unidades de repetidos en tándem. Estos repetidos tienen longitudes de entre 86 – 93 pb, y se localizan en la región 5' del gen *msp1 α* . La divergencia de los repetidos entre las distintas cepas de *A. marginale* ha sido identificada alrededor del mundo y se utilizan para su clasificación (Brayton y cols, 2005). Un microsatélite implicado en la regulación de *msp1 α* localizado en el extremo 5' UTR del gen ha sido identificado (Cabezas-Cruz y cols., 2013).

Los genes que codifican para las MLP2, MLP3 y MLP4 se localizan inmediatamente río abajo de la secuencia del gen *msp1 α* . Las proteínas codificadas por estos genes tienen similitud estructural en la región C-terminal. Las MLP2 y 4 tienen 30% y 37% de identidad con la secuencia de aminoácidos de MSP1 α respectivamente.

La pequeña familia multigénica *msp1β* está conformada por cinco genes; dos de éstos son secuencias completas y tres genes parciales, la secuencia de estos genes varía dependiendo de la cepa de *A. marginale* (Figura 8) (Barbet Allred, 1991). Las secuencias de la familia *msp1b* de las cepas Florida y St. Maries fueron comparadas y se observó que las identidades varían; *msp1β-1*, 95%; *msp1β-2*, 77%; *msp1pg1*, 99%; *msp1βpg2*, 28% y *msp1βpg3*, 91%. Los genes parciales podrían ser pseudogenes funcionales para la variación antigénica de *msp1β*, pero esto no se ha demostrado (Brayton y cols, 2005). Hasta el momento sólo se ha identificado la expresión de MSP1b1 formando parte del complejo MSP1 al cual se le atribuye la función de adhesión a las células del hospedero (Garcia-Garcia y cols., 2004; Macmillan y cols., 2006).

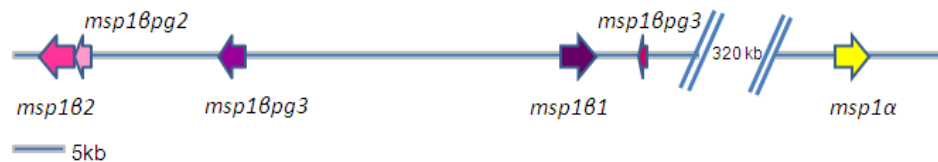


Figura 8. Representación gráfica de 6 de los 9 integrantes de las superfamilia 1. Organización genómica de los *loci* de *msp1α* y *msp1β* de *A. marginale* cepa St. Maries. Con la flecha blanca se identifica a *msp1α* y las flechas negras indican todo el marco de los genes *msp1β* en gris se identifican los genes parciales (Modificado de Macmillan y cols, 2006)

La superfamilia *msh2*

La superfamilia génica *msh2* es la más abundante de *A. marginale* y codifica para proteínas de superficie; está constituida por 56 miembros entre los que se encuentran principalmente a *msh2*, *msh3* y *msh4*. (Figura 9). El genoma contiene sitios de expresión completos para estos tres genes, y además contiene pseudogenes funcionales para *msh2* y para *msh3*. Cuatro de los pseudogenes de *msh2* y *msh3* se encuentran en arreglos denominados “tail to tail” conocidos como complejos de pseudogenes. Aparte de los pseudogenes de *msh3* se encontraron en el genoma remanentes de la secuencia específica del extremo 5' de *msh3* y también una secuencia muy corta que corresponde al extremo 5' de un pseudogen *msh3*.

La secuencia del gen *msp2* es parte de un operón conformado por cuatro genes, los otros tres genes se denominaron genes asociados al operón (*opags* por las siglas en inglés operon associated genes) los cuales también han sido incluidos en la superfamilia 2. Estos genes se expresan tanto en la garrapata como en el hospedero bovino, pero muestran patrones diferenciales de expresión al comparar tejido de garrapata y eritrocitos bovinos. Todos estos productos proteicos han sido identificados como antígenos de superficie y están incluidos en la pfam01617 (Lohr y cols., 2002; Brayton y cols, 2005; Hammac y cols., 2014).

En la superfamilia *msp2* se clasifican 15 genes *omp* agrupados en la pfam01617; doce de estos *omps* están arreglados en tres grupos que representan cuatro operones putativos, los otros 3 genes se encuentran dispersos en el genoma. El resto de los 56 integrantes de esta superfamilia son genes pequeños denominados *orfX* (12 copias) y *orfY* (siete copias). Estos genes codifican para un péptido señal que presenta identidad con la secuencia de *msp3*; aunque no son miembros de la pfam01617; se han incluido en esta superfamilia por la relación en la posición con respecto a *msp2* y *msp3*. Generalmente las secuencias de *orfX* y *orfY* se localizan flanqueando pseudogenes y forman parte del sitio de expresión de *msp3*. Cuando la secuencia de *orfX* u *orfY* se asocia con la secuencia de un pseudogen *msp2* o *msp3*, se localizan en la hebra opuesta al pseudogen; cuando la secuencia flanquea el sitio de expresión *msp3*, *orfX* y *orfY* se encuentran orientadas en la misma dirección y se transcriben como parte del operón. También entre las secuencias de algunos de los pseudogenes de *msp2* y *msp3* se identificaron dos unidades de un repetido conformado por ≈ 600 pb (pares de bases) localizado entre *orfX* y *orfY*, la presencia del repetido no es absoluta, porque hay secuencias del repetido que no se encuentran cerca de *orfX* ni a *orfY*, tal vez estos repetidos participen en la función de recombinación de los pseudogenes en el sitio de expresión (Brayton y cols, 2005).

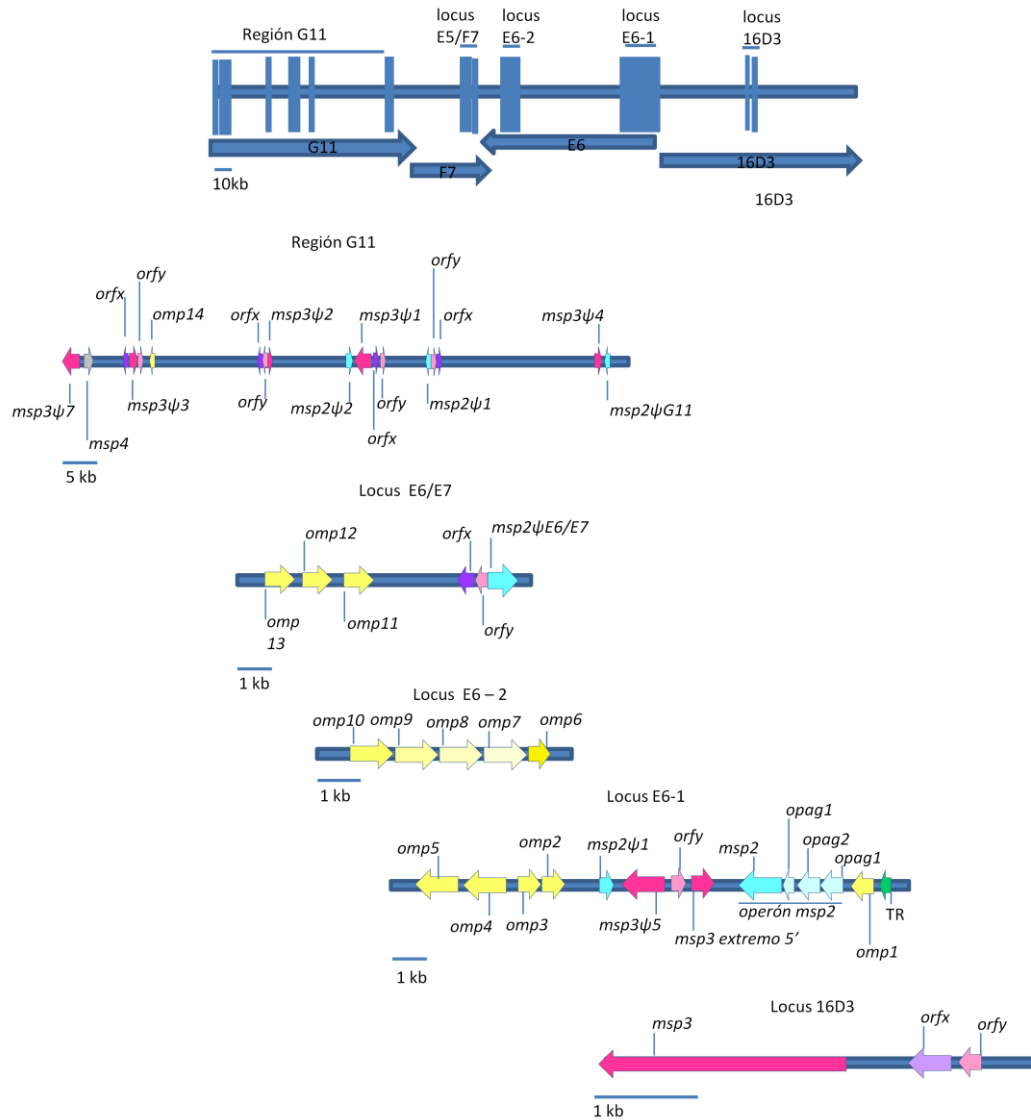


Figura 9. Representación gráfica de la superfamilia 2. (A) Distribución de integrantes de la superfamilia 2 la cual se detalla en los incisos B – F. (B) Operón de *msp3* que contiene a *orfx*, *orfy* y *msp3*. (C) locus en donde se localiza el operón *msp2* mostrando varios *omp*'s y pseudogenes así como *orfx* y un regulador transcripcional putativo (TR) (D) Operón putativo de cinco genes *omp*'s. (E) Operón putativo de *omp*'s situado cerca de un pseudogen de *msp2*. (F) En esta región se ilustra la posición de pseudogenes *msp2* y *msp3* con respecto a los genes *orfx* y *orfy*; también en esta región se encuentra *omp14* y *msp4* (Modificado de Brayton y cols, 2005).

A pesar de las diferencias a nivel de proteína, los genes *msh3* han mantenido una estructura similar a los genes *msh2*, con una región hipervariable flanqueada por secuencias altamente conservadas, pero la longitud y las secuencias son diferentes (Meeus y cols., 2003)

Anaplasma utiliza mecanismos de recombinación homóloga y este aspecto evolutivo posiblemente se debe al gen *mutL*, el cual codifica para una enzima asociada con la reparación de los apareamientos incorrectos del ADN. Al comparar esta secuencia con ortólogos en *Ehrlichia* spp se observó que el gen *mutL* de *A. marginale* tiene variaciones en la cantidad de guaninas (G) presentes en la secuencia, lo que en ocasiones resulta en el cambio del marco de lectura; generando una molécula inactiva. Los genomas que presentan defectos en la reparación del apareamiento erróneo de bases presentan elevadas tasas de mutación y recombinación, este evento es el que organismos como *A. marginale* y *A. phagocytophylum* requieren para tener un sistema de variación antigénica (Brayton y cols, 2005; Palmer y cols., 2009).

La región codificante del gen *msh4* se encuentra flanqueada por dos pseudogenes *msh3* localizados a 336 bp río arriba y otro a 4687 bp río abajo de *msh4*. Además el gen *RecA* se localiza entre estos pseudogenes como se sabe este gen está involucrado en la conversión génica.

Pseudogenes

El análisis del genoma completo de distintos organismos pertenecientes al orden de las *Rickettsias*, indica que estos organismos han sufrido una reducción evolutiva para simplificar los genomas y generalmente contienen muchos pseudogenes.

A. marginale tiene un genoma pequeño, típico de los miembros de este orden, contiene relativamente pocos pseudogenes “clásicos”, referidos como copias inactivas de un gen funcional. En la cepa St. Maries solamente hay cuatro genes (*murC*, *aspS*, *mutL* y *aatA*) que tienen interrumpidas las regiones codificantes,

aunque pudieran ser pseudogenes, la posible funcionalidad de éstos aún está por determinarse; en la cepa Florida el gen *aspS* se encuentra intacto. Estos cuatro genes presentan un uso de codón diferente al del resto de las CDS's (Dark y cols, 2009; Brayton y cols, 2005).

A. marginale contiene genes descritos como “pseudogenes funcionales”, lo que se refiere a copias de genes truncados que solamente se expresan como parte de una proteína funcional completa después de recombinarse en un sitio único de expresión. Este tipo de pseudogenes funcionales también se han descrito en *A. phagocytophilum*, no así en otros organismos clasificados en los *Rickettsiales* (Brayton y cols, 2005).

Distintas cepas de *A. marginale* presentan diferencias en la secuencia y localización de los pseudogenes. En los genomas se han identificado diferencias en la cantidad de pseudogenes dependiendo la cepa (Tabla 5 y Figura 10).

Tabla 5. Pseudogenes *msp2* comparados entre diferentes cepas de *A. marginale*.

	Florida <i>msp2</i>	Florida <i>msp3</i>	St. Maries <i>msp2</i>	St. Maries <i>msp3</i>	<i>A.centrale</i> <i>msp2</i>	<i>A.centrale</i> <i>msp3</i>
Florida	8/8	7/7	6/7	3/7	0/7	0/8
Florida-inducida	8/8	7/7	6/7	3/7	0/7	0/8
Florida-Okeechobee	4/8	2/7	3/7	2/7	0/7	0/8
Washington-O	2/8	0/7	2/7	0/7	0/7	0/8
Oklahoma	1/8	1/7	0/7	0/7	0/7	0/8
Virginia	6/8	2/7	4/7	2/7	0/7	0/8
Mississippi	1/8	0/7	2/7	0/7	0/7	0/8
Puerto Rico	8/8	3/7	6/7	2/7	0/7	0/8
South Idaho	2/8	0/7	7/7	7/7	0/7	0/8
St. Maries	6/8	3/7	7/7	7/7	0/7	0/8

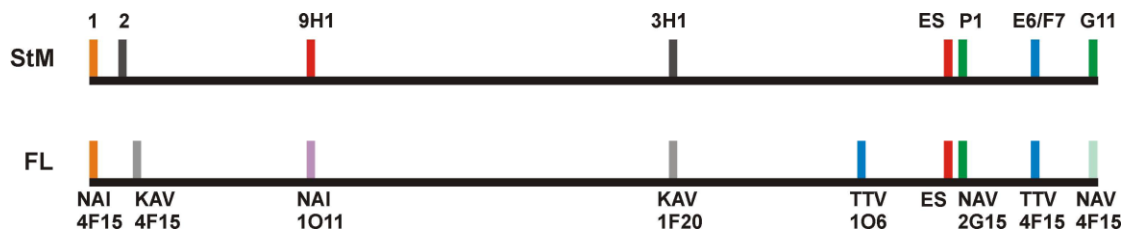


Figura 10. Localización de pseudogenes *msp2* en cepas de *A. marginale*. Comparación de las cepas St. Maries y Florida. El sitio de expresión (ES) presenta sintenia. Aunque los pseudogenes tienen variaciones en la secuencia (representada en diferentes colores) así como en la localización en el genoma, también varía la cantidad de pseudogenes que puede tener una cepa (en este ejemplo 7 vs 8). Algunos de los pseudogenes están duplicados y algunos se comparten entre las cepas (Dark y cols, 2009).

Los genomas completos de las cepas St. Maries, Florida, Mississippi, Virginia y Puerto Rico se analizaron mediante genómica comparativa con la finalidad de identificar diferencias que pudieran asociarse a rasgos fenotípicos y de nicho para formular estrategias de control. Sorpresivamente la comparación reveló que el genoma de *A. marginale* se puede considerar como “cerrado” ya que tiene muy pocas regiones de alta plasticidad, entre las que se encuentran los *loci* de los genes *msp2*, *msp3* y *aaap* (Dark y cols, 2009).

Mediante la comparación de las secuencias se identificó una considerable cantidad de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's de las siglas en inglés Single Nucleotide Polymorphism) y se determinó que entre la cepa Florida y las otras cuatro cepas St. Maries, Mississippi, Puerto Rico y Virginia existen 20,028 SNP's que se mantienen entre al menos dos de las cepas comparadas; los SNP's se encuentran distribuidos homogéneamente tanto en regiones codificantes como no codificantes (Dark y cols, 2009).

Dark y colaboradores (2009) sugieren que el genoma “cerrado” y la cantidad de SNP's identificados en esta bacteria intracelular son consecuencia del ambiente intracelular obligado que limita la oportunidad de intercambio genético y de la evolución reduccionista que pudiera estar sufriendo *A. marginale*. El incremento del número de SNP's genera un mecanismo de compensación que proporciona diversidad y dirige a la evolución de los organismos.

Características generales de proteínas principales de superficie (MSP's)

En las bacterias intracelulares las proteínas de membrana externa desempeñan funciones necesarias para la subsistencia, replicación y transmisión. En *A. marginale* la mayoría de estas proteínas están involucradas en las interacciones patógeno – hospedero tanto con células hospederas de vertebrados como de invertebrados; se ha determinado que en este microorganismo los genes que codifican para proteínas de superficie evolucionan más rápido que el resto de los genes, el incremento en la tasa de evolución es consecuencia de la presión selectiva ejercida por el sistema inmune de los hospederos (de la Fuente y cols., 2003c; Noh y cols., 2008). Estudios del transcriptoma de esta bacteria mediante secuenciación de ARN (RNA-seq) permitieron determinar que existen diferencias relacionadas con las condiciones de cultivo, los resultados mostraron que aproximadamente el 75% de las proteínas de superficie codificadas por las superfamilias *msh1* y *msh2* se encuentran sub-expresadas en cultivos celulares derivados de embriones de garrapatas con respecto a la expresión que muestran en el hospedero mamífero (Hammac y cols, 2014)

El estudio de las proteínas de membrana de *A. marginale* se ha centrado principalmente en seis proteínas (MSP's1a, MSP1b, MSP2, MSP4 y MSP5); algunas de estas forman complejos en la superficie del parásito.

Las proteínas MSP1a, MSP4 y MSP5 son codificadas por genes de copia única, y se mantienen tanto en eritrocitos bovinos, como en la garrapata; y en cultivos celulares derivados de embriones de garrapatas. Mientras que las otras tres MSP1b, MSP2 y MSP3 provienen de familias multigénicas que muestran variación antigénica (de la Fuente y cols., 2001a).

El complejo heteromérico de superficie MSP1 está compuesto por proteínas codificadas por dos genes localizados en *loci* diferentes (*msh1a* y *msh1b*); este complejo está constituido por las proteínas MSP1a y MSP1b unidas covalentemente por puentes disulfuro (Macmillan y cols, 2006). Dicho complejo es un elemento importante para la infección de *A. marginale* a las células de sus

hospedero ya que este participa en el proceso de adhesión a eritrocitos bovinos (McGarey y cols, 1994).

La proteína MSP1a tiene un peso molecular que oscila entre 70 – 105 kDa, la variación del peso molecular depende del aislado que se analice. La proteína se encuentra conservada entre las cepas de *A. marginale* con la excepción de un conjunto de repetidos en tándem que se encuentran localizados en la región NH₂-terminal de la proteína (Oberle y cols., 1988; Brayton y cols, 2005). MSP1a posee cinco regiones trans-membranales y la región amino terminal es la única que se encuentra expuesta extracelularmente (de la Fuente y cols, 2001a).

La proteína MSP1b es codificada por la familia polimórfica *msp1β*; la cual está conformada por dos genes completos (*msp1β1* y *msp1β2*) y tres genes parciales (*msp1βpg1*, *msp1βpg2* y *msp1βpg3*); la comparación de secuencias del gen en distintas cepas de *A. marginale* muestra que hay diferencias entre estas (Camacho-Nuez y cols., 2000). La proteína MSP1b participa en el proceso de adhesión, pero únicamente a los eritrocitos, ya que es incapaz de unirse a las células de garrapata (de la Fuente y cols, 2001a). El complejo MSP1 se analizó mediante espectrometría de masas, lo que permitió determinar que solamente MSP1b1 se encuentra presente en el complejo (Macmillan y cols, 2006; Hammac y cols, 2014). Mediante análisis de ARNm (ARN mensajero) se determinó que los dos genes completos de *msp1β* codifican para productos polipeptídicos, los tres genes parciales al parecer se generaron por eventos de recombinación segmental de genes completos (Macmillan y cols., 2008).

Probablemente MSP2 y MSP3 se originaron de un ancestro común, pero desde su surgimiento los genes codificantes han diferido substancialmente. El promedio de identidad a nivel de aminoácidos (aa) entre MSP2 y MSP3 es de 38%, mientras que entre MSP2 y sus pseudogenes es del 78% y entre MSP3 y sus pseudogenes del 68% (Meeus y cols, 2003).

La proteína MSP2 tiene un peso molecular de 40 - 45 kDa con variantes definidas por una región hipervariable central que se encuentra flanqueada por extremos amino y carboxilo terminal que están altamente conservados. En *A.*

phagocytophilum, *A. centrale* y *A. ovis* se han identificado ortólogos de esta proteína (Meeus y cols, 2003).

La región hipervariable de MSP2 se extiende entre 95 -100 aa y contiene epítomos expuestos en la superficie del organismo que son únicos en la variante emergente, por lo que no hay reconocimiento por los anticuerpos (ab de las siglas en inglés antibodies) cuando los epítomos de *msh2* son reconocidos por el sistema inmune, las bacterias comienzan a ser controladas, pero *A. marginale* expresa nuevas variantes de *msh2* modificando la región hipervariable del sitio de expresión. La región hipervariable cambiará constantemente a lo largo de la infección; esta estrategia le permite a *A. marginale* evadir la respuesta inmune y establecer infecciones persistentes en el hospedero bovino (French y cols, 1999; Meeus y cols, 2003).

La comparación de *msh2* (sitio de expresión y pseudogenes) de *A. marginale* y *A. phagocytophilum* con ortólogos de *Ehrlichias* reveló que existe sintenia entre los genes de las especies; pero en *E. rumiantum*, *E. canis* y *E. chaffeensis* se identificó que los pseudogenes de *msh2* se encuentran arreglados en tándem en la secuencia del sitio de expresión (*E. rumiantum* y *E. chaffeensis*) o en dos loci que contienen 16 – 25 parálogos (*E. canis*) a diferencia de *Anaplasma* en la que la distribución del repertorio de pseudogenes es a lo largo de todo el genoma (Barbet y cols., 2003; Brayton y cols, 2005).

La proteína MSP3 pesa entre 80 – 90 kDa y puede presentar variaciones en su masa molecular (hasta 15 kDa), carga y la reactividad con algunos anticuerpos (Meeus y cols, 2003). Al igual que la proteína MSP2, MSP3 varía constantemente en respuesta al sistema inmune y está involucrada en el establecimiento de la persistencia de la enfermedad (Meeus y cols, 2003).

El polipéptido MSP4 tiene un peso molecular de 31 kDa; se encuentra en la superficie de los cuerpos iniciales del microorganismo. Este polipeptido se ha identificado en múltiples cepas *A. marginale* así como de *A. centrale* (Oberle y cols., 1993). La función de MSP4 de *A. marginale* aún está por esclarecerse pero se sabe que es una proteína inmunogénica y presenta variación entre aislados;

por lo que se ha utilizado para realizar estudios filogenéticos (de la Fuente y cols, 2003c; Vidotto y cols., 2006).

La proteína MSP5 de 19 kDa se encuentra conservada en diversas cepas de *A. marginale*, *A. ovis* y *A. centrale* lo que sugiere que es una proteína esencial para la vida del parásito y lo que permite utilizarla como antígeno para diagnóstico molecular mediante ensayos de cELISA. (Torioni de Echaide y cols., 1998).

ESTADO DEL ARTE

Diversidad genómica entre aislados de *A. marginale*

La amplia diversidad de los aislados de *A. marginale* localizados en diferentes regiones del mundo; permitió identificar diferencias morfológicas, de secuencia de proteínas y antigénicas (reconocimiento inmunogénico con anticuerpos de bovinos). Los aislados de esta bacteria se clasifican en genotipos considerando el número de repetidos en tandem que contiene cada aislado y la secuencia de los mismos (McGuire y cols., 1984; de la Fuente y cols, 2001a; Ueti y cols., 2009). Cada genotipo puede contener de 1 - 10 repetidos; cada uno de los cuales está constituido por entre 23 – 31 aminoácidos; los repetidos son ricos en serinas y treoninas (Oberle y cols, 1988; McGarey y cols, 1994; Cabezas-Cruz y cols, 2013).

Las variaciones en los genotipos de *A. marginale* pudieran deberse al deslizamiento incorrecto de la polimerasa, que generaría la diversidad en la cantidad de los de repetidos, el orden y la secuencia de los mismos conformando la diversidad de los repetidos en tándem de MSP1a (Allred y cols., 1990). Cada uno de estos repetidos ha sido designado con una letra del alfabeto, número o símbolo griego; por ejemplo, en la cepa St. Maries, la región de repetidos en tándem del gen *mSP1a* está constituido por tres repetidos designados J/B/B (de la Fuente y cols., 2003a; Allred y cols, 1990; Almazan y cols, 2008; Futse y cols., 2003). Los repetidos en tandem pueden contener unidades idénticas (repetidos homogéneos) unidades mezcladas (repetidos heterogéneos) o motivos de secuencias repetidas degeneradas (Figura 11A) (van Belkum y cols., 1998).

La proteína MSP1a se ha empleado como un marcador genético ya que la secuencia de los repetidos en tándem se mantiene estable a lo largo de la infección aguda, persistente e incluso después de ser transmitida por la garrapata, así como en cultivo celular (Barbet y cols., 1999; Cabezas-Cruz y cols, 2013). Así mismo, epítomos sensibles a neutralización por anticuerpos han sido identificados en todos los repetidos de MSP1a de *A. marginale* (Palmer y cols., 1987; de la Fuente y cols, 2001a). Los epítomos para células B se localizan en las regiones (Q/EASTTSS) y (SSAGGQQQESS) de los repetidos, estas regiones están

conservados entre las cepas y son inmunodominantes (Figura 11B) (Allred y cols, 1990; Cabezas-Cruz y cols, 2013).

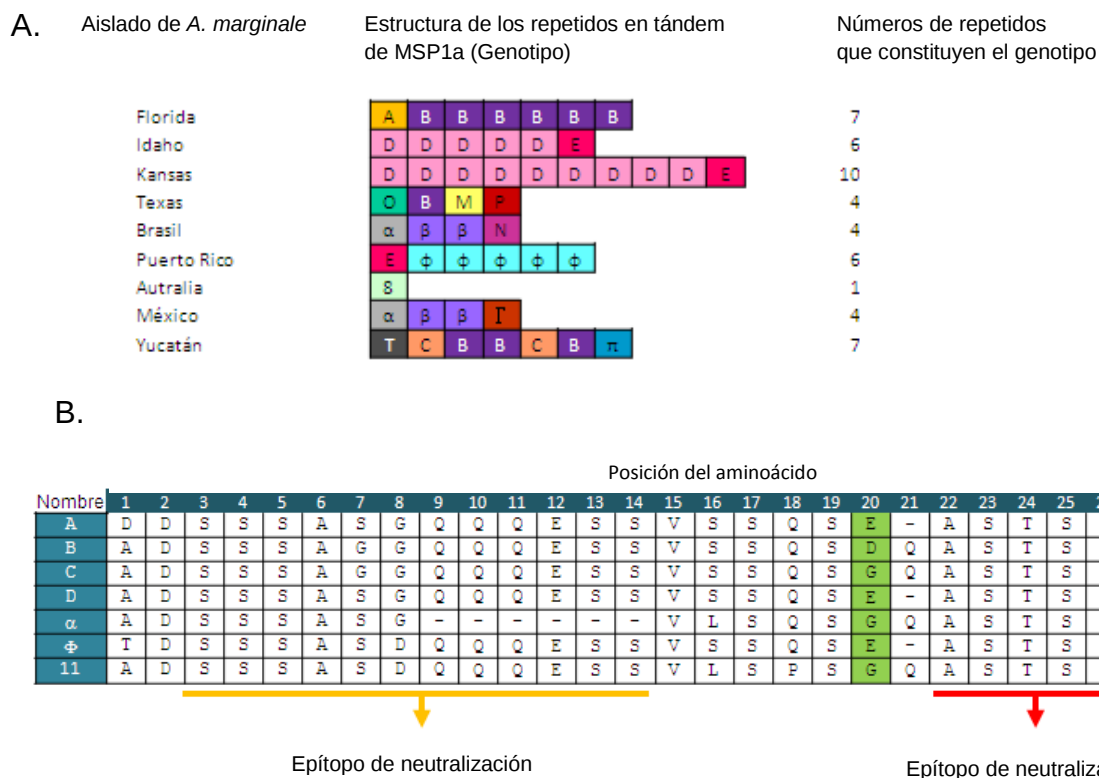


Figura 11. Ejemplos de algunas secuencias de los repetidos en tándem de MSP1a (A) en algunas cepas de *A. marginale*; combinaciones de los repetidos para reconstituir el genotipo de los aislados (Modificado de de la Fuente y cols., 2007b). (B). Secuencias de repetidos en donde de resalta el aminoácido de la posición 20 en el cual los cambios de en las secuencias se atribuyen a diferencias en la adhesión a células blanco; se resalta la región en donde se localizan 2 epítipos de neutralización con anticuerpos; los cuales se encuentran conservados entre los repetidos (Modificado de Allred y cols, 1990).

El grupo de investigación de De la Fuente se ha reportado que los repetidos de MSP1a participan en procesos de adhesión tanto a eritrocitos como a células del epitelio intestinal y glándulas salivales de las garrapatas, además de que MSP1a presenta sitios susceptibles a O-glicosilaciones en residuos de Serina (S) y Treonina (T) localizados en los repetidos, este tipo de modificaciones están asociadas con adhesión a las células blanco. El aminoácido localizado en la posición 20 de cada uno de los repetidos ha sido reportado como determinante e

importante para la adhesión a células de garrapata (de la Fuente y cols, 2003a; Garcia-Garcia y cols, 2004).

La diversidad entre las secuencias de los repetidos en tándem de MSP1a ha permitido identificar hasta el momento más de 193 variantes, cambios en la secuencia de aminoácidos se han atribuido a modificaciones estructurales en la proteína. El modelaje de la estructura secundaria de las variantes de los repetidos de MSP1 permitió identificar 14 modelos diferentes que describen la estructura 2D, la mayoría de los modelos de los repetidos muestran α -hélices pero éstas difieren en longitud, número y localización; algunos de los repetidos no forman α -hélices (Figura 12) (Cabezas-Cruz y cols, 2013).

Las secuencias de los repetidos de MSP1a pueden proporcionar información de *A. marginale* relacionada con la distribución de las cepas, la transmisibilidad de estas con diferentes especies de garrapatas, el potencial de infectividad y de variabilidad antigénica (Cabezas-Cruz y cols, 2013).

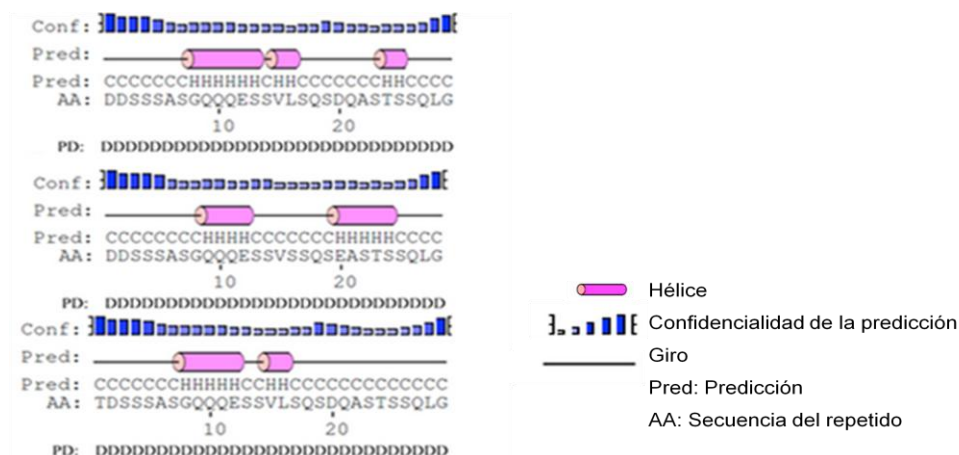


Figura 12. Representación gráfica de la estructura 2D de algunos repetidos de MSP1a. Secuencias de los repetidos reportados hasta 2012 se analizaron con software para la predicción de la estructura de los mismos; 14 modelos diferentes fueron identificados entre los cuales se pueden clasificar las 170 variantes incluidas en el trabajo arriba mencionado. (Modificado de Cabezas-Cruz y cols. 2013).

Modificaciones en la estructura de *msp1 α* y su asociación con la transmisión

A pesar de que los cambios en la secuencia de aminoácidos de los repetidos de MSP1a se han asociado con la eficiencia de las cepas de *A. marginale* para ser transmitidas por las garrapatas, existen reportes que sugieren que todas las cepas de *A. marginale* pueden ser transmitidas por el vector biológico siempre y cuando esté presente la especie de garrapata adecuada para la cepa de este microorganismo (Brayton, 2012; Cabezas-Cruz y cols, 2013). Muchas de las cepas de *A. marginale* que se han clasificado como no transmisibles por garrapatas han sido analizadas *in vitro* con las especies de garrapatas *D. andersoni* o en *R. microplus*, pero recordemos que éstas no son las únicas especies de garrapatas capaces de transmitir al microorganismo. Incluso en una población de garrapatas *D. andersoni* se aprecia diferente susceptibilidad a la infección con distintas cepas de *A. marginale* (Scoles y cols., 2005b; Brayton, 2012).

Diversas cepas de *A. marginale* han sido empleadas para determinar si las especies de garrapatas (*D. andersoni* o *R. microplus*) son capaces de transmitir las, por ejemplo, las cepas St. Maries, Virginia EM ϕ , South Idaho establecen infecciones en los órganos de *D. andersoni* y son transmitidas eficientemente a los hospederos mamíferos. La cepa Puerto Rico además de ser transmitida por *D. andersoni* también es transmitida eficientemente por las especies *R. microplus* y *R. annulatus* (Eriks y cols., 1994; Scoles y cols., 2007).

Este tipo de estudio también ha identificado cepas que no se transmiten con las tres especies de garrapatas arriba mencionadas como la cepas Florida, Mississippi e Israel (Brayton, 2012). La cepa Florida no es transmitida por las especies de garrapata *D. andersoni*, *D. variabilis*, *R. microplus* o *R. annulatus*, (Scoles y cols, 2007). La cepa Florida es incapaz de establecer infección en las células epiteliales del intestino de estos organismos. Estudios *in vivo* han evidenciado la presencia de esta cepa en los intestinos inmediatamente después de que se ha alimentado la garrapata, sin embargo, no se detectan ciclos de

replicación en este epitelio. La cepa Illinois tampoco es transmitida por garrapatas de la especie *D. andersoni* (Ueti y cols, 2007).

Por otra parte la cepa *A. marginale subsp. centrale* es capaz de colonizar el epitelio medio del intestino de la garrapata especie *D. andersoni* pero con baja eficiencia; e incluso se evidenció la infección de las glándulas salivales, pero los artrópodos no transmitieron a la cepa al alimentarse de bovinos (Ueti y cols, 2007). *A. centrale* es transmitida eficientemente por garrapatas de la especie *R. simus* las cuales se encuentran distribuidas en África (OIE Terrestrial Manual 2012).

La predominancia espacio - temporal de ciertas cepas de *A. marginale* depende de la población de hospederos “disponibles” por ejemplo cepas seleccionadas por ciertas características del vector (Ueti y cols, 2009).

Variación antigénica y persistencia en el hospedero vertebrado

La variación antigénica es un proceso que permite a un patógeno evadir la respuesta inmune del hospedero evitando así su eliminación, incluso en hospederos inmunológicamente competentes. Ésta es una estrategia empleada comúnmente por patógenos con genomas pequeños, desde virus de ARN hasta parásitos eucariotes (Palmer G.H y col., 2007).

A. marginale tiene un genoma pequeño; a pesar de esto, es capaz de generar suficientes variantes antigénicas mediante la recombinación de los pseudogenes en el único sitio de expresión de *mvp2*, al igual se ha reportado para el gen *mvp3* (Brayton K.A. y col., 2005; Palmer G.H. y col., 2007). La persistencia maximiza el potencial de transmisión, ya que la presencia de las garrapatas y su alimentación se encuentra afectada por las condiciones climáticas y de estación. A diferencia de otras *omp's* de *A. marginale*, *mvp2* y *mvp3* contienen un sitio único de expresión pero múltiples alelos distribuidos a lo largo del cromosoma. Los alelos se encuentran en *loci* silenciosos, carecen de promotor y de elementos de regulación;

contienen un dominio central de *msp2* o *msp3*, que se encuentra flanqueado por extremos 5' y 3' conservados que son similares a los del sitio de expresión. Esta estructura facilita la eficiencia de recombinación entre los alelos silenciosos y el sitio de expresión; cada alelo codifica para un dominio extracelular único de *msp2* /*msp3*; estos dominios resultan ser altamente inmunodominantes dentro de la secuencia completa de MSP2 y MSP3 y entre las demás OMPs (Ueti y cols., 2012).

Los anticuerpos inducidos contra las variantes de MSP2/MSP3 se detectan solamente después de los picos de bacteremia, resultando en la eliminación de solo algunas variantes específicas de la población. La recombinación de nuevos alelos localizados en sitios silenciosos dentro del sitio de expresión vía conversión génica, resulta en la expresión de nuevas variantes con dominios centrales únicos denominados regiones hipervariables (HVR de las siglas en inglés Hypervariable regions) que permiten escapar de la respuesta inmune (French y cols., 1998; French y cols, 1999). Con el tiempo esto resulta en la inducción de una población de anticuerpos que reconocen un amplio repertorio de variantes MSP2 y MSP3. La capacidad de *A. marginale* para establecer infecciones persistentes no se puede limitar al número de alelos de *msp2/msp3*, menos de 10 alelos por genoma (Dark y cols, 2009; Futse y cols., 2009). Un segundo mecanismo para generar variantes ha sido descrito, en éste solamente segmentos de oligonucleótidos de los alelos, más que el alelo completo, se recombinan en el sitio de expresión. Este proceso de conversión génica por segmentos genera una variante génica única expresada en el sitio de expresión y no por un alelo individual del *locus* silencioso (Figura 13) (French y cols, 1998; French y cols, 1999). Con esta estrategia una HVR puede derivarse de hasta 4 alelos donadores, esto combinado con la diversidad intrínseca de las HVR que codifican los alelos, puede generar desde cientos hasta miles de variantes para mantener la persistencia de por vida.

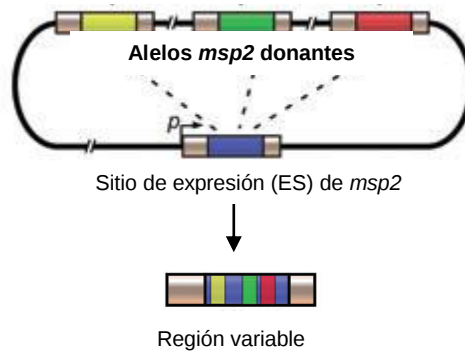


Figura 13. Representación de la conversión génica que se experimenta en el sitio de expresión de *msp2* para la generación de variantes antigénicas que permitirán la evasión de la respuesta inmune. Las combinaciones pueden ser de un segmento completo o bien de fragmentos de diferentes pseudogenes (Palmer y cols, 2009).

La fase temprana de la anaplasmosis, especialmente en los 2 primeros meses post- infección, se caracteriza por la expresión de variantes simples, derivadas de un solo evento de recombinación del alelo competente (o un solo segmento) desde el locus silencioso. Sin embargo, conforme la respuesta inmune va reconociendo las variantes, se incrementa la complejidad de las mismas a través de múltiples conversiones de segmentos de los genes *msp2* y/o *msp3* utilizando múltiples alelos. Es evidente que la progresión de variantes está mediada por la presión inmune del hospedero mamífero, ya que cuando la presión es eliminada, por ejemplo al transmitirse a un hospedero libre de infección, el organismo que expresaba variantes complejas, revierte a expresar nuevamente variantes simples o sencillas, estableciendo una bacteremia aguda (Palmer Brayton, 2013).

El efecto de la presión ejercida por el hospedero mamífero para la generación de variantes complejas, se evidencia en garrapatas alimentadas de un bovino infectado en fase persistente, durante la cual el microorganismo expresa variantes complejas. La garrapata adquiere al organismo *A. marginale* y rápidamente re-emergen las variantes simples de *msp2* en los intestinos de las garrapatas (Palmer Brayton, 2013).

Superinfección

Una superinfección se establece cuando una segunda cepa de un patógeno genéticamente distinta infecta un hospedero que ya se encuentra infectado con una cepa de la misma especie. La segunda cepa debe tener la capacidad de evadir la respuesta inmune generada por la primera cepa. Este evento ha sido descrito en patógenos virales, bacterianos y protozoarios, por ejemplo, en *E. chaffeensis* se han reportado ciervos infectados con más de 3 cepas (Varela-Stokes y cols., 2006). En otro estudio en humanos se han encontrado infecciones mezcladas con al menos dos genotipos de *Trypanosoma brucei* (Koffi y cols., 2007)

En el caso de *A. marginale* la variación de solo un alelo de *mSP2* le permite a la segunda cepa establecer la infección. Esto se evidenció en condiciones controladas al seleccionar cepas de *A. marginale* que divergían solamente en un pseudogen de *mSP2*, y estas fueron capaces de establecer la infección en el mismo bovino (Futse y cols, 2009). La superinfección de *A. marginale* se puede establecer cuando la segunda cepa codifica un repertorio antigénicamente variable de MSP2, que le permite escapar de la respuesta inmune generada en contra de la primera cepa. Una vez que la segunda cepa se ha establecido, ambas son mantenidas y establecen un reservorio para su subsecuente adquisición por el vector biológico y continuar su transmisión; se ha observado que tanto los bovinos como las garrapatas pueden ser superinfectados (Leverich CK 2008). Las consecuencias epidemiológicas de la superinfección dependen de la capacidad de diferentes cepas para sobrevivir y transmitirse a un nuevo hospedero.

Las variantes de *mSP2* provenientes de diversos aislados fueron comparadas y en las secuencias se identificaron tres microdominios hipervariables separados por pequeños elementos altamente conservados (Figura 14). Los aminoácidos de los extremos NH₂- y -COOH terminal de MSP2 son hidrofóbicos y forman estructuras tipo barriles β que se encuentran conservados entre todas las variantes, se conoce además que estas regiones son poco inmunogénicas; y que se encuentran

flanqueando una región de la proteína que es hidrofílica, que por el contrario es altamente inmunogénica. (Figura 14) (Ueti y cols, 2012).

La secuencia de los aminoácidos conservados entre los tres microdominios hipervariables permite comprender el fundamento de la conversión génica de segmentos de los pseudogenes *msp2* en la región central del gen, que dan lugar a una variante alélica única de MSP2 (Ueti y cols, 2012).

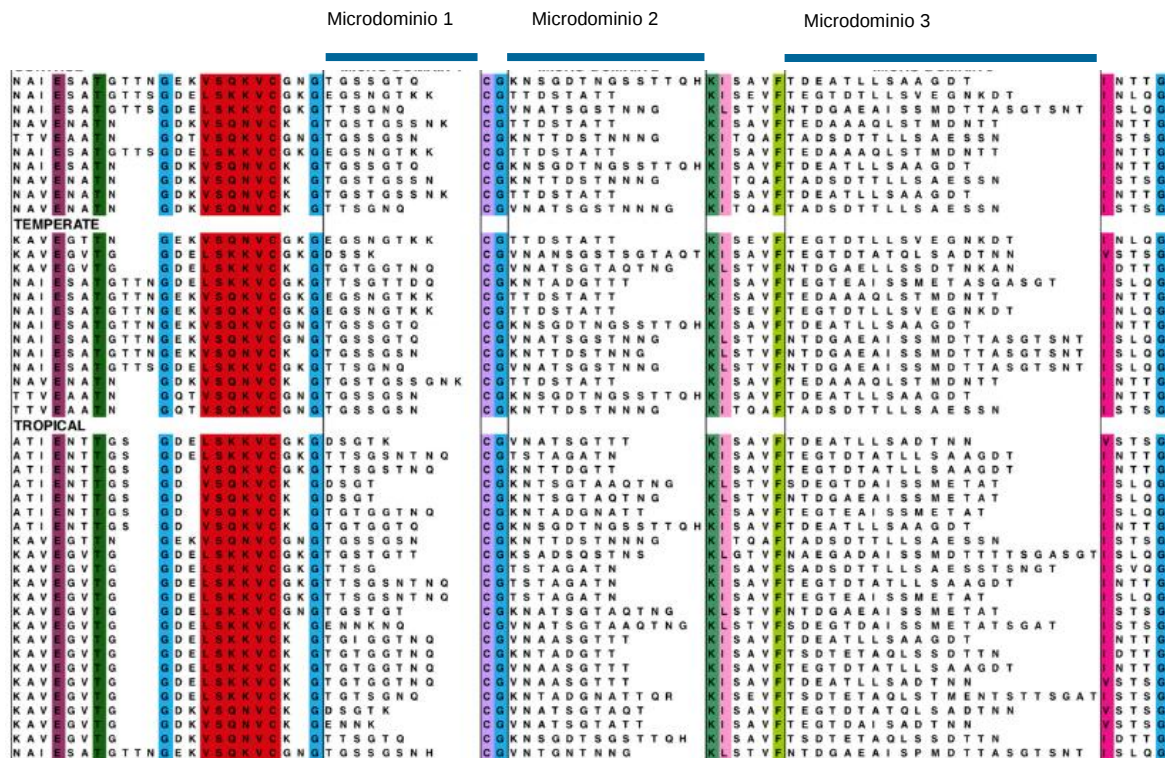


Figura 14. Alineamiento de las variantes alélicas de MSP2. Identificación de microdominios hipervariables y oligopéptidos conservados (en recuadros de colores). Los microdominios se encuentran señalados en la parte de arriba. Las secuencias reportadas fueron obtenidas de muestras de diversas regiones geográficas (Ueti y cols, 2012).

Las regiones conservadas localizadas entre los microdominios se han asociado con el reconocimiento de los pseudogenes para realizar la conversión génica de segmentos dentro del ES, para la generación de las variantes antigénicas y se sugiere que estos pequeños elementos conservados presentes entre los microdominios son responsables del mantenimiento de la función y de la localización en la membrana de la proteína MSP2.

II. JUSTIFICACIÓN

La Anaplasmosis bovina es una enfermedad distribuida a nivel mundial que ocasiona pérdidas millonarias al sector ganadero. Actualmente no existe una estrategia que resulte completamente efectiva para el control de la enfermedad. La diversidad génica que existe entre los aislados es una de las razones que ha dificultado el desarrollo de una vacuna capaz de bloquear la infección con este microorganismo.

Existe una gran cantidad de cepas de *Anaplasma marginale*, hasta el momento más de 100 cepas genéticamente diferentes han sido identificadas; además de que se continúa identificando y reportando nuevos genotipos. La diversidad genotípica de *A. marginale* ocurre en un contexto genómico completamente cerrado, en el que el contenido de genes se encuentra altamente conservado entre cepas. Al comprender los mecanismos y las presiones que moldean la estructura genética de esta bacteria se entenderán los patrones de emergencia, predominancia y re-emergencia de cepas.

III. HIPÓTESIS

Existe un aislado dominante dentro de los hatos de estudio, cuya diversidad en el repertorio de *msh2* podría estar asociado a la transmisión y persistencia de la enfermedad.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

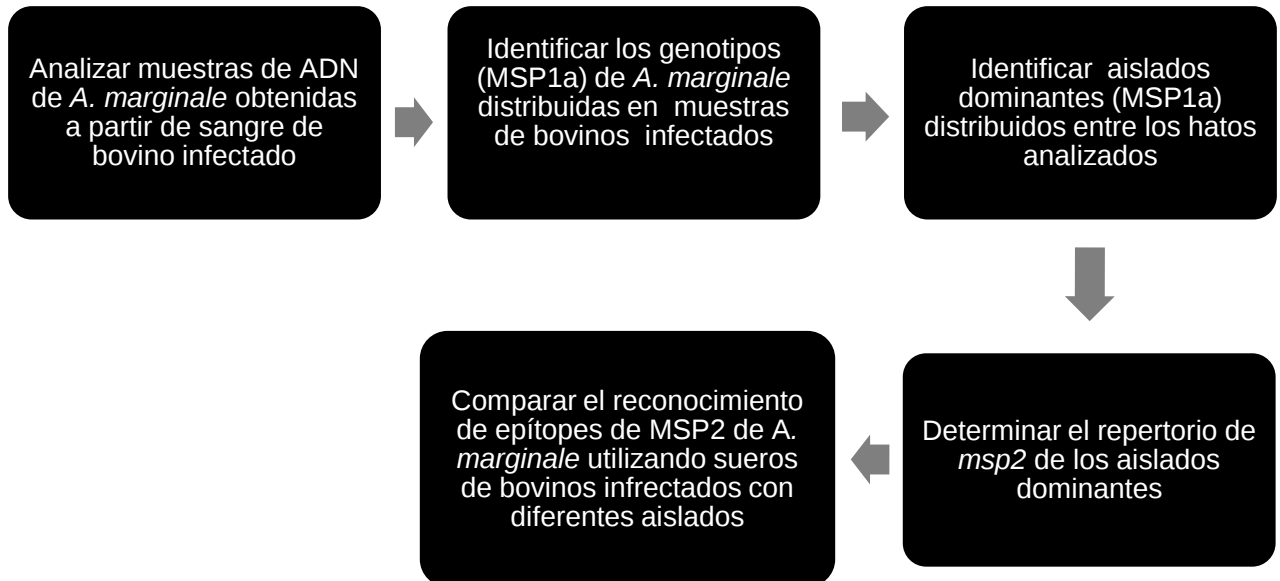
Identificar diferencias génicas entre aislados de *A. marginale* en los hatos de estudio asociadas con la transmisión y mantenimiento de las cepas.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

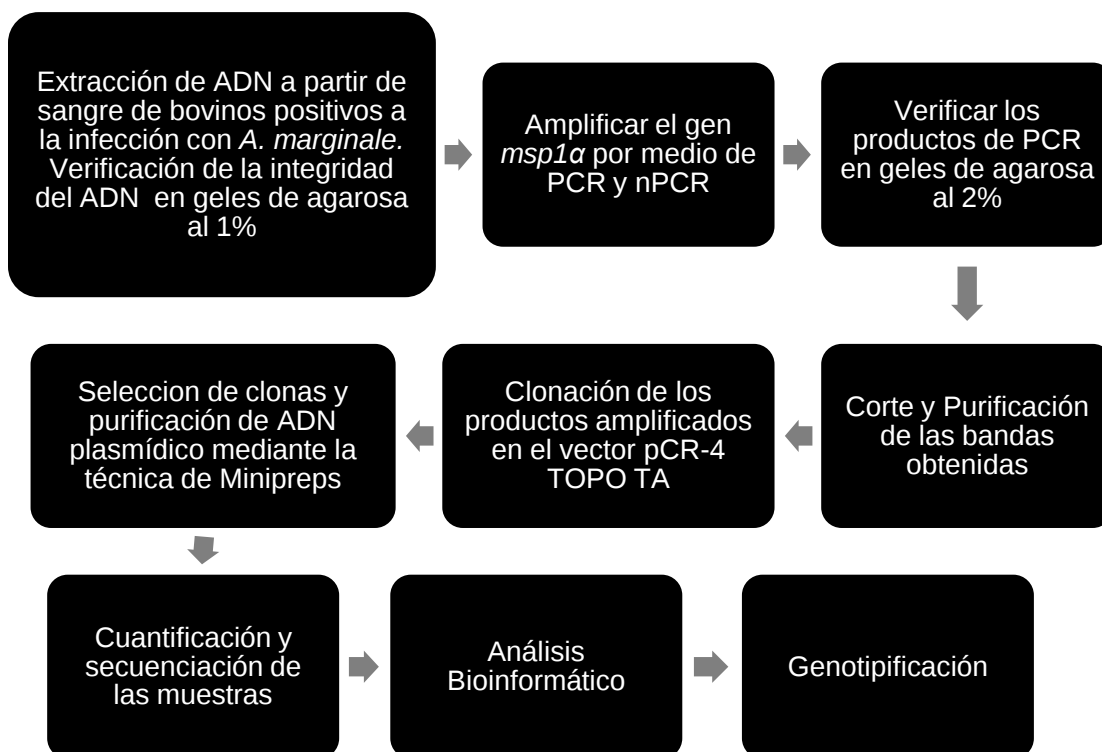
- Identificar los genotipos distribuidos entre animales crónicamente infectados con *A. marginale* en dos hatos localizados en regiones de alta endemicidad.
- Determinar aislados dominantes de *A. marginale* en los hatos analizados.
- Determinar si existe asociación entre la superinfección y la prevalencia de la infección en los hatos de estudio.
- Obtener el repertorio de pseudogenes de *msh2* de las cepas dominantes y comparar con los repertorios de otras cepas.
- Identificar las diferencias en el reconocimiento de las secuencias de aminoácidos MSP2 por sueros de animales naturalmente infectados.

V. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL

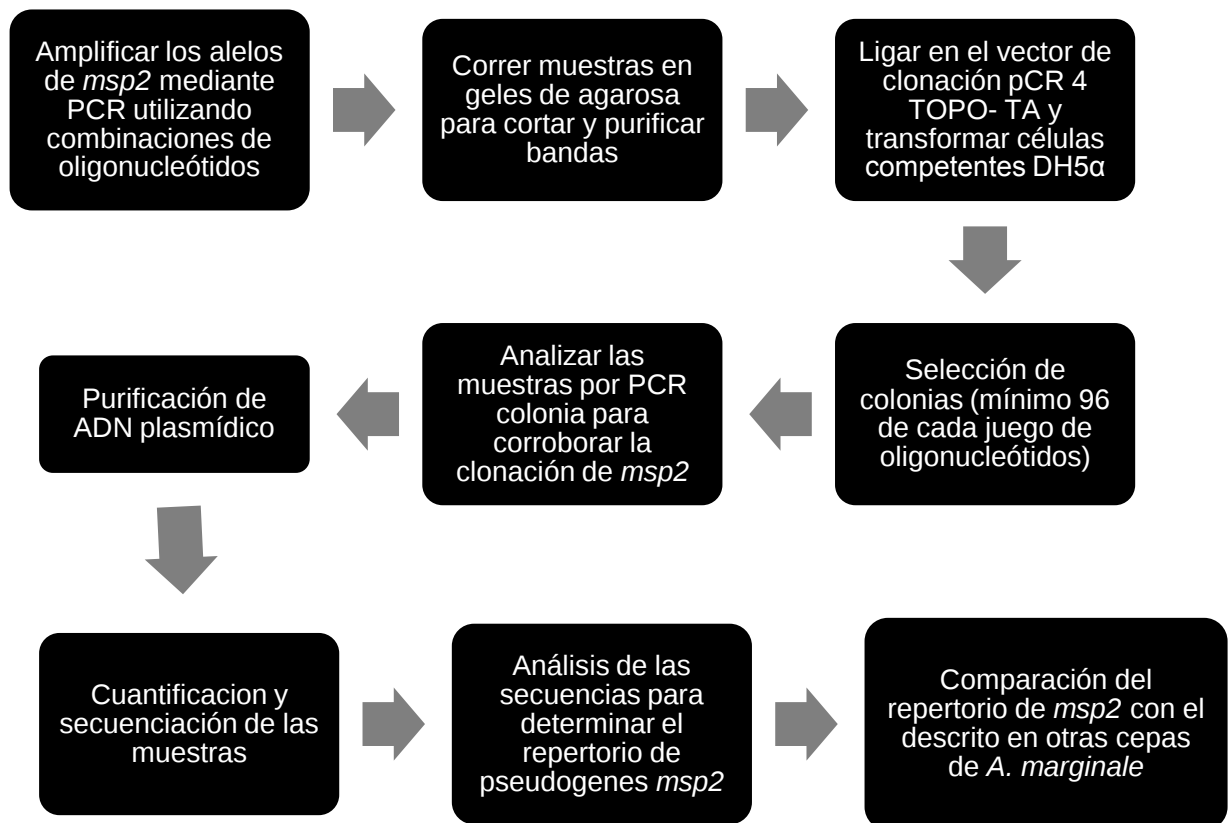
General



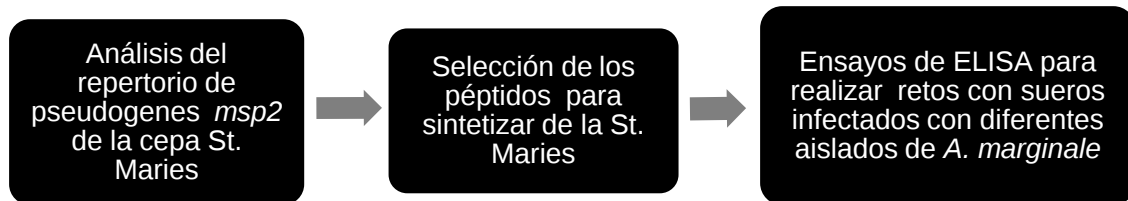
Objetivos 1, 2 y 3. Genotipificación de aislados de *A. marginale* obtenidos de animales de campo para identificar aislados dominantes dentro de la población de estudio. En base a los niveles de infección determinar la prevalencia de la Anaplasmosis bovina y su asociación con la superinfección.



Objetivo 3 Identificación del repertorio de pseudogenes de *msp2*



Objetivo 4. Determinar del reconocimiento de las secuencias *msp2* de la cepa tipo de *A. marginale* con sueros de bovinos infectados con otros aislados de la bacteria.



VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las muestras

Las muestras de sangre de bovinos jóvenes, con edades entre los 8 – 12 meses, fueron obtenidas de dos ranchos de México.

El rancho “El Verdineño” se encuentra localizado en el municipio de Ixcuintla, Nayarit. Este rancho es una estación del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en donde predomina un clima tropical seco, con una temperatura promedio de 26.3 °C y aproximadamente 1379.4 mm. de lluvia anual. El rancho “La Joya” se encuentra localizado en Tapalpa, Jalisco con clima medio tropical, con temperatura promedio de 16.2 °C y precipitación pluvial de 907.1 mm por año (semarnat.com.mx). Las muestras de sangre se colectaron en tubos vacutainer complementados con EDTA (Ácido Etilendiamino-tetra-acético). Mientras que los sueros fueron separados de la sangre total por centrifugación, 1800 x g por 15 minutos a 4 °C, para eliminar el plasma y el paquete celular. Ambos tipos de muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Diagnóstico de la infección con *A. marginale*

Las muestras de sueros obtenidas a partir de sangre total perteneciente a bovinos de campo se analizaron mediante el ensayo de cELISA utilizando el Kit comercial Anaplasma antibody (VMRD®, Pullman Washington; USA) siguiendo las instrucciones del proveedor; pero en algunos casos las muestras pueden ser diagnosticadas negativas, si la infección se acaba de establecer y no se han generado anticuerpos contra el microorganismo por lo que el diagnóstico se confirmó mediante amplificación del gen *msp5* de *A. marginale* utilizando PCR convencional y/o PCR semianidado cuando los niveles de parásitos es muy baja.

Extracción de ADN de *A. marginale*

El ADN de *A. marginale* se extrajo a partir de sangre congelada utilizando el kit comercial Puregene (Gentra Systems, Minneapolis, Minnesota; USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, a 300 µl de solución de lisis para células rojas se le adicionaron 100 µl de sangre de bovino, las muestras se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10,000 x g. Los sobrenadantes se retiraron por decantación y las pastillas obtenidas se resuspendieron con vortex, posteriormente se adicionaron, 450 µl de buffer de lisis celular y 50 µl de Proteinasa K [2 mg/ml] (Invitrogen, Carlsbad, California; USA); las muestras se incubaron a 56 °C durante toda la noche. Las proteínas presentes en las muestras fueron removidas utilizando la solución de precipitación. El ADN se precipitó adicionando isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri USA) el mismo volumen que el obtenido de la muestra; la pastilla se lavó con etanol al 70% y se dejó secar durante 20 minutos a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en solución para la hidratación del ADN. Las muestras se almacenaron a -20 °C. La integridad del ADN se analizó en geles de agarosa al 1%; la muestra se cargo al gel con RedGel (The Biloogy Cro, Piscataway, New Jersey USA) que funciona como buffer de carga y como sustituto de Bromuro de etidio.

Determinación del Genotipo *msp1α* de *A. marginale*

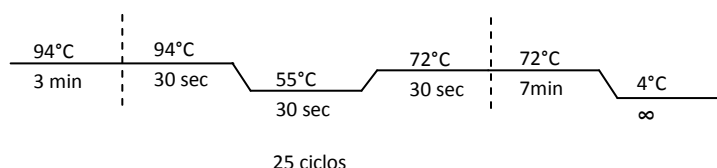
Para determinar el genotipo de cada muestra se amplificó una región del gen *msp1α*, a partir de ADN de *A. marginale* obtenido de sangre de bovinos infectados. Los oligonucleótidos empleados permiten amplificar los repetidos en tándem de *msp1α* localizados en el extremo 5' del gen (Tabla 6). Un total de 61 muestras obtenidas de diferentes bovinos fueron sometidas a amplificación con PCR convencional; considerando que algunas de las muestras presentaban una parasitemia muy baja se realizaron PCR semi-anidados.

Tabla 6. Lista de oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *msp1α*.

Nombre del Oligonucleótido	Secuencia	Tm (°C)
Oligonucleótido sentido: MSP1aF	5'-GTG CTT ATG GCA GAC ATT TCC-3'	
Oligonucleótido anti-sentido: MSP1aR	5'-CTC AAC ACT CGC AAC CTT GG-3'.	55
Oligonucleótido sentido interno: MSP1aNF	5'-GCG CAT TAC ACG TTC CGT ATG-3'	55

Para las reacciones de PCR se utilizaron 25 µl de Master Mix (Roche, Mannheim, Alemania) 1.0 µl de cada uno de los oligonucleótidos con una concentración final de 20 µM (sentido y anti-sentido), aproximadamente 100 ng de ADN y agua para completar un volumen final de 50 µl. Como control positivo se utilizó una muestra de ADN infectada con *A. marginale*, como control de reacción se utilizó agua. Para el PCR semi-anidado, las condiciones fueron similares a las arriba mencionadas pero como templado se utilizó el producto del PCR convencional y los oligonucleótidos empleados incluían al sentido interno y el reverso que se empleó en la reacción convencional.

Las condiciones del ciclado fueron:



Las reacciones de amplificación se realizaron en el termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Los productos amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 2% utilizando RedGel (The Biloogy Cro, Piscataway, New Jersey USA). Todos los geles se fotodocumentaron con el programa Quantity One de BioRad.

Cada una de las bandas amplificadas se cortó del gel con bisturí y se purificó utilizando el kit comercial QIAEXII (QIAGEN). A continuación se describe el protocolo brevemente: se determinó el peso de la agarosa que contenía el fragmento de *msp1α* amplificado, se adicionaron 3 volúmenes del buffer de disolución QX1 a la muestra y 10 µl de la suspensión QIAEXII previamente agitada con vortex para homogeneizar. Las muestras se incubaron en multi-bloque de

calentamiento (LabLine) a 50°C durante 10 minutos para permitir la disolución de la agarosa, dando vortex cada 2 minutos durante el tiempo de incubación. Las muestras se centrifugaron durante 30 segundos a velocidad máxima, se retiró el sobrenadante y nuevamente se adicionaron 500 µl de la solución QX1 para resuspender la pastilla y eliminar los remanentes de agarosa. Una vez más, las muestras se centrifugaron y se eliminaron los sobrenadantes; las pastillas se lavaron 2 veces con 500 µl de la solución buffer PE Wash suplementada con etanol grado molecular (Sigma – Aldrich Saint Louis MO, USA); la pastilla se resuspendió y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Las pastillas se secaron a temperatura ambiente.

Posteriormente, se adicionaron 20 µl de agua y las pastillas se resuspendieron con ayuda de vortex, las muestras se volvieron a centrifugar y el sobrenadante se transfirió cuidadosamente a tubos eppendorf nuevos. Cada una de estas muestras contenía a los amplicones purificados para llevar a cabo las reacciones de ligación en el vector de clonación. Las reacciones de clonación se realizaron en el vector comercial pCR4-TOPO-TA (Invitrogen Carlsbad, CA. USA) para ser transformados en células competentes *E. coli* Top10 (Invitrogen Carlsbad, CA. USA) mediante la técnica de choque térmico. Las células transformadas se plaquearon en cajas petri con medio sólido LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron a 37°C durante toda la noche en la incubadora Imperial III (Lab Line).

Al menos tres clones de cada una de las bandas de interés se seleccionaron y crecieron por un periodo de 12 – 16 horas en medio líquido LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) a 37°C con agitación constante a 200 rpm en la incubadora Excella E25 (New Brunswick Scientific). Los cultivos se empastillaron a 10,000 x g durante 5 minutos y las muestras se procesaron para obtener los ADN's plasmídicos siguiendo el protocolo de centrifugación del Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega (Madison, WI. USA). A cada una de las pastillas se les adicionó 250 µl de solución de resuspensión y se homogenizaron las células con vortex, posteriormente se adicionaron 250 µl de solución de lisis y se incubaron las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se adicionaron 10 µl de la solución de proteasa alcalina y se mezclaron los tubos invirtiéndolos repetidas veces; las muestras se incubaron durante 5 minutos más a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el periodo de incubación se adicionaron 350 µl de solución de neutralización y se centrifugó el lisado bacteriano a velocidad máxima (aproximadamente 14,000 x g) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras lisadas se transfirieron a las columnas proporcionadas en el kit; se colocaron en los tubos recolectores y se centrifugaron a máxima velocidad durante 5 minutos. El líquido precipitado se eliminó del tubo recolector y se adicionaron 750 µl de solución de lavado, previamente suplementado con etanol al 95%, se centrifugó una vez más a velocidad máxima por 1 minuto, se retiró el líquido residual del tubo recolector y se volvieron a lavar las columnas con 250 µl de solución de lavado, se centrifugo durante 2 minutos a velocidad máxima.

Las columnas se transfirieron a tubos eppendorf nuevos y se centrifugaron a velocidad máxima por 1 minuto para eliminar por completo las soluciones de lavado. Las columnas fueron traspasadas nuevamente a tubos nuevos y se les adicionaron 100 µl de agua libre de nucleasas, se centrifugaron a velocidad máxima durante 1 minuto. Cada una de las muestras se corrió en geles de agarosa al 1% para determinar la integridad de las mismas y además se compararon las tallas de las muestras con plásmidos vacíos para determinar cuáles de ellas estaban clonadas; como sustituto de bromuro de etidio se utilizó RedGel para evidenciar el ADN plasmídico. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

La presencia del inserto se corroboró mediante la técnica de restricción con la enzima *EcoRI* (Promega, Madison; Wisconsin, USA) tratando ≈ 1 µg/µl de las muestras con 1 unidad de enzima y el Buffer H (Promega). Los fragmentos restringidos se resolvieron en geles de agarosa al 2%. Las muestras clonadas se cuantificaron mediante espectrofotometría en el equipo nanodrop 2000 de la marca Thermo Scientific para calcular la cantidad de muestra y la relación 260/280 (DNA/proteína) necesaria para las reacciones.

Las reacciones de secuenciación se prepararon bajo las siguientes condiciones: 1 μ l de Big Dye (Applied Biosystems), 2 μ l de Buffer de reacción, 10 pM de oligonucleótido M13 y entre 300 – 500 ng de ADN plásmidico con relación DNA/proteína $\geq$ a 1.8. Las condiciones de ciclado se muestran a continuación; así como las secuencias de los oligonucleótidos M13 utilizados para el marcaje de las secuencias (Tabla 7).

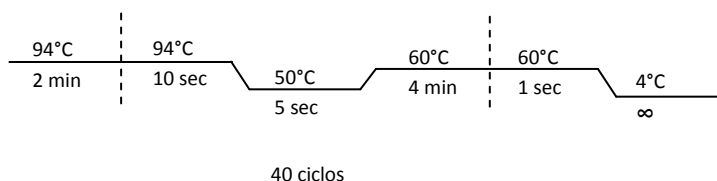


Tabla 7. Secuencia de los oligonucleótidos M13 utilizados para la secuenciación y PCR colonia.

Nombre del Oligonucleótido		Secuencia	T _m (°C)
Sentido	M13F	5'- GTA AAA CGA CGG CCA G -'3	50
Anti- sentido	M13R	5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC -'3	50

Las reacciones de secuenciación se purificaron con Kit comercial DyeEx™ (Qiagen). En breve, columnas proporcionadas en el kit, se homogenizaron con vortex y se colocaron en el tubo colector para ser centrifugadas a 750 x g durante 3 minutos, se retiró el líquido precipitado y las columnas se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 ml, las reacciones de secuenciación se adicionaron a las columnas. Nuevamente se centrifugaron y las muestras purificadas se liofilizaron en speed vac (Eppendorf concentrator 5301) a temperatura ambiente durante $\approx$ 30 – 40 minutos. Las secuencias se inyectaron en el equipo Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) con polímero POP7.

Cada una de las secuencias obtenidas se analizó y editó con el programa BioEdit 3.0 y Genious (para la eliminación de regiones correspondientes al vector de

clonación y realizar la traducción de la secuencia de nucleótidos a aminoácidos, así como para realizar alineamientos de las secuencias). La identificación de cada genotipo se llevó a cabo utilizando el programa Kansas versión 2007 y un script creado por el M. en C. Helios Cárdenas Hernández en 2010, que contiene los datos de los repetidos de *msp1α* descritos hasta el año 2007 así como las secuencias identificadas en el presente proyecto.

Identificación del aislado dominante en los hatos de estudio

Para identificar a los aislados dominantes se realizó un compilado con las secuencias de aminoácidos de MSP1a obtenidas; considerando los genotipos obtenidos con respecto a la cantidad de animales analizados se determinó cuantas veces un aislado específico se encontraba estableciendo la infección, después se determinó el por ciento animales infectados con cada genotipo. El total de secuencias analizadas (n=420) fueron obtenidas de un total de 67 animales diferentes (14 pertenecientes al rancho “La Joya” y 53 del rancho “El Verdineño”).

Identificación del repertorio de pseudogenes de *msp2* del aislado dominante

Considerando los resultados del aislado dominante se seleccionaron 3 muestras de bovinos que sabíamos se encontraban infectadas con los aislados de *A. marginale* de interés, pero 2 de las muestras elegidas estaban superinfectadas; no obstante el ADN purificado de sangre de los bovinos se sometieron a amplificación en reacciones de PCR utilizando 5 pares de oligonucleótidos degenerados (Tabla 8).

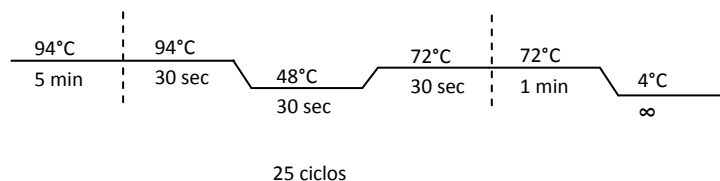
Tabla 8. Lista de oligonucleótidos para los alelos *msp2* (Ueti y cols, 2012).

Nombre de los oligonucleótidos		Secuencia	Tm (°C)
Sentido	F:	5'-CTGCTTTAGGTAAGATGACTAAGRGTGARGC-3'	
Reversos	R1:	5'-GCTATTAATGTTGCCC GCCATCCC-3'	59.7
	R2:	5'-GCCATTGATGTTTGTTGCCATCCC-3'	59.7
	R3:	5'-CTCAGGYTATTAATGTTATTCGCCATYCC-3'	59.7
	R4:	5'-GCCATTAATGTTGCCC GCCATCCC-3'	57.5
	R5:	5'-CCATTGATGTTATTCGCCATTCC-3'	59.7

Los oligonucleótidos se diseñaron para amplificar las regiones hipervariables de *msp2* de los aislados de *A. marginale*; los oligonucleótidos son específicos a las regiones conservadas que flanquean el sitio de expresión de *msp2* y de los pseudogenes. En total se prepararon 5 reacciones de PCR diferentes por cada

muestra a analizar. Una vez visualizados los amplicones resueltos en geles de agarosa al 2%, los cuales se cortaron y se purificaron utilizando el kit comercial de QIAGEN; posteriormente cada muestra se clonó en el vector comercial pCR4 – TOPO – TA (Invitrogen) para ser transformados en células competentes *E. coli* Top10. Al menos 96 colonias de las crecidas en las cajas LB-Ampicilina se seleccionaron para corroborar la presencia del inserto mediante la técnica de PCR colonia; esta metodología consiste en someter a PCR cada una de las clonas de interés; se prepararon reacciones de 12.5 µl de volumen final con Master mix (Roche) y oligonucleótidos M13 F y R (20 µM) que se encuentran en la secuencia del vector (Tabla 7). Cada una de las clonas probadas se conservaron en medio sólido LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml).

El programa de ciclado utilizado para el PCR colonia fue:



Una vez corroborada la clonación de los fragmentos en las colonias analizadas, éstas se crecieron en medio líquido LB Ampicilina para purificar los ADN's plasmidicos con kit comercial de Promega, también se utilizó el método One-step para purificar ADN plasmídico (Lezin y cols., 2011). Posteriormente se cuantificaron las muestras con nanodrop (Thermo Scientific) para preparar las reacciones de secuenciación, una vez concluidos los ciclos de marcaje se purificaron las muestras con Kit comercial DyeEx™ (Qiagen), cada una de las muestras marcadas se inyectó en el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Las secuencias de nucleótidos se procesaron con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor y HyPhy 2.0 con el objetivo de identificar los alelos y así determinar el repertorio de los pseudogenes de *msh2* del aislado de interés.

Reconocimiento de epítomos de *msh2* pertenecientes a la cepa St. Maries utilizando muestras de sueros de bovinos de campo infectados con diferentes aislados de *A. marginale*.

Las secuencias de los repertorios de pseudogenes de la cepa St. Maries se obtuvieron de la base de datos del NCBI (GeneBank números de acceso: JQ933531 – JQ933589) (Tabla 14), para elegir las regiones que se mandaron sintetizar (péptidos sintéticos); en total se mandaron diseñar 18 péptidos. Cada péptido sintético se inmovilizó en placas de 96 pozos para llevar a cabo los retos con sueros de bovinos infectados naturalmente.

El recubrimiento de la placa se realizó utilizando el buffer de recubrimiento* y el péptido previamente disuelto en el mismo buffer a una concentración 1 mg/ml. A cada pozo de las placas se le adicionaron 50 µl del péptido diluido 1:50 (1 µg/ml) y se incubó durante toda la noche a 4 °C. Transcurrido el periodo de incubación se lavó 4 veces con solución de lavado (PBS -Tween 20) cada lavado de 20 minutos. Posteriormente se bloqueó la placa con PBS + 5% de leche + 0.2% Tween 20 durante 1 hora a temperatura ambiente y después se lavó 1 vez más con la solución de lavado. Posteriormente, se adicionaron 50 µl de suero de bovino diluidos 1:10; cada una de las muestras se dejó interactuar durante 1 hora a

temperatura ambiente. Una vez concluido ese tiempo se lavaron las placas 4 veces con solución de lavado. Después se utilizó un anticuerpo secundario HRP (por sus siglas en inglés Horeadish Peroxidase) antilg-G hecho en ratón en una dilución 1:5000 (50 µl/por pozo) las muestras se incubaron por 30 minutos y se lavaron 4 veces más con buffer de lavado.

Para desarrollar la reacción se adicionaron 100 µl de TMB (Thermo Scientific) y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se detuvo la reacción con Solución de Paro para TMB (Thermo Scientific) 100 µl y se leyeron las muestras en lector de placas de ELISA a 450 nm. Cada suero se incubó por triplicado. Las absorbancias obtenidas de cada una de las muestras se analizaron para identificar que muestras contenían anticuerpos que reconocían regiones específicas de los péptidos de la cepa St. Maries.

Análisis estadístico

El análisis estadístico para la determinación de la prevalencia de la enfermedad se realizó con pruebas exactas de Fisher's.

El análisis estadístico de las muestras de los genotipos de *A. marginale* fue realizado con binomios factoriales 2 x 2 o bien 2 x N factorial. La comparación de números de genotipos se determinó de 2 formas diferentes; la diferencia entre 1 o más genotipos o bien si había diferencia entre tener 1 o 2, 3, 4, más genotipos. Los valores probabilísticos menores a 0.05 se consideraron significativos.

Para determinar la cantidad de muestras necesarias para cubrir la población de variantes antigénicas y determinar el repertorio de pseudogenes del aislado dominante del hato se realizaron curvas de rarefacción con el programa estadístico Estimates que a partir de una matriz calcula los valores promedio de Sobs y Chao2, los cuales se graficaron con Excell para determinar el número mínimo de la muestra.

RESULTADOS

Identificación de la Anaplasmosis bovina en los hatos analizados

En base a resultados obtenidos anteriormente se identificaron diferencias considerables en los niveles de infección entre los hatos analizados “El Verdineño” y “La Joya” (Figura 15).

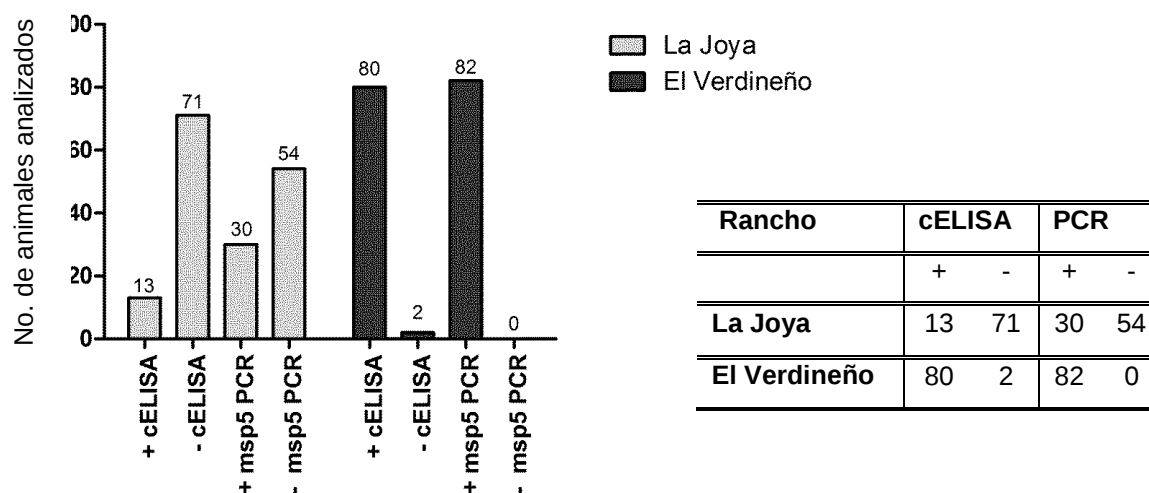


Figura 15. Diagnóstico de la Anaplasmosis Bovina con las metodologías cELISA y PCR; en color gris se representan las muestras pertenecientes al rancho “La Joya” y en negro las del rancho “El Verdineño”; en el cuadro se presenta el resumen de los resultados de las pruebas para realizar el diagnóstico.

Los resultados demuestran que el hato “El Verdineño” es un sitio con alta prevalencia (1.0) de la enfermedad mientras que “La Joya” presenta una baja prevalencia (0.35). De las muestras positivas a la enfermedad se seleccionaron 14 del rancho “La Joya” y 48 de “El Verdineño” para continuar con la identificación de los genotipos de *A. marginale* distribuidos en ambos hatos.

Genotipificación de aislados de *A. marginale* de animales de campo crónicamente infectados.

Considerando que diversos genotipos de *A. marginale* han sido identificados en diferentes regiones geográficas en base a la secuencia de la región hipervariable de MSP1a; constituida por repetidos en tándem de 23 a 31 aminoácidos de longitud cada uno, identificamos los aislados presentes en nuestros hatos de estudio.

Los genotipos de *A. marginale* distribuidos dentro de los hatos de estudio se obtuvieron mediante técnicas de amplificación, clonación y secuenciación de la región de repetidos localizados en el extremo 5' del gen *msp1a*. Las muestras de ADN provenientes de un total de n= 62 animales infectados con el microorganismo se amplificaron mediante PCR y nPCR utilizando oligonucleótidos específicos que hibridan en las regiones que flanquean los repetidos en tándem del gen *msp1a*. Cada una de las muestras amplificadas presentó un patrón de bandeo diferente dependiendo del genotipo del aislado y de si el animal se encontraba mono o superinfectado, obteniéndose amplicones desde 300 – 1100 nucleotidos (Figura 16).

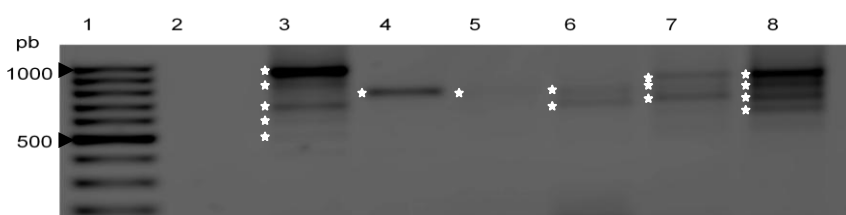


Figura 16. Amplificación por nPCR del gen *msp1a* de *A. marginale*. En la presente figura se ejemplifica un gel de agarosa al 2% mostrando los amplicones obtenidos por animal; como templados se utilizaron productos de PCR de muestras pertenecientes al rancho “El Verdineño”. Como sustituto de Bromuro de etidio se utilizó RegGel. En el carril (1) Marcador de 100 pb, (2) Control de la reacción, (3) muestra 4538; (4) muestra 4511; (5) muestra 5546; (6) muestra 3603; (7) muestra 4533; (8) muestra 3571.

El resultado de la clonación de cada uno de los amplicones se verificó comparando las tallas de las muestras con respecto a la del vector de clonación vacío (Figura 17), para seleccionar las clonas que se sometieron a la secuenciación para la identificación de los aislados.

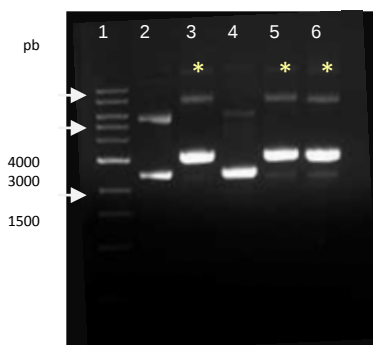


Figura 17. Verificación de la presencia del inserto en el vector TOPO-TA. Ejemplo de los geles de agarosa al 1% para la verificación del inserto clonado mediante la comparación de tamaño. En el carril (1) Marcador de talla molecular 1kb, (2) muestra de plásmido vacío religado, carril (3) al (6) muestras 4517 clonadas. Las muestras marcadas con * corresponden a muestras positivas a la clonación del inserto.

El ADN de al menos 3 clonas fue secuenciado (en sentido y antisentido) en el equipo 3130 Genetic Analyzer (Applies Biosystems). Los electroferogramas se analizaron con herramientas bioinformáticas (Geneious y BioEdit 7.0) para identificar cada uno de los repetidos que conforman los genotipos MSP1a (Figura18).



Figura 18. Análisis de las secuencias MSP1a. En la figura se muestra un ejemplo del análisis de la secuencia MSP1a, realizado con el programa Geneious para la identificación de los repetidos en tándem. Electroferograma de la muestra 3611, la secuencia de nucleótidos se resalta en gris y secuencia de aminoácidos en colores azul, morado y rojo en este ejemplo el genotipo está constituido por tres repetidos (identificado como EIV12/10/15).

Las secuencias obtenidas de cada amplicón fueron traducidas a aminoácidos con el programa Geneious o BioEdit 7.0 y se compararon con los previamente reportados por diversos autores, algunos de estos fueron identificados utilizando una base de datos denominada KansMatchJS proporcionada por el grupo de investigación del Dr. Palmer. Esa base de datos contiene 70 repetidos MSP1a, de los 193 que se han reportado hasta el momento; el resto de los repetidos se identificaron con bibliografía (Ruybal y cols, 2009; Palmer y cols., 1999; Palmer y cols., 2001; Mtshali y cols, 2007; Molad y cols., 2009; Jiménez Ocampo y cols, 2012; Garcia-Garcia y cols, 2004; de la Fuente y cols., 2001b; de la Fuente y cols., 2002; de la Fuente y cols, 2007b; de la Fuente y cols., 2003b; Futse y cols, 2003; Almazan y cols, 2008; Allred y cols, 1990). La comparación de los repetidos nos permitió identificar 14 repetidos nuevos (Tabla 9), los cuales mantenían las características descritas por Allred en 1990 (epítomos y regiones conservadas) así como cambios en ciertas regiones del repetido. Cada nuevo repetido se designó con las iniciales LaJ_n o EIV_n dependiendo del hato en el que se identificó, algunos de estos repetidos se encontraron en ambos ranchos.

Tabla 9. Secuencias de los nuevos repetidos MSP1a.

Nombre del repetido	Secuencia en aa del repetido	Longitud del repetido (aa)	Número de veces identificado en diferentes muestras de animales
A	DDSSSASGQQQESSVSSQSE-ASTSSQLG	28	
EIV1	A*****-----*L*R*GQ*****	23	4
EIV2	A*G*****-----*****GQ*****	23	7
EIV3	A*G*****-----*L**GGQ*****	23	4
LaJ1	T*****A*****D*****	28	4
EIV4	A*****G*****G*****	28	9
EIV5	A*G***GD*****D*****	28	2
EIV6	T*****GD***G*G*****GQ*****S*	29	4
EIV7	T*****G*G*****GQ*****	29	9
EIV8	T*****G*****GQ*****	29	7
EIV9	T*****S*****L***DQ*****	29	4
LaJ2	T*****L*P*GQ*****S*	29	4
EIV10	AG****G*****L*****G	29	2
EIV11	T*****GD*****L*P*GQ*****VG	31	8
EIV12	T*****L*P*GQ*****VG	31	15

La secuencia del repetido A (Allred y cols, 1990) se utilizó como referencia para identificar las regiones en las que se localizaban variaciones en el resto de los repetidos. Los aminoácidos representan las variaciones en el repetido; los asteriscos representan regiones de aminoácidos idénticas con respecto al repetido A. Los guiones representan delecciones en las secuencias con respecto al repetido A subrayado se muestra la region de los epitopos (Tabla A-I.1 de Anexo I).

En las secuencias obtenidas del rancho “La Joya” se identificaron 20 genotipos diferentes distribuidos entre un total n=14 muestras analizadas, entre las que se identificaron 11 genotipos constituidos por repetidos ya reportados por otros autores, 8 genotipos conformados por combinaciones de repetidos nuevos con repetidos previamente identificados y sólo 1 genotipo (EIV12/EIV7/EIV7/EIV7) constituido exclusivamente por repetidos nuevos. Los genotipos mayormente distribuidos dentro del hato “La Joya” fueron LaJ2/13/18 y $\alpha/\beta/\beta/\beta/\Gamma/\Gamma$ que se encontraron en el 15% del total de los animales analizados (Figura 19).

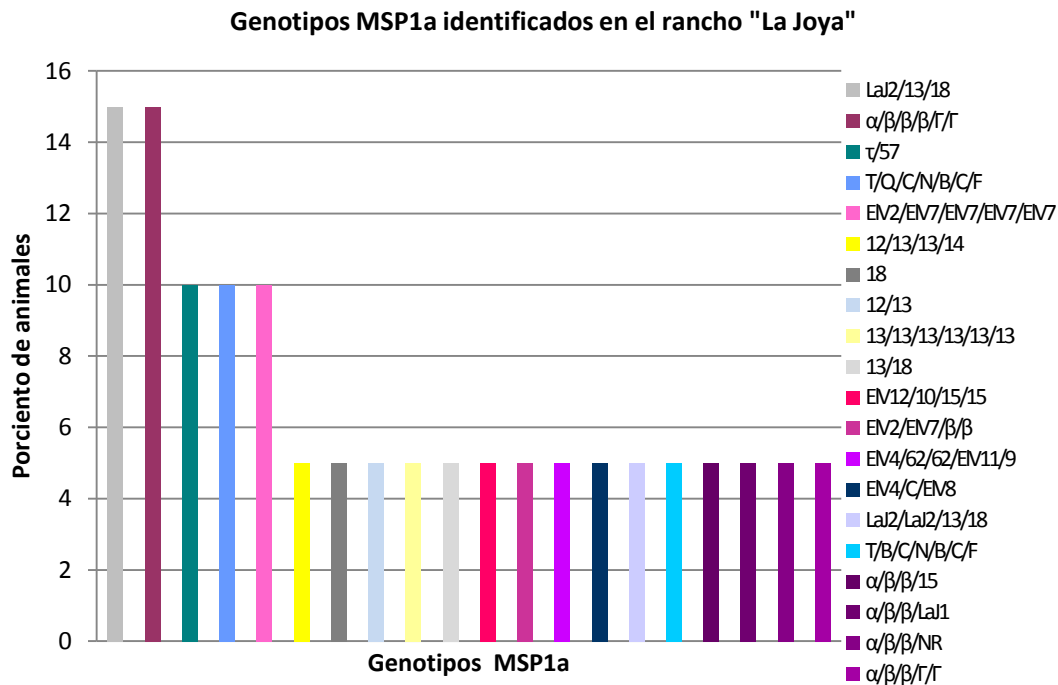


Figura 19. Genotipos identificados en las muestras del rancho “La Joya”. Cada una de las barras de color representa un genotipo diferente identificado en la columna de la derecha.

En el rancho “El Verdineño” se analizaron un total de $n=48$ bovinos. En ellos se identificaron una gran variedad de genotipos, un total de 46 genotipos diferentes distribuidos en las muestras analizadas; de los cuales 26 se encontraban constituidos por repetidos previamente reportados por otros autores, 19 genotipos compuestos por una combinación de repetidos ya reportados con repetidos nuevos y 1 genotipos conformado únicamente por repetidos nuevos; el mismo genotipo que se había identificado en “La Joya” (Tabla A-I.2 de Anexo I). Los genotipos MSP1a que no habían sido identificados en otras áreas geográficas se reportaron en la base de datos GeneBank a los que se les asignaron los números de acceso KF791969 – KF792017.

Con base en lo propuesto por Palmer y cols. en el año 2004; clasificamos a los genotipos identificados en el rancho “El Verdineño” en familias considerando la composición de los repetidos que conforman a los genotipos; esto se hizo para facilitar la representación de los resultados de MSP1a (Figura 20). Entre los 46

genotipos identificados en el rancho “El Verdineño” había algunos de ellos constituidos los mismos repetidos e incluso mantenían el mismo orden, pero presentaban diferencias en la cantidad de algunos repetidos que los constituían, por ejemplo los genotipos compuestos por repetidos α , β y Γ presentaban diferencias en la cantidad de repetidos β y Γ que los conformaban; otro ejemplo con los genotipos constituidos por el repetido 13, los cuales presentaban de 3, 4 o 6 repetidos continuos (Tablas A-I.2B de Anexo I y A-I.3 de Anexo I).

En total se conformaron 14 familias diferentes, aunque quedaron genotipos que no pudieron incorporarse a ninguna familia. Entre las familias “dominantes” se encontraron a los genotipos constituidos por repetidos $\alpha/\beta/\Gamma$ (identificados en Latinoamérica) y los genotipo con los repetidos EIV12/10/15. La primer familia mencionada contiene nueve variantes mientras que la segunda solamente tiene dos (Palmer y cols., 2004; Molad y cols, 2009).

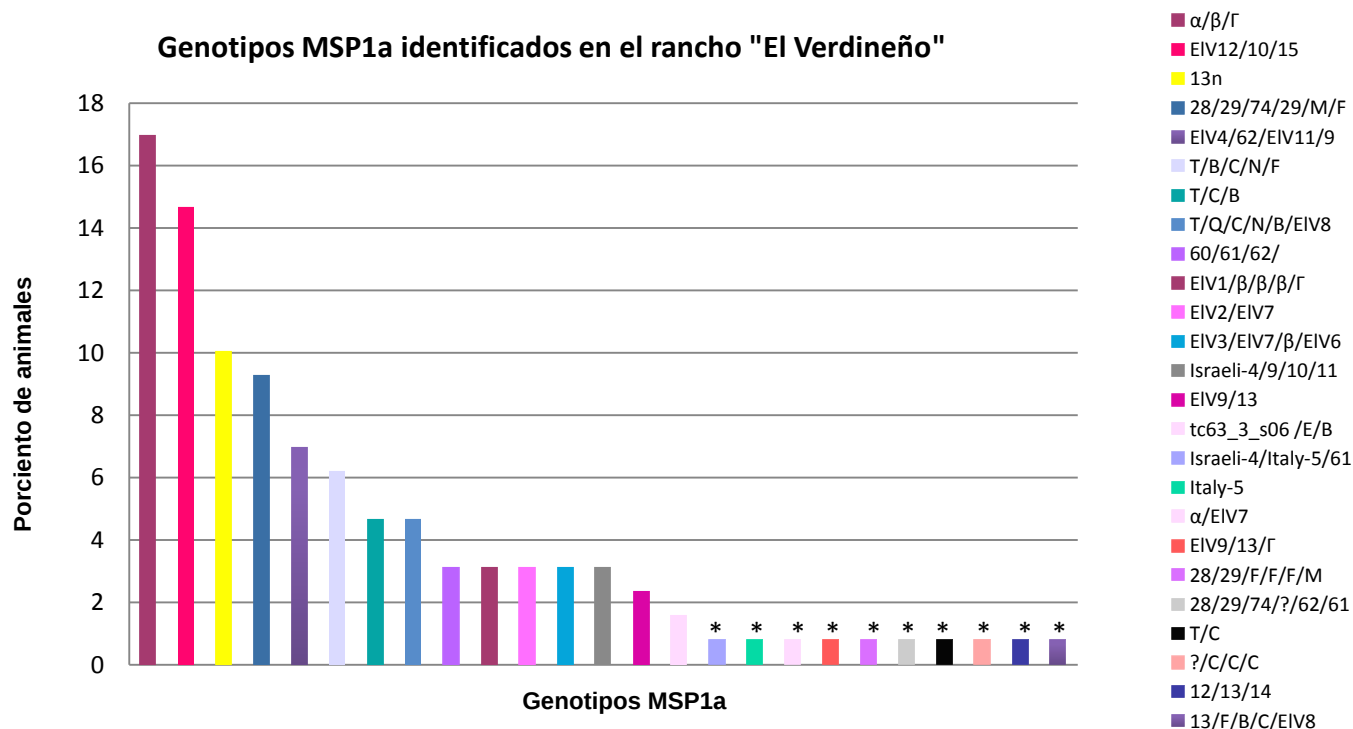


Figura 20. Representación gráfica de los genotipos de MSP1a distribuidos dentro del rancho “El Verdineño”; cada una de las barras representa una familia de los genotipos considerando que cada uno de los genotipos agrupados en las familias se encontraba constituido por los mismos repetidos y en orden similar (Tabla A-I.2 de Anexo I). Las familias de genotipos se identifican en el panel de la derecha. Las barras con * corresponde a secuencias de genotipos que no pudieron ser incorporadas en una familia.

Entre los diferentes genotipos distribuidos en los ranchos solamente identificamos 4 genotipos que eran idénticos a los reportados en aislados de Morelos, Tamaulipas ($\alpha/\beta/\beta/\Gamma$; 28/29/74/29/M/F), Argentina ($\alpha/\beta/\beta/\beta/\Gamma$) y en Brasil ($\alpha/\beta/\beta/\beta/\beta/\Gamma$).

Los genotipos obtenidos en ambos hatos se compararon, del total de genotipos MSP1a identificados (n= 56) 36 resultaron exclusivos para el rancho “El Verdineño”, 10 para el rancho “La Joya” y 10 se encontraron distribuidos en ambos hatos (Figura 21).

Genotipos MSP1a identificados los hatos

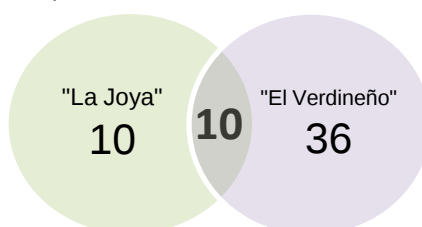


Figura 21. Diagrama de Venn que representa el resultado de la comparación de los genotipos MSP1a identificados en los ranchos “La Joya” en color verde y en morado “El Verdineño”. En la intersección se indican los genotipos MSP1a idénticos en ambos ranchos.

Al compararse la cantidad los genotipos en ambos hatos se determinó que existe una diferencia significativa ($p=0.009$, Prueba exacta de Fisher) en la cantidad de genotipos identificados en el rancho “El Verdineño” con respecto al los identificados en el rancho “La Joya”.

Identificación del genotipo MSP1a dominante de *A. marginale* en los hatos de estudio.

Uno de los objetivos de este trabajo consistía en identificar un genotipo dominante es decir, identificar a la variante de MSP1a que se encontraba estableciendo

infección en un mayor número de animales con respecto al resto de los genotipos circulando dentro de los hatos, las variantes de MSP1a se cuantificaron para determinar que variante se encontraba infectando más muestras.

El genotipo identificado como dominante en ambos hatos fue el $\alpha/\beta/\beta/\Gamma$ el cuál se encontró estableciendo infección en el 19% de los animales analizados. En el rancho “El Verdineño”; el genotipo EIV12/10/15/15 se encontró infectando al 17.5% de los bovinos, este genotipo se encontraba conformado por un repetido nuevo (EIV12). En la Tabla 10 se enlistan los 10 genotipos MSP1a principalmente distribuidos en ambos hatos.

Tabla 10. Genotipos MSP1a principalmente distribuidos en los hatos “La Joya” y “El Verdineño”.

Nombre de los repetidos MSP1a identificados en ambos hatos	% de animales portadores del genotipo
$\alpha/\beta/\beta/\Gamma$	19.3
EIV12/10/15/15	17.5
T/B/C/N/B/C/F	15.8
$\alpha/\beta/\beta/\beta/\Gamma/\Gamma$	14.0
13/13/13/13/13/13	12.3
EIV2/EIV7/EIV7/EIV7/EIV7	10.5
EIV4/62/62/EIV11/9	8.8
T/Q/C/N/B/C/F	5.3
12/13/13/14	3.5
$\alpha/\beta/\beta/\text{LaJ1}$	3.5

La familia dominante EIV12/10/15 es muy parecida al genotipo $\tau/10/15$ identificada en Paraná, Brasil; la diferencia radica únicamente en que el repetido EIV12 presenta una ganancia de dos aminoácidos con respecto a la secuencia del repetido τ , lo que lo convierte en un repetido de 31 aa en lugar de uno de 29; el resto de la secuencia es idéntica. Las diferencias identificadas entre estos repetidos podrían estar reflejando cambios sutiles que se generan en las secuencias que con el tiempo podrían dar lugar a la generación de variantes.

Determinación de los niveles de superinfección y su asociación con la prevalencia de la infección en los hatos de estudio.

La superinfección es un evento que le permite a aislados génicamente diferentes establecer una infección en un hospedero que se encuentra previamente infectado con otra cepa del mismo microorganismo. En este trabajo nosotros identificamos una gran cantidad de muestras superinfectando basándonos en las secuencias MSP1a de *A. marginale*.

El análisis de las secuencias MSP1a nos permitió identificar un alto nivel de superinfección, es decir, animales infectados con más de una cepa de *A. marginale*. En ambos ranchos se identificaron bovinos superinfectados, y se determinó que existe una diferencia significativa ($p=0.03$) en la proporción de animales superinfectados entre los dos hatos. En el rancho “La Joya” el 50% (7/7) de los animales se detectaron con entre 2 hasta 5 genotipos MSP1a diferentes y en “El Verdineño” 85% de las muestras, es decir 40/48, contenía de 2 hasta 8 genotipos distintos (Figura 22).

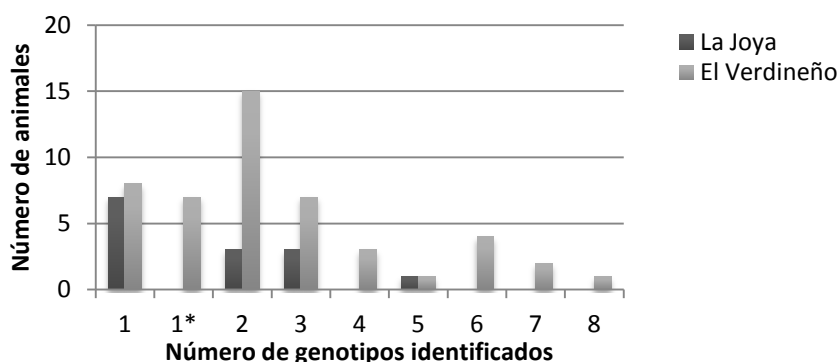


Figura 22. Representación gráfica de la cantidad de animales superinfectados. En la gráfica se incluyen muestras infectadas con un solo genotipo MSP1a y con más de un genotipo. Los datos representan los resultados de ambos hatos; en gris claro las muestras pertenecientes a “La Joya” y en gris oscuro las del rancho “El Verdineño”. El * representa muestras en las que solamente se identificó un genotipo pero la muestra amplificó más de una banda, las cuales no se pudieron analizar.

Estos resultados demuestran que la superinfección no es un evento esporádico, y que en zonas con alta prevalencia el evento se ve favorecido; posiblemente en

consecuencia la presión de la respuesta inmune que se ejerce sobre este microorganismo, así como la presión para adaptarse al vector y transmitirse, conduciendo el surgimiento de cepas genéticamente diferentes que sean capaces de coexistir en el mismo hospedero.

Identificación del repertorio de pseudogenes *msp2* de *A. marginale* del genotipo dominante.

Una vez determinada la variedad de los genotipos MSP1a se seleccionaron muestras infectadas con el aislado dominante (EIV12/10/15) para identificar el repertorio de pseudogenes *msp2* de este aislado y determinar si existe una asociación con la capacidad de establecer infección con mayor éxito que el resto de las cepas.

Las muestras biológicas seleccionadas para determinar el repertorio de pseudogenes *msp2* provenían de animales persistentemente infectados; 2 muestras se encontraban superinfectadas con el genotipo dominante EIV12/10/15 en combinación con otros genotipos (Tabla 11).

Tabla 11. Animales seleccionados para determinar el repertorio de alelos *msp2*.

Muestras	Genotipo estableciendo infección
Control	T/B/B/C/B/C/F
4511	EIV12/10/15
3611	EIV12/10/15 y 13/13/13/13
8536	EIV12/10/15, $\alpha/\beta/\beta/\Gamma$ y 28/28/74/29/M/F

El ADN de los aislados de *A. marginale* se extrajo de sangre infectada; las muestras se sometieron a PCR utilizando cinco juegos de oligonucleótidos degenerados que flanquean la región hipervariable de *msp2*, con la finalidad de amplificar el repertorio de alelos de estos genotipos (Figura 23), cada amplicón se ligó en el vector pCR4®TOPO – TA (Invitrogen) y se transformó en células *E. coli*

TOP10 (Invitrogen); todas las clonas obtenidas se analizaron por PCR de colonia; el ADN plasmídico de las clonas positivas se purificó y este se secuenció.

Todas las muestras se procesaron en más de una ocasión para aumentar el número de clonas y cubrir todas las posibles secuencias de *msh2* presentes en el genoma del aislado de interés (tanto las secuencias de los pseudogenes como las de secuencias presentes en el ES (sitio en expresión). Cada una de las secuencias obtenidas se analizó y editó con el software BioEdit versión 7.0; con el que se retiraron las regiones de la secuencia perteneciente al vector de clonación y se realizó la traducción de nucleótidos a aminoácidos; también se corroboró que las secuencias conservaran las características de la región hipervariable descritas por otros autores (Ueti y cols, 2012) (Figura A-I.1 del Anexo I). También con este software se realizó un alineamiento de las secuencias para ser analizadas con el programa Hyphy 2.0, el resultado del análisis indica en un listado que secuencias son idénticas (Figura A-I.2 de Anexo I).

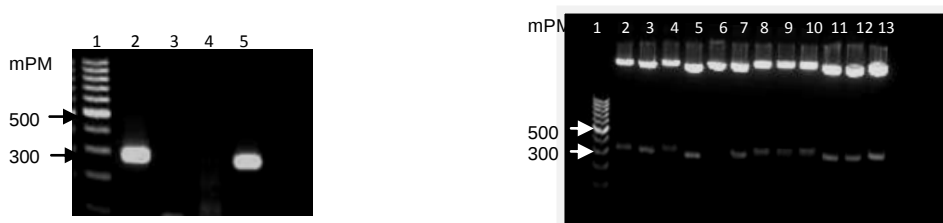


Figura 23. Obtención de los amplicones *msh2* y verificación de la clonación para la obtención de las secuencias de interés. A. Imagen representativa de un gel de agarosa al 2 % con la amplificación de alelos *msh2* de la muestra 4511 utilizando los oligonucleótidos F y R2; carril (1) mPM 100pb; (2) muestra control; (3) control de la rxn; (4) carril vacío y (5) muestra 4511. B. Ejemplificación de los productos de *msh2* de la muestra control clonados en el vector y purificados con kit comercial; los fragmentos de ADN fueron obtenidos con la enzima *EcoRI*.

Con el objetivo de determinar el número mínimo de secuencias *msp2* para obtener los repertorios de alelos en cada una de las muestras de interés se realizaron curvas de rarefacción; utilizando los datos promedio de Chao2 y Sobs, estos valores fueron obtenidos a partir del análisis realizado con el programa Estimates Win 8.20. Los datos graficados de Chao2 representan los alelos obtenidos de una muestra y Sobs representa la riqueza observada, es decir las veces en las que se identificó cada una de las variantes alélicas. El programa Estimates Win 8.20 analiza matrices en código binario (1 y 0) para obtener los datos proporcionados por el programa para graficar la información e interpretar los resultados (Figura 24).

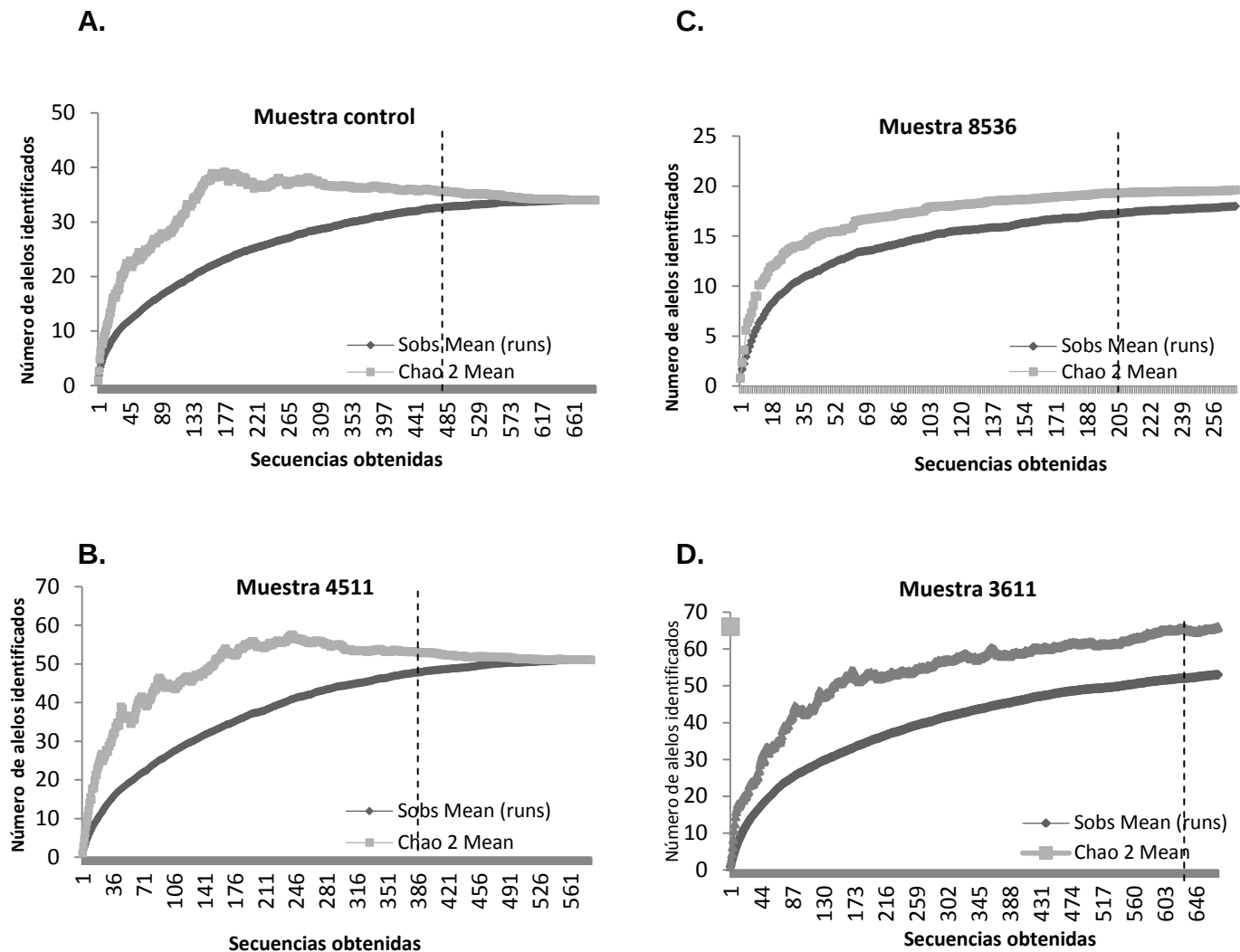


Figura 24. Estimación del número mínimo de secuencias para la identificación de los alelos *msp2*. Las gráficas representan los valores promedio de Chao2 y Sobs; cuando las curvas comienzan a aproximarse una con la otra se considera que el número total de variantes obtenidas en la muestra es similar a la cantidad de alelos estimados, indicando que aunque se aumente el número de secuencias ya no se identificarán más variantes pertenecientes al repertorio de pseudogenes (línea puntada). (A) Gráfica de la muestra control con una $n=534$ secuencias era suficiente para obtener el repertorio de pseudogenes. (B) Gráfico de la muestra 4511 $n=421$. (C) Gráfica de la muestra 8536 la n -estimada fue de 220 secuencias y finalmente (D) Gráfica correspondiente a la muestra 3611 en el caso de esta muestra no se observó una aproximación de las curvas.

El número mínimo de secuencias estimadas con las curvas de rarefacción se determinó basándonos en los gráficos. Entre las curvas existe cierta separación, lo que estaría indicando cuantos alelos faltan por registrarse en esa muestra. Entre más separadas estén, podríamos esperar que el número de alelos que contenga la muestra es mayor al que conocemos. Cuando las curvas se aproximan más cerca estamos de obtener el número de los alelos de los aislados; considerando los gráficos se determinó que para la muestra control una $n \approx 534$ era suficiente para abarcar todas las posibles variantes *msp2* que pudieran ser obtenidas en esta muestra; para la muestra 4511 una $n \approx 421$ secuencias eran suficientes; en el caso de la muestra 8536 $n \approx 220$ era suficiente para cubrir el repertorio *msp2* y finalmente para la muestra 3611 se estimaron más de $n \approx 600$ secuencias, pero el número de secuencias obtenidas de esta muestra no se pudo incrementar más. En la Tabla 12 se resume el total de secuencias obtenidas en cada muestra y cuántas de estas se identificaron en más de una ocasión.

Tabla 12. Compilado de datos considerados para hacer las matrices y realizar los análisis estadísticos necesarios para determinar la cantidad mínima de muestras necesarias para obtener el repertorio de pseudogenes *msp2* de aislados de México. Por ejemplo, de la muestra control, que se encontró infectada solamente con un genotipo, se obtuvieron un total de 723 secuencias *msp2*, entre las cuales se identificaron 65 diferentes de los cuales 33 se identificaron solamente una vez y 32 identificados más de 1 vez.

Muestra		Control	4511	8536	3611
Número de secuencias obtenidas para <i>msp2</i>		723	622	294	677
Variantes de <i>msp2</i> identificadas en las secuencias analizadas	Solo una vez	52	88	35	71
	Más de una vez	54	25	15	39

Cada una de las variantes de la secuencia de *msp2* se agrupó y cuantificó para determinar la frecuencia de estas (Tabla 13). Con los resultados obtenidos se intentó reconstruir el repertorio de pseudogenes del aislado dominante EIV12/10/15. Hasta el momento se ha descrito que diferentes aislados de *A.*

marginale pueden contener entre 5 a 7 pseudogenes distribuidos a lo largo del genoma (Futse y cols, 2008; Dark y cols, 2009; Brayton y cols, 2005; Ueti y cols, 2012).

Tabla 13. Frecuencia de los alelos MSP2. Las tablas presentan por animal las secuencias de los alelos más frecuentes los cuales pudieran representar el repertorio de pseudogenes de los aislados infectantes, en colores se resaltan las secuencias de alelos que son idénticas en diferentes muestras; las regiones subrayadas indican la localización de los microdominios 1, 2 y 3. En las tablas no se muestran las secuencias cuyas frecuencias eran inferiores al 3.0 %.

Muestra 4511

Secuencia del alelo MSP2	Veces obtenida	% de frecuencia	Número de acceso
KAVEGVTGGDKVSQNVCKGDSGTCGVNATSGTAOTKISAVFTFGTDTATOLSADTNNVSTSGMANNINNL	135	21.704	AFK11893.1
KAVEGVTGGDELSKKVKCKGENNKCgvNATSGSTTKISAVFTDEATLLSAAGDTINTTGMAGNING	127	20.418	ACF16272.1; ACF16244.1
KAVEGTTNGEKVSQNVCGKGEGSNGTKKCGTTIDSTATTORKISEVFTSDTETAOLSSDTTININTTGMANNINNL	53	8.520	AFK11917.1
ATIENTTGSGDVSQKVCKGTGTGGTNQCGKNTADGNATTKISAVFTFGTEAISSMETATISLQGMANNINSL	28	4.501	AFK11883.1
KAVEGVTGGDELSKKVKCKGTGTGSNTNQCSTAGATATOHKISEVFTFGTDTATLLSAAGDTINTTGMANNINNL	24	3.858	AFK11930.1
TTVEAATNGQTVSQKVCNGTGSNCGVNSGTTGSTNGNKISAVFSAEGAEFAISSMDTTISNGTTINVSGMATNING	21	3.376	AAK76933.1; ACF16235.1; AAN08704.1; AAQ11354.1; AFK12049.1
KAVEGVTGGDELSKKVKCKGTTSGNQCgvNATSGSTNNGKLSTVFNTDGAFAISSMDTTASGTSNTISLQEWRLIT*	20	3.215	AFK11888.1

Muestra 3611

Secuencia del alelo <i>m</i> sp2	Veces obtenida	% de frecuencia	Número de acceso
NAIESATGTTNGEKVSQKVCNGTSGTGGTQCGKNSGDTNGSSTTOHKISAVFTDEATLLSAAGDTINTTGMAGQH**	67	9.8966	AFK11898.1
NAIESVTGTTNGQTVSQKVCNGTGSNGSNCgKSADSQSTNSKLGTVFNAEGADAISSMDTTTTSGASGTISLQGMAGNING	63	9.3057	KM389048
ATIENTTGSGDVSQKVCGKGTTSGSTNQCgKNTTDTGTTKISAVFTFGTDTATLLSAAGDTINTTGMAGNINS	57	8.4194	AFK11964.1
TTIENTTGSGDELSKKVKCKGDSGTCGVNATSGTAOTNGKLSTVFNTDGAFAISSMETATISVQGMAGNINS	48	7.099	AFK11903.1
KAVEGVTGGDELSKKVKCKGENNKCgvNATSGSTTKISAVFTDEATLLSAAGDTINTTGMAGNINS	47	6.9423	ACF16272.1 ACF16244.1
ATIENTTGSGDVSQKVCKGTGTGGTNQCGKNTADGNATTKISAVFTFGTEAISSMETATISLQGMANNINNL	45	6.6469	AFK11883.1
KAVEGVTGGDELSKKVKCKGENNKCgvNATSGTAAOTNGKLSTVFSDEGTDFAISSMETATSGATISTSGMANNINNL	26	3.8404	AFK11976.1
KAVEGVTGGDELSKKVKCKGTTSGNQCgTSTAGATNKISAVFSADSDTTLISAESSISNGTISVQGMAGNINS	22	3.2496	AFK11885.1
KAVEGVTGGDKVSQNVCKGDSGTCGVNATSGTAOTKISAVFTFGTDTATOLSADTNNVSTSGMANNIN	21	3.1019	AAQ75020.1 AAQ75021.1 AFK11893.1
ATIENTTGSGDVSQKVCKGDSGTCgKNTSGTAAOTNGKLSTVFSDEGTDFAISSMETATISLQGMAGNINS	21	3.1019	AFK11913.1

Muestra 8536

Secuencia del alelo <i>msp2</i>	no de secuencias	% de frecuencia	Número de acceso
KAVEGVTGGDELSKKVCKG GTGTGGTNQCGVNAASGTTT KISAVF TDEATIL SADTNNVSTSG	57	19.387	AFK11890.1
TTVEAATNGQTVSQKVCK GTGSTGTCG ITDSTATTKISAVF TEGADAISSMDTTASGTSNT ISLQG	33	11.224	AFK11819.1
TTIENTTGSGDELSKKVCK KGDSGTCGVNATSGTAOTNGKLSTVFNTDGAF AISSMETATISVQG	30	10.204	AFK11903.1
ATIENTTGSGDVSVQKVCK GDSGTCGKNTSGTAAOTNGKLSTVFSDEGTD AISSMETATISLQG	27	9.183	AFK11913.1
NAIESATGTTNGDTVSKNVCK GDSGTCGKNTSGTATT KISAVF TEDAAAOLSTMDTATSSTSTGT ISLQG	23	7.823	AFK11944.1
NAIESATGTTNGDTVSKNVCK GTGTDSSGNKCGINDGNATT KISTVFNT EGTEA ISSMDTTASGTSNTISLQG	16	5.442	AFK11896.1
NAIESATGTTNGEKVSQKVCGN GTGSSGTCG ISTAGATSGSSGTTOR KISEVFTSDTETAOLSTMENT STTSG	11	3.741	AAD19629.1 AFK11946.1 AAG24478.1
NAIESATGTTSGDELSKKVCGK GTTSGNQCGVNATSGSTNNGKLSTVFSDEGTD AISSMETATISLQG	11	3.741	AFK11990.1

Todo este análisis se realizó con la intención de determinar el repertorio de pseudogenes del aislado dominante, a partir de la comparación de las secuencias obtenidas de las muestras seleccionadas. Entre todas las secuencias obtenidas solamente se identificaron 2 alelos en común entre las tres muestras analizadas, los cuales seguramente son parte de los alelos de repertorios de pseudogenes del aislado dominante (Figura 25).

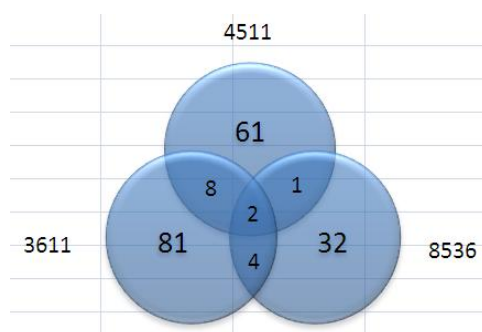


Figura 25. Comparación de las secuencias *msp2* entre muestras. Diagrama de Venn en el que se resume la cantidad de alelos identificados en cada una de las muestras (4511, 8536 y 3611) así como la cantidad de alelos en común entre ellas. Solamente dos alelos se encontraron presentes en las tres muestras analizadas (Para detalle de las secuencias ver Tabla A-I.6 de Anexo I).

A pesar de que se analizó una gran cantidad de secuencias nos resulto imposible corroborar el repertorio de pseudogenes del aislado EIV12/10/15 debido a que en las otras dos muestras no se identificaron más alelos en común.

Identificación de los microdominios *mSP2* en las variantes alélicas obtenidas.

En las secuencias HVR (regiones altamente variables) de MSP2 de *A. marginale* existen tres microdominios que se encuentran flanqueados por pequeños segmentos de aminoácidos altamente conservados entre las secuencias (Ueti y cols, 2012); en ese trabajo se reportaron los microdominios de las cepas St. Maries, el de dos aislados obtenidos de zonas templadas y el de aislados de zonas tropicales. Nosotros comparamos las secuencias de los microdominios MSP2 obtenidas en este estudio con la finalidad de identificar similitudes y divergencias entre éstos; primero se alinearon las variantes de las secuencias MSP2 con el programa BioEdit 7.0 para llevar a cabo la identificación de los microdominios (1 a 3); posteriormente cada microdominio se comparó con los de las muestras St. Maries y el de las cepas de zonas templadas; con lo que determinamos que 32.17% de las secuencias del microdominio1 eran idénticas a las reportadas en St. Maries y en las cepas de zonas templadas; el 22.94% de las secuencias del microdominio 2 también están presentes en esos aislados y 57.68% de las secuencias del microdominio 3 eran idénticas a las ya reportadas (Ueti y cols, 2012).

Por otra parte, el resto de los microdominios fueron comparados con repertorios de las muestras denominadas tropicales (Ueti y cols, 2012) las cuales se obtuvieron de muestras de animales del rancho “El Verdineño” distintas a las incluidos en este estudio; la comparación nos permitió identificar que 40.104% de las secuencias del microdominio 1 se encontraron presentes en las muestras tropicales; el 41.349% de las secuencias del microdominio 2 también se habían reportado en estas muestras y finalmente el 32.602% del microdominio 3 era idénticas a las tropicales del estudio de Ueti (2012) (Tabla A-I.6 de Anexo I).

El 24.08%, 35.646% y 9.710% de las secuencias de los microdominio 1, 2 y 3 respectivamente, resultaron exclusivas para nuestros aislados (Tabla A-I.7 de Anexo I). Al menos el 50% de las variantes de los microdominios resultó exclusivo de los aislados de regiones tropicales.

Reconocimiento de epítomos de *A. marginale* de la cepa St Maries con sueros de animales crónicamente infectados con distintos aislados.

Con el propósito de encontrar epítomos en común entre cepas de *A. marginale* se retaron sueros de bovinos infectados naturalmente para identificar como es el reconocimiento por parte de los anticuerpos generados contra las diferentes variantes.

Las divergencias entre los microdominios de nuestros alelos MSP2 con respecto a las reportadas en la cepa St. Maries se determinaron mediante comparación de secuencia; con base en la secuencia de los pseudogenes de la cepa St. Maries se diseñaron péptidos sintéticos (Tabla 14) los cuales se utilizaron para retar los sueros de bovinos infectados con nuestros aislados de *A. marginale* esperando identificar diferencias o similitudes en el reconocimiento inmunogénico con respecto a los diferentes microdominios las variantes de MSP2.

Los resultados obtenidos mostraron que el reconocimiento de los sueros es diferente en cada una de las muestras; a pesar de tener microdominios en común con la cepas St. Maries; al compararse los resultados se observó que entre las muestra 4511, 8536 y la 3611 no existe reconocimiento similar por parte de los anticuerpos, a pesar de que las muestras se encuentran infectadas con un genotipo en común.

Tabla 14. Reconocimiento inmunogénico con la HVR con sueros de animales de campo. En la tabla se resumen los resultados obtenidos del ensayo de ELISA en el que se retaron muestras de sueros de los animales previamente analizados con péptidos sintéticos correspondientes a los pseudogenes de St. Maries; subrayado se identifican la localización de cada uno de los microdominios (microdominio 1; microdominio 2 y microdominio 3); como los péptidos diseñados abarcan diferentes regiones de la HVR de MSP2 hay péptidos que contenían más de un microdominio.

Nombre del péptido	Secuencia del péptido	Sueros de muestras		
		4511	8536	3611
#1 pseudogene 1-1	TKSEAKKWGNAIESATGTTSGDELSKKVCG	+	-	-
#2 pseudogene 1-2	GDELSKKVCGKGT <u>TTSGNQCGVNATSGSTNN</u>	+	-	-
#3 pseudogene 1-3	<u>VNATSGSTNNG</u> KLSTVF <u>NTDGAEAISSMDT</u>	+	-	-
#4 pseudogene 1-4	<u>GAEAISSMDTTASGTSNT</u> ISLQG	+	+	-
#5 pseudogen 3H1 (2-1)	GDELSKKVCGKGT <u>EGSNGTKK</u> CG	-	+	-
#6 pseudogen 3H1 (2-2)	CG <u>ITDSTATI</u> KISEVF <u>TEGTDILLSVEGNK</u>	+	+	-
#7 pseudogen 3H1 (2-3)	<u>DILLSVEGN</u> KDTINLQGMANNINLSKEDK	+	-	-
#8 pseudogen G11-1	TKGEAKKWGNAVENATNGDKVSQNVCKGTG	-	-	-
#9 pseudogen G11-2	VSQNVCKGT <u>GTSGSSGNK</u> CG <u>ITDSTATI</u> KI	+	+	-
#10 pseudogen G11-3	<u>ITDSTATI</u> KISAVF <u>TEDAAQLSTMDNTI</u> INTTG	+	-	-
#11 pseudogen E6/E7-1	TTVEAATNGQTVSQKVCNGT	+	-	-
#12 pseudogene E6/E7-2	VSQKVCNG <u>NGTGSSGSN</u> CG <u>KNITDSTNNNGK</u>	-	+	-
#13 pseudogene E6/E7-3	<u>ITDSTNNNGK</u> ITQAFT <u>ADSDTILLSAESSN</u>	-	-	-
#14 pseudogen E6/E7-4	<u>TILLSAESSN</u> ISTSGMATNINGLSKEEKAV	-	+	-
#15 pseudogen 9H1-1	TKSEAKKWGNAIESATGTTNGEKVSQKVC	+	-	-
#16 pseudogen 9H1-2	GEKVSQKVCNG <u>NGTGSSGTQ</u> CG <u>KNSGDTNGS</u>	-	+	+
#17 pseudogen 9H1-3	G <u>KNSGDTNGSSITQHK</u> ISAVF <u>TDEATLLSA</u>	+	-	-
# 18 pseudogen 9H1-4	<u>ETDEATLLSAAGDT</u> INTTGMAGNINSLTKD	+	+	-

La muestra de suero del animal 4511 (monoinfectado con el genotipo dominante) reconoció 12 péptidos de la cepa St. Maries, la muestra del animal 8536 (muestra sueperinfectada) solamente reaccionó con 8 péptidos y la muestra 3611 (superinfectada) solamente detectó un péptido, el cual contiene a la región del microdominio 1 del pseudogen 9H1 de St. Maries (Tabla 14 y Tabla A1.6 de Anexo I).

La diferencia observada en el reconocimiento de los anticuerpos la hemos asociado con el hecho de que las muestras analizadas se encuentran superinfectadas y por lo tanto los epítotos reconocidos por el sistema inmune en cada uno de los hospederos son diferentes considerando que se estarían expresado repertorios distintos en consecuencia a la presencia de otras cepas del

microorganismo; incluso el orden con el que se establecieron cada una de las infecciones en el hospedero influirá el repertorio de alelos expresados.

DISCUSIÓN

La Anaplasmosis bovina es una enfermedad de alta incidencia en regiones tropicales y subtropicales (36.7° N, 31.0°S) pero se encuentra distribuida mundialmente ocasionando grandes pérdidas económicas en el sector ganadero asociadas con la muerte de los animales y la disminución en la producción de leche y carne. A pesar de los múltiples esfuerzos y estrategias empleadas por controlar esta enfermedad; hasta el momento ha sido imposible producir una vacuna que proporcione protección contra todas las variantes de *A. marginale*. La diversidad entre aislados se ha asociado con la eficiencia de la transmisión por medio del vector biológico y la capacidad por establecer superinfecciones.

El principal objetivo de este estudio consistió en identificar diferencias génicas entre aislados de *A. marginale* en los genes *msp1α* y *msp2* que pudieran estar asociadas con la eficiencia de ciertos aislados para establecer infecciones en la mayor cantidad de hospederos disponibles, así como identificar aspectos para comprender mejor el establecimiento de la infección en regiones con alta prevalencia de la enfermedad.

Considerado lo reportado por diversos autores era de esperarse altos niveles de infección en los hatos seleccionados para este estudio (Futse y cols, 2008). A pesar de que las muestras se recolectaron de regiones endémicas se identificó una diferencia significativa ($p < 0.0001$) en los niveles de infección de los hatos analizados. En el rancho “El Verdineño” 100% de los animales resultaron positivos a la infección mientras que en el hato de “La Joya” solamente el 37% de los animales se encontraban infectados con la bacteria. La diferencia entre los niveles de infección detectados en los ranchos destaca la importancia en la aplicación de buenas prácticas en el manejo de los animales; en el hato “El Verdineño” no se aplican las medidas sugeridas a diferencia de en el hato “La Joya” en donde se practica la aplicación de garrapaticidas en las áreas de pastoreo (control del vector) así como el control en el ingreso de los animales (cuarentenas de las nuevas adquisiciones) lo que puede asociarse con la importante diferencia en los niveles de infección establecidos por este patógeno incluso en áreas endémicas (Rodriguez Camarillo y cols, 2003; Aubry Geale, 2011b).

En los últimos 25 años más de 190 repetidos de MSP1a han sido reportados y se siguen identificando nuevas variantes en diversas áreas geográficas; entre las 43 variantes obtenidas en este trabajo, algunas habían sido reportadas anteriormente en países como Israel, Argentina, Brasil, Estados Unidos, Canadá, México (en los estados de Tamaulipas y Morelos) (Allred y cols, 1990; de la Fuente y cols, 2003b; Vidotto y cols, 2006; de la Fuente y cols, 2007b; Almazan y cols, 2008; Ruybal y cols, 2009; Molad y cols, 2009). La presencia de genotipos de diferentes áreas geográficas se ha asociado con el movimiento del ganado que existe entre países (de la Fuente y cols., 2007a; Almazan y cols, 2008).

El análisis de los repetidos de MSP1a permitió identificar 14 variantes nuevas, que conservan las características de secuencia reportada por Allred en 1990; cada repetido nuevo se obtuvo de diferentes muestras biológicas. Los repetidos, la combinación y cantidad de éstos da lugar a los diversos genotipos de MSP1a de *A. marginale*; generando aislados que presentan variaciones en la secuencia de la proteína que podría influir en la función de la misma (Allred y cols, 1990; Cabezas-Cruz y cols, 2013).

En este estudio se identificó una gran cantidad de genotipos distribuidos en los ranchos, este trabajo analiza por primera vez una gran cantidad de muestras de 2 hatos localizados en zonas endémicas; que presentan diferencias en la prevalencia de la enfermedad. En estudios anteriores se reportó una cantidad similar de muestras a las aquí analizadas, sin embargo las muestras fueron obtenidas de un hato localizado en una zona templada, donde la prevalencia de la enfermedad es menor a la identificada en este trabajo (Palmer y cols, 2004). De la Fuente ha reportado diversos estudios en los que se ha encontrado una amplia diversidad de genotipos de *A. marginale*, sin embargo el número de muestras colectadas en diferentes ranchos fue pequeño (de 3 a 11) y colectadas de diferentes hatos (de la Fuente y cols, 2002; de la Fuente y cols., 2004; de la Fuente y cols, 2007b; Almazan y cols, 2008; Molad y cols, 2009; Jiménez Ocampo y cols, 2012).

Las secuencias del marcador molecular de cepas (MSP1a) nos permitió identificar niveles altos de superinfección en los dos hatos analizados

El primer reporte de superinfección, realizado en 2005 por Rodríguez y cols., identificó diferencias y similitudes en los repertorios *msp2* de cinco aislados previamente identificados en animales que presentaban superinfección (Palmer y cols, 2004; Rodríguez y cols., 2005). Posteriormente en 2008 se determinó bajo condiciones controladas de laboratorio, que al menos un pseudogen de *msp2* de la segunda cepa infectante debe ser diferente al de la cepa que ya ha establecido la infección, lo que le permite evadir la respuesta inmune generada contra la primer cepa (Futse y cols, 2008). Por varios años existieron controversias relacionadas con el establecimiento de la superinfección, ya que algunos trabajos señalaban que una vez que el bovino se ha infectado con un aislado de *A. marginale* se confiere protección contra la infección de una segunda cepa (de la Fuente y cols., 2003a).

En este trabajo no solamente se identificó un alto nivel de superinfección en los bovinos, sino que también se identificó que $\geq 50\%$ de los animales infectados son hospederos de al menos 2 cepas diferentes; en concordancia con lo reportado el año pasado en un estudio realizado en otra área endémica del país (Veracruz, México) y a diferencia de otros reportes en los que solamente se han identificado pocos o ningún bovino infectado con más de una cepa se reportan prevalencias que van desde 0.29 – 0.98.(Palmer y cols, 2004; Mtshali y cols, 2007; Almazan y cols, 2008; Ruybal y cols, 2009; Molad y cols, 2009; Jiménez Ocampo y cols, 2012; Vallejo Esquerra y cols., 2014). A pesar de no identificarse una diferencia significativa entre los niveles de superinfección en los dos hatos, si se obtuvo una diferencia en el promedio de cepas encontradas por animal en cada rancho; en el rancho “El Verdineño” con alta prevalencia de la enfermedad se calculó que cada bovino superinfectado hospeda 3.5 ± 2.1 cepas; estos resultados coinciden con lo reportado en otra zona con alta prevalencia (Vallejo Esquerra y cols, 2014)

Estos resultados soportan la teoría de que en regiones con altas prevalencia de la enfermedad el establecimiento de las supeinfecciones se ve favorecido, considerando que al existir una fuerte competencia por los hospederos las cepas deben expresar repertorios diferentes que les permitirá compartir un hospedero y asegurar el mantenimiento de la cepa dentro del hato.

Uno de los objetivos de este estudio consistió en determinar el repertorio de pseudogenes del aislado denominado EIV12/10/15. La metodología empleada en el presente trabajo nos permitió obtener una gran cantidad de variantes de *msh2*, no obstante el repertorio de pseudogenes del aislado dominante de interés no se pudo determinar al 100% ya que al comparar los resultados obtenidos en cada una de las muestras (variantes obtenidas por animal) esperábamos identificar un grupo de pseudogenes compuesto por entre 5 - 10 alelos diferentes, que resultara en común en las 3 muestras seleccionadas para el análisis, considerando que las muestras elegidas se encontraban infectadas con el genotipo de nuestro interés.

Posiblemente, el repertorio de pseudogenes no se pudo corroborar a consecuencia de: los niveles de infección que presentaba cada uno de los aislados en las muestras; a la diferencia en la presión ejercida sobre las bacterias por la Respuesta inmune de cada hospedero, e incluso por el orden en el que se estableció la infección por cada una de las cepas, factores que podrían condicionar los alelos identificados (Futse y cols, 2008).

A pesar de que no se identificó el mismo repertorio entre las tres muestras comparadas se obtuvieron una gran cantidad de variantes de la secuencias *msh2* que podrían representar la población de diferentes alelos expresados por los aislados establecidos en el mismo hospedero. A diferencia de las estrategias abordadas para la identificación de repertorios de pseudogenes en las que se establecen infecciones con cepas mantenidas en laboratorio, en este trabajo se empleó la metodología reportada en 2012 para obtener los repertorios de *msh2* a partir de muestras de animales naturalmente y crónicamente infectados (Dark y cols, 2009; Ueti y cols, 2012; Brayton y cols, 2005). Al comparar la cantidad de variantes alélicas *msh2* obtenidas en el hato con alta prevalencia con respecto a

las obtenidas en hatos con prevalencia baja se observa una diferencia significativa en el número de variantes; la expansión de los repertorios está acompañada con un incremento en la diversidad de secuencias de la proteína MSP2 (Anexo II).

Los repertorios de alelos obtenidos fueron comparados con los de otros aislados reportados previamente en los que se identificaron los repertorios de pseudogenes de 5 aislados de *A. marginale* en los que se reportan diferencias y similitudes en la secuencia y la localización dentro del genoma (Brayton y cols, 2005; Dark y cols, 2009). En este trabajo con la finalidad de identificar similitudes y diferencia en los repertorios comparamos las secuencias mediante alineamientos con BLAST y pudimos determinar que algunas de las variantes alélicas identificadas son muy similares a variantes reportadas en cepas de USA (Virginia), Brasil y Argentina las diferencias son de aproximadamente 2 - 5% de cambios en las secuencias de aminoácidos; al alinear las variantes también identificamos secuencias de *msp2* que no habían sido reportadas anteriormente (Brayton y cols, 2005; Futse y cols, 2008; Futse y cols, 2009; Dark y cols, 2009; Ueti y cols, 2012).

Posteriormente con el análisis de la secuencia de los microdominios de la región hipervariable de los alelos *msp2*, se realizaron alineamientos con todas las variantes de las secuencias obtenidas y se corroboró la presencia de los aminoácidos que flanquean a cada microdominio; a pesar de que se identificaron varios microdominios en común con cepas aisladas de otras regiones geográficas (zonas templadas) aproximadamente el 50% de los alelos *msp2* obtenidos en este trabajo difieren con los descritos en la cepa St. Maries y cepas de zonas templadas; con respecto a otras cepas identificadas como tropicales se determinó una diferencia de $\approx 20\%$ (Ueti y cols, 2012). Estos resultados reflejan la diferencia génica existente en regiones con prevalencia alta, en donde una gran cantidad de cepas antigénicamente diferentes deben surgir para ser capaces de competir por los hospederos disponibles y para asegurar su transmisión y persistencia dentro de los hatos

El último objetivo consistió en evaluar muestras de sueros infectadas con diferentes genotipos para determinar el reconocimiento de diferentes regiones de

los pseudogenes por parte de los anticuerpos generados contra esas cepas. En base a las secuencias de los alelos de la cepa St. Maries se diseñaron péptidos sintéticos (18 diferentes) (Tabla 15) cada uno de estos péptidos se retó con sueros de bovinos (4511, 3611 y 8536) infectados con aislados de *A. marginale* diferentes a la cepa St. Maries. La inmunodetección con la muestra 4511 (que se encontraba infectada con el aislado EIV12/ 10 /15) reconoció 12/18 péptidos de la cepa St. Maries lo que nos podría indicar que entre el aislado analizado y la muestra de referencia existen regiones en común que son reconocidas por el sistema inmune. La muestra 3611 (EIV12/ 10 /15 y 13/13/13/13) reconoció 8/18 péptidos de St. Maries y la muestra 8536 (infectada con los aislados EIV12/ 10 /15, $\alpha/\beta/\beta/\Gamma$ y 28/29/74/29/M/F) solamente reconoció uno de los péptidos sintéticos. El resultado obtenido con esta estrategia mostró que el reconocimiento de los péptidos entre las muestras es muy diferente aún cuando todas estas se encontraban infectadas con un aislado en común. Posiblemente los aislados han expresado epítomos diferentes para poder mantenerse en un hospedero superinfectando, expresando preferentemente alelos diferentes a los de los aislados con los que coexisten en el bovino o bien que los niveles de anticuerpos son bajos y por eso no hubo más reconocimiento inmunológico.

Las estructuras microbianas son dinámicas; con el tiempo los patógenos presentan cambios que pueden dar lugar al surgimiento de nuevas cepas, estos cambios pueden generar diferencias en los patrones de infección. Los cambios difieren marcadamente dependiendo el patógeno y dependerán de múltiples factores incluyendo los mecanismos de cambio génico que resultan específicos de cada patógeno y del tamaño de la población (Vallejo Esquerri y cols, 2014).

A pesar de que este organismo contiene un “genoma cerrado” (closed-core genome) este trabajo refleja la diferencia génica que existe entre aislados de *A. marginale* tal y como lo demuestran otros trabajos; entre estos genes se encuentran *msp1 α* , *msp2*, *msp4*, *omp5*, *omp9*, *omp13*, *omp14*, *aaap* (Palmer y cols, 2004; Stich y cols., 2004; Dark y cols, 2009; Jiménez Ocampo y cols, 2012; Vallejo Esquerri y cols, 2014; Castaneda-Ortiz y cols., 2015)

Es necesario definir qué conduce cambios genéticos; identificar las fuerzas que moldean al genoma y a la expresión de las proteínas para entender el surgimiento de nuevas cepas y la consecuencia epidemiológica que esto representa.

En el presente trabajo a pesar de identificar cepas dominantes dentro de nuestros hatos de estudio se rechaza la hipótesis planteada ya que no se encontró una asociación entre las diferencias de los repertorios de MSP2 y la transmisión. No obstante las variaciones en los genes así como la identificación de secuencias; evidentemente constituidas por segmentos, son reflejo del papel que desempeñan estas variantes en la persistencia de la enfermedad.

CONCLUSIONES

- ♣ En los hatos de estudio se encontró una amplia diversidad en la secuencia de los genes *msh1a* y *msh2*.
- ♣ Entre las muestras genotipificadas con *msh1a* se identificaron a los genotipos $\alpha/\beta/\beta/\Gamma$ y EIV12/10/15/15 como dominantes en los hatos analizados.
- ♣ El nivel de superinfección en el rancho “El Verdineño” fue del 85% mientras que en “La Joya” el 50% de los animales eran portadores de más de un asilado de *A. marginale*. Estos niveles no habían sido reportados previamente en otras regiones geográficas.
- ♣ Con nuestro análisis el resultado de la correlación del repertorio de alelos de *msh2* con los genotipos *msh1a* fue negativa.
- ♣ En este trabajo se identificaron 151 alelos de *msh2* no reportados anteriormente.
- ♣ Este es el primer reporte de la asociación entre la superinfección y la prevalencia de la enfermedad.
- ♣ La capacidad de los sueros de animales infectados de reconocer los péptidos codificados por los pseudogenes funcionales (regiones conservadas o microdominios) fue diferente en todas las muestras a pesar de encontrarse infectadas con cepas en común. Esto puede ser en consecuencia de que las variantes expresadas por cada aislado en un contexto de infección diferente (mono o superinfectado).

PERSPECTIVAS

Analizar y comparar una mayor cantidad de variantes de *msh2* en diferentes aislados de *A. marginale* provenientes de animales superinfectados para identificar que tanta diferencia existe entre los alelos.

Retar una mayor cantidad de muestras de sueros para identificar similitudes en los patrones de reconocimiento a nivel inmunogénico para determinar regiones conservadas entre los múltiples aislados de este organismo.

Comprobar la participación de *msh2* en la transmisión mediante ensayos de delección del gen.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almazan, C., Medrano, C., Ortiz, M., de la Fuente, J., 2008, Genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains from an outbreak of bovine anaplasmosis in an endemic area. *Vet Parasitol* 158, 103-109.
- Almazan, C., Moreno-Cantu, O., Moreno-Cid, J.A., Galindo, R.C., Canales, M., Villar, M., de la Fuente, J., 2012, Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. *Vaccine* 30, 265-272.
- Alonso-Díaz, M.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Fragoso-Sánchez, H., Rosario-Cruz, R., 2006, Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. *Archivos de medicina veterinaria* 38, 105-113.
- Allred, D.R., McGuire, T.C., Palmer, G.H., Leib, S.R., Harkins, T.M., McElwain, T.F., Barbet, A.F., 1990, Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3220-3224.
- Aubry, P., Geale, D.W., 2011a, A review of bovine anaplasmosis. *Transbound Emerg Dis* 58, 1-30.
- Aubry, P., Geale, D.W., 2011b, A Review of Bovine Anaplasmosis. *Transboundary and Emerging Diseases* 58, 1-30.
- Barbet, A.F., Allred, D.R., 1991, The msp1 beta multigene family of *Anaplasma marginale*: nucleotide sequence analysis of an expressed copy. *Infect Immun* 59, 971-976.
- Barbet, A.F., Blentlinger, R., Yi, J., Lundgren, A.M., Blouin, E.F., Kocan, K.M., 1999, Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture, tick salivary glands, and cattle. *Infect Immun* 67, 102-107.
- Barbet, A.F., Meeus, P.F., Belanger, M., Bowie, M.V., Yi, J., Lundgren, A.M., Alleman, A.R., Wong, S.J., Chu, F.K., Munderloh, U.G., Jauron, S.D., 2003, Expression of multiple outer membrane protein sequence variants from a single genomic locus of *Anaplasma phagocytophilum*. *Infect Immun* 71, 1706-1718.
- Bensaci, M., Bhattacharya, D., Clark, R., Hu, L.T., 2012, Oral vaccination with vaccinia virus expressing the tick antigen subolesin inhibits tick feeding and transmission of *Borrelia burgdorferi*. *Vaccine* 30, 6040-6046.
- Brayton, K.A., 2012, Transmisión de *Anaplasma marginale* por garrapatas. *Revista mexicana de ciencias pecuarias* 3, 41-50.
- Brayton, K.A., Kappmeyer, L.S., Herndon, D.R., Dark, M.J., Tibbals, D.L., Palmer, G.H., McGuire, T.C., Knowles, D.P., 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.

Cabezas-Cruz, A., Passos, L.M., Lis, K., Kenneil, R., Valdes, J.J., Ferrolho, J., Tonk, M., Pohl, A.E., Grubhoffer, L., Zweygarth, E., Shkap, V., Ribeiro, M.F., Estrada-Pena, A., Kocan, K.M., de la Fuente, J., 2013, Functional and immunological relevance of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a sequence and structural analysis. *PLoS One* 8, e65243.

Camacho-Nuez, M., de Lourdes Munoz, M., Suarez, C.E., McGuire, T.C., Brown, W.C., Palmer, G.H., 2000, Expression of polymorphic *msp1beta* genes during acute *Anaplasma Marginale* rickettsemia. *Infect Immun* 68, 1946-1952.

Castaneda-Ortiz, E.J., Ueti, M.W., Camacho-Nuez, M., Mosqueda, J.J., Mousel, M.R., Johnson, W.C., Palmer, G.H., 2015, Association of *Anaplasma marginale* Strain Superinfection with Infection Prevalence within Tropical Regions. *PLoS One* 10, e0120748.

Dark, M.J., Herndon, D.R., Kappmeyer, L.S., Gonzales, M.P., Nordeen, E., Palmer, G.H., Knowles, D.P., Jr., Brayton, K.A., 2009, Conservation in the face of diversity: multistrain analysis of an intracellular bacterium. *BMC Genomics* 10, 16.

de la Fuente, J., Blouin, E.F., Kocan, K.M., 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., Blouin, E.F., Manzano-Roman, R., Naranjo, V., Almazan, C., Perez de la Lastra, J.M., Zivkovic, Z., Jongejan, F., Kocan, K.M., 2007a, Functional genomic studies of tick cells in response to infection with the cattle pathogen, *Anaplasma marginale*. *Genomics* 90, 712-722.

de la Fuente, J., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., Kocan, K.M., 2003a, Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells. *Vet Microbiol* 91, 265-283.

de la Fuente, J., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., Rodriguez, S.D., Garcia, M.A., Kocan, K.M., 2001a, 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., Golsteyn Thomas, E.J., van den Bussche, R.A., Hamilton, R.G., Tanaka, E.E., Druhan, S.E., Kocan, K.M., 2003b, Characterization of *Anaplasma marginale* isolated from North American bison. *Appl Environ Microbiol* 69, 5001-5005.

de la Fuente, J., Passos, L.M., Van Den Bussche, R.A., Ribeiro, M.F., Facury-Filho, E.J., Kocan, K.M., 2004, Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol* 121, 307-316.

- de la Fuente, J., Rodriguez, M., Montero, C., Redondo, M., Garcia-Garcia, J.C., Mendez, L., Serrano, E., Valdes, M., Enriquez, A., Canales, M., Ramos, E., Boue, O., Machado, H., Leonart, R., 1999, Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. *Genet Anal* 15, 143-148.
- de la Fuente, J., Ruybal, P., Mtshali, M.S., Naranjo, V., Shuqing, L., Mangold, A.J., Rodriguez, S.D., Jimenez, R., Vicente, J., Moretta, R., Torina, A., Almazan, C., Mbat, P.M., de Echaide, S.T., Farber, M., Rosario-Cruz, R., Gortazar, C., Kocan, K.M., 2007b, Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. *Vet Microbiol* 119, 382-390.
- de la Fuente, J., Torina, A., Naranjo, V., Caracappa, S., Vicente, J., Mangold, A.J., Vicari, D., Alongi, A., Scimeca, S., Kocan, K.M., 2005, Genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains from cattle farms in the province of Palermo, Sicily. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52, 226-229.
- de la Fuente, J., Van Den Bussche, R.A., Garcia-Garcia, J.C., Rodriguez, S.D., Garcia, M.A., Guglielmone, A.A., Mangold, A.J., Friche Passos, L.M., Barbosa Ribeiro, M.F., Blouin, E.F., Kocan, K.M., 2002, Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. *Vet Microbiol* 88, 275-285.
- de la Fuente, J., Van Den Bussche, R.A., Kocan, K.M., 2001b, Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). *Vet Parasitol* 97, 65-76.
- de la Fuente, J., Van Den Bussche, R.A., Prado, T.M., Kocan, K.M., 2003c, *Anaplasma marginale* msp1alpha genotypes evolved under positive selection pressure but are not markers for geographic isolates. *J Clin Microbiol* 41, 1609-1616.
- De Wall, D.T., 2000, Anaplasmosis control and diagnosis in South Africa. *Ann N Y Acad Sci* 916, 474-483.
- Domínguez-García, D.I., RodrigoRosario-Cruz, ConsueloAlmazán-García, Oaxaca, J.A.S., Fuente, J.D.I., 2010, *Boophilus microplus*: BIOLOGICAL AND MOLECULAR ASPECTS OF ACARICIDE RESISTANCE AND THEIR IMPACT ON ANIMAL HEALTH. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12, 181 - 192.
- Edds, G.T., Simpson, C.F., Neal, F.C., White, F.H., 1964, Irradiation of *Anaplasma marginale* for vaccine production. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc* 68, 102-111.
- Eriks, I.S., Stiller, D., Goff, W.L., Panton, M., Parish, S.M., McElwain, T.F., Palmer, G.H., 1994, Molecular and biological characterization of a newly isolated *Anaplasma marginale* strain. *J Vet Diagn Invest* 6, 435-441.
- Eriks, I.S., Stiller, D., Palmer, G.H., 1993, Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. *J Clin Microbiol* 31, 2091-2096.

- French, D.M., Brown, W.C., Palmer, G.H., 1999, Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. *Infect Immun* 67, 5834-5840.
- French, D.M., McElwain, T.F., McGuire, T.C., Palmer, G.H., 1998, Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. *Infect Immun* 66, 1200-1207.
- Futse, J.E., Brayton, K.A., Dark, M.J., Knowles, D.P., Palmer, G.H., 2008, Superinfection as a driver of genomic diversification in antigenically variant pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 2123-2127.
- Futse, J.E., Brayton, K.A., Nydam, S.D., Palmer, G.H., 2009, Generation of antigenic variants via gene conversion: Evidence for recombination fitness selection at the locus level in *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 77, 3181-3187.
- Futse, J.E., Ueti, M.W., Knowles, D.P., Jr., Palmer, G.H., 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.
- Garcia-Garcia, J.C., de la Fuente, J., Bell-Eunice, G., Blouin, E.F., Kocan, K.M., 2004, Glycosylation of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and its putative role in adhesion to tick cells. *Infect Immun* 72, 3022-3030.
- Gill, R.J. 2005. Anaplasmosis in beef cattle In Texas Agriculture Extension Service, The Texas A&M University System, B5098, ed. (Collage Station: Texas Texas Agriculture Extension Service, The Texas A&M University System).
- Guglielmone, A.A., 1995, Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet Parasitol* 57, 109-119.
- Hammac, G.K., Pierle, S.A., Cheng, X., Scoles, G.A., Brayton, K.A., 2014, Global transcriptional analysis reveals surface remodeling of *Anaplasma marginale* in the tick vector. *Parasit Vectors* 7, 193.
- Herndon, D.R., Palmer, G.H., Shkap, V., Knowles, D.P., Jr., Brayton, K.A., 2010, Complete genome sequence of *Anaplasma marginale* subsp. *centrale*. *J Bacteriol* 192, 379-380.
- Hofmann-Lehmann, R., Meli, M.L., Dreher, U.M., Gonczi, E., Deplazes, P., Braun, U., Engels, M., Schupbach, J., Jorger, K., Thoma, R., Griot, C., Stark, K.D., Willi, B., Schmidt, J., Kocan, K.M., 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.
- Howden, K.J., Geale, D.W., Pare, J., Golsteyn-Thomas, E.J., Gajadhar, A.A., 2010, An update on bovine anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) in Canada. *Can Vet J* 51, 837-840.

- Jiménez Ocampo, R., Vega y Murguía, C.A., Oviedo Ortega, N., Rojas Ramírez, E.E., García Ortiz, M.Á., Preciado de la Torre, J.F., Rosario Cruz, R., Domínguez García, D.I., Rodríguez Camarillo, S.D., 2012, Diversidad genética de la región variable de los genes *msp1a* y *msp4* en cepas de *Anaplasma marginale* de México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias* 3, 373-386.
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Blouin, E.F., Coetzee, J.F., Ewing, S.A., 2010, The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol* 167, 95-107.
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Guglielmone, A.A., Melendez, R.D., 2003, Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin Microbiol Rev* 16, 698-712.
- Koffi, M., Solano, P., Barnabé, C., de Meeûs, T., Bucheton, B., Cuny, G., Jamonneau, V., 2007, Genetic characterisation of *Trypanosoma brucei* s.l. using microsatellite typing: New perspectives for the molecular epidemiology of human African trypanosomiasis. *Infection, Genetics and Evolution* 7, 675-684.
- Kuttler, K.L., 1984, *Anaplasma* infections in wild and domestic ruminants: a review. *J Wildl Dis* 20, 12-20.
- Lezin, G., Kosaka, Y., Yost, H.J., Kuehn, M.R., Brunelli, L., 2011, A One-Step Miniprep for the Isolation of Plasmid DNA and Lambda Phage Particles. *PLoS One* 6, e23457.
- Lohr, C.V., Brayton, K.A., Shkap, V., Molad, T., Barbet, A.F., Brown, W.C., Palmer, G.H., 2002, Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 operon-associated proteins during mammalian and arthropod infection. *Infect Immun* 70, 6005-6012.
- Lopez, J.E., Siems, W.F., Palmer, G.H., Brayton, K.A., McGuire, T.C., Norimine, J., Brown, W.C., 2005, Identification of novel antigenic proteins in a complex *Anaplasma marginale* outer membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping. *Infect Immun* 73, 8109-8118.
- Macmillan, H., Brayton, K.A., Palmer, G.H., McGuire, T.C., Munske, G., Siems, W.F., Brown, W.C., 2006, Analysis of the *Anaplasma marginale* major surface protein 1 complex protein composition by tandem mass spectrometry. *J Bacteriol* 188, 4983-4991.
- Macmillan, H., Norimine, J., Brayton, K.A., Palmer, G.H., Brown, W.C., 2008, Physical linkage of naturally complexed bacterial outer membrane proteins enhances immunogenicity. *Infect Immun* 76, 1223-1229.
- McGarey, D.J., Barbet, A.F., Palmer, G.H., McGuire, T.C., Allred, D.R., 1994, Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b. *Infect Immun* 62, 4594-4601.

- McGuire, T.C., Palmer, G.H., Goff, W.L., Johnson, M.I., Davis, W.C., 1984, Common and isolate-restricted antigens of *Anaplasma marginale* detected with monoclonal antibodies. *Infect Immun* 45, 697-700.
- Meeus, P.F., Brayton, K.A., Palmer, G.H., Barbet, A.F., 2003, Conservation of a gene conversion mechanism in two distantly related paralogues of *Anaplasma marginale*. *Mol Microbiol* 47, 633-643.
- Molad, T., Fleidrovich, L., Mazuz, M., Fish, L., Leibovitz, B., Krigel, Y., Shkap, V., 2009, Genetic diversity of major surface protein 1a of *Anaplasma marginale* in beef cattle. *Vet Microbiol* 136, 54-60.
- Mtshali, M.S., de la Fuente, J., Ruybal, P., Kocan, K.M., Vicente, J., Mbatia, P.A., Shkap, V., Blouin, E.F., Mohale, N.E., Moloi, T.P., Spickett, A.M., Latif, A.A., 2007, Prevalence and genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains in cattle in South Africa. *Zoonoses Public Health* 54, 23-30.
- Mulenga, A., Sugimoto, C., Sako, Y., Ohashi, K., Musoke, A., Shubash, M., Onuma, M., 1999, Molecular characterization of a *Haemaphysalis longicornis* tick salivary gland-associated 29-kilodalton protein and its effect as a vaccine against tick infestation in rabbits. *Infect Immun* 67, 1652-1658.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A., 2007, *Ehrlichia, Anaplasma and related bacteria*, In: *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, p. 2256.
- Mwangi, W., Brown, W.C., Splitter, G.A., Davies, C.J., Howard, C.J., Hope, J.C., Aida, Y., Zhuang, Y., Hunter, B.J., Palmer, G.H., 2007, DNA Vaccine Construct Incorporating Intercellular Trafficking and Intracellular Targeting Motifs Effectively Primes and Induces Memory B- and T-Cell Responses in Outbred Animals. *Clinical and Vaccine Immunology* 14, 304-311.
- Noh, S.M., Brayton, K.A., Brown, W.C., Norimine, J., Munske, G.R., Davitt, C.M., Palmer, G.H., 2008, Composition of the surface proteome of *Anaplasma marginale* and its role in protective immunity induced by outer membrane immunization. *Infect Immun* 76, 2219-2226.
- Oberle, S.M., Palmer, G.H., Barbet, A.F., 1993, Expression and immune recognition of the conserved MSP4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 61, 5245-5251.
- Oberle, S.M., Palmer, G.H., Barbet, A.F., McGuire, T.C., 1988, Molecular size variations in an immunoprotective protein complex among isolates of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 56, 1567-1573.
- Ooshiro, M., Zakimi, S., Matsukawa, Y., Yafuso, M., Katagiri, Y., Inokuma, H., 2009, *Anaplasma marginale* infection in a Japanese Black cow 13 years after eradication

- of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Okinawa, Japan. *Vet Parasitol* 160, 351-355.
- Palmer, G.H., 2009, Sir Arnold Theiler and the discovery of anaplasmosis: a centennial perspective. *Onderstepoort J Vet Res* 76, 75-79.
- Palmer, G.H., Bankhead, T., Lukehart, S.A., 2009, 'Nothing is permanent but change'-antigenic variation in persistent bacterial pathogens. *Cell Microbiol* 11, 1697-1705.
- Palmer, G.H., Brayton, K.A., 2013, Antigenic variation and transmission fitness as drivers of bacterial strain structure. *Cell Microbiol* 15, 1969-1975.
- Palmer, G.H., Brown, W.C., Rurangirwa, F.R., 2000, Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Microbes Infect* 2, 167-176.
- Palmer, G.H., Knowles, D.P., Jr., Rodriguez, J.L., Gnad, D.P., Hollis, L.C., Marston, T., Brayton, K.A., 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, G.H., Rurangirwa, F.R., Kocan, K.M., Brown, W.C., 1999, Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitol Today* 15, 281-286.
- Palmer, G.H., Rurangirwa, F.R., McElwain, T.F., 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, G.H., Waghela, S.D., Barbet, A.F., Davis, W.C., McGuire, T.C., 1987, Characterization of a neutralization-sensitive epitope on the Am 105 surface protein of *Anaplasma marginale*. *Int J Parasitol* 17, 1279-1285.
- Pruneau, L., Moumène, A., Meyer, D.F., Marcelino, I., Lefrançois, T., Vachier, N., 2014, Understanding Anaplasmatidae pathogenesis using 'Omics' approaches. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4.
- Rajput, Z.I., Hu, S.H., Arijo, A.G., Habib, M., Khalid, M., 2005, Comparative study of *Anaplasma* parasites in tick carrying buffaloes and cattle. *J Zhejiang Univ Sci B* 6, 1057-1062.
- Rodriguez Camarillo, S.D., Garcia Ortiz, M.A., Aboytes Torre, R., Canto Alarcon, G.J., 2003, Inmunología e Inmunoprolifaxis de la Anaplasmosis bovina, In: *Ciencia Veterinaria* 9. pp. 123 - 164.
- Rodriguez, J.L., Palmer, G.H., Knowles, D.P., Jr., Brayton, K.A., 2005, Distinctly different *msp2* pseudogene repertoires in *Anaplasma marginale* strains that are capable of superinfection. *Gene* 361, 127-132.

- Ruybal, P., Moretta, R., Perez, A., Petrigh, R., Zimmer, P., Alcaraz, E., Echaide, I., Torioni de Echaide, S., Kocan, K.M., de la Fuente, J., Farber, M., 2009, Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in Argentina. *Vet Parasitol* 162, 176-180.
- Scoles, G.A., Broce, A.B., Lysyk, T.J., Palmer, G.H., 2005a, Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *J Med Entomol* 42, 668-675.
- Scoles, G.A., Ueti, M.W., Noh, S.M., Knowles, D.P., Palmer, G.H., 2007, Conservation of transmission phenotype of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) strains among *Dermacentor* and *Rhipicephalus* ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 44, 484-491.
- Scoles, G.A., Ueti, M.W., Palmer, G.H., 2005b, Variation among geographically separated populations of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) in midgut susceptibility to *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). *J Med Entomol* 42, 153-162.
- Silva, J.B., Fonseca, A.H., Barbosa, J.D., Cabezas-Cruz, A., de la Fuente, J., 2014, Low genetic diversity associated with low prevalence of *Anaplasma marginale* in water buffaloes in Marajo Island, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.*
- Stich, R.W., Olah, G.A., Brayton, K.A., Brown, W.C., Fechheimer, M., Green-Church, K., Jittapalapong, S., Kocan, K.M., McGuire, T.C., Rurangirwa, F.R., Palmer, G.H., 2004, Identification of a novel *Anaplasma marginale* appendage-associated protein that localizes with actin filaments during intraerythrocytic infection. *Infect Immun* 72, 7257-7264.
- Torina, A., Alongi, A., Naranjo, V., Estrada-Pena, A., Vicente, J., Scimeca, S., Marino, A.M., Salina, F., Caracappa, S., de la Fuente, J., 2008, Prevalence and genotypes of *Anaplasma* species and habitat suitability for ticks in a Mediterranean ecosystem. *Appl Environ Microbiol* 74, 7578-7584.
- Torina, A., Moreno-Cid, J.A., Blanda, V., Fernandez de Mera, I.G., de la Lastra, J.M., Scimeca, S., Blanda, M., Scariano, M.E., Brigano, S., Disclafani, R., Piazza, A., Vicente, J., Gortazar, C., Caracappa, S., Lelli, R.C., de la Fuente, J., 2014, Control of tick infestations and pathogen prevalence in cattle and sheep farms vaccinated with the recombinant Subolesin-Major Surface Protein 1a chimeric antigen. *Parasit Vectors* 7, 10.
- Torioni de Echaide, S., Knowles, D.P., McGuire, T.C., Palmer, G.H., Suarez, C.E., McElwain, T.F., 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.

- Ueti, M.W., Knowles, D.P., Davitt, C.M., Scoles, G.A., Baszler, T.V., Palmer, G.H., 2009, Quantitative differences in salivary pathogen load during tick transmission underlie strain-specific variation in transmission efficiency of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 77, 70-75.
- Ueti, M.W., Reagan, J.O., Jr., Knowles, D.P., Jr., Scoles, G.A., Shkap, V., Palmer, G.H., 2007, Identification of midgut and salivary glands as specific and distinct barriers to efficient tick-borne transmission of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 75, 2959-2964.
- Ueti, M.W., Tan, Y., Broschat, S.L., Castaneda Ortiz, E.J., Camacho-Nuez, M., Mosqueda, J.J., Scoles, G.A., Grimes, M., Brayton, K.A., Palmer, G.H., 2012, Expansion of variant diversity associated with a high prevalence of pathogen strain superinfection under conditions of natural transmission. *Infect Immun* 80, 2354-2360.
- Vallejo Esquerria, E., Herndon, D.R., Alpirez Mendoza, F., Mosqueda, J., Palmer, G.H., 2014, *Anaplasma marginale* superinfection attributable to pathogen strains with distinct genomic backgrounds. *Infect Immun* 82, 5286-5292.
- van Belkum, A., Scherer, S., van Alphen, L., Verbrugh, H., 1998, Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 275-293.
- Varela-Stokes, A.S., Stokes, J.V., Davidson, W.R., Little, S.E., 2006, Co-infection of white-tailed deer with multiple strains of *Ehrlichia chaffeensis*. *Vector Borne Zoonotic Dis* 6, 140-151.
- Vidotto, M.C., Kano, S.F., Gregori, F., Headley, S.A., Vidotto, O., 2006, Phylogenetic analysis of *Anaplasma marginale* strains from Parana State, Brazil, using the *msp1alpha* and *msp4* genes. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53, 404-411.
- Viseshakul, N., Kamper, S., Bowie, M.V., Barbet, A.F., 2000, Sequence and expression analysis of a surface antigen gene family of the rickettsia *Anaplasma marginale*. *Gene* 253, 45-53.
- Willadsen, P., 1990, Perspectives for subunit vaccines for the control of ticks. *Parassitologia* 32, 195-200.
- Ybanez, A.P., Ybanez, R.H., Claveria, F.G., Cruz-Flores, M.J., Xuenan, X., Yokoyama, N., Inokuma, H., 2014, High Genetic Diversity of *Anaplasma marginale* Detected from Philippine Cattle. *J Vet Med Sci* 76, 1009-1014.

ANEXO I

Tabla A-I.1 Repetidos nuevos de MSP1a. Algunos de los repetidos nuevos se identificaron en conjunto con repetidos previamente reportados e incluso algunos de estos mantenían estructuras similares a genotipos publicados, considerando lo anterior se realizaron alineamientos entre los repetidos nuevos y repetidos similares por ejemplo, se identificaron regiones hipervariables conformadas por los repetidos $\alpha\beta^nT^n$, en el caso particular del repetido α de 23 aa, en el presente trabajo se identificaron 3 repetidos de 23 aa que no se habían incluido en artículos previamente reportados.

A.

Nombre del Repetido	Secuencia del Repetido	Longitud del repetido (aa)	Referencia
α	ADSSSASG-----VLSQSGQASTSSQLG--	23	Garcia-Garcia; 2004
EIV1	A*****-----*L*R*GQ*****	23	
EIV3	A*G*****-----*L**GGQ*****	23	
EIV2	A*G*****-----*****GQ*****	23	

B.

Nombre del Repetido	Secuencia del Repetido	Longitud del repetido (aa)	Referencia
48	TDGSSASGQQQESSVLSPQGQASTSSQLGVG	31	Ruybal; 2009 de la Fuente; 2007 Garcia-Garcia; 2004
11	ADSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLGVG	31	
τ	TDSSSASGQQQESSVLSPSGQASTSSQLG**	29	
LaJ2	T*****L*P*GQ*****S***	29	
EIV12	T*****L*P*GQ*****VG	31	
EIV11	T*****GD*****L*P*GQ*****VG	31	

C.

Nombre del Repetido	Secuencia de Repetido	Longitud del repetido (aa)	Referencia
β	TDSSSAGDQQQGSGVSSQSQASTSSQLG--	29	Garcia-Garcia; 2004
EIV6	T*****GD***G*G*****GQ*****S***	29	
EIV7	T*****G*G*****GQ*****	29	

D.

Nombre del Repetido	Secuencia del Repetido	Longitud del repetido (aa)	Referencia
A	DDSSSASGQQQESSVSSQSE-ASTSSQLG--	28	Allred;1990 de la Fuente 2007
13	TDSSSASGQQQESSVLSPSDQASTSSQLG--	29	
EIV9	T*****S*****L***DQ*****	29	
LaJ1	T*****L*P*GQ*****S***	29	

E.

Nombre del Repetido	Secuencia del Repetido	Longitud del repetido (aa)	Referencia
60	ADGSSAGD QQQESSVSSQ SG -ASTSSQLG**	28	Almazán; 2008
EIV5	A*G***GD*****D*****	28	

F.

Nombre del Repetido	Secuencia del Repetido	Longitud del repetido (aa)	Referencia
tc63_3_s06	ADSSSASG QQQESSV LSQ SE-ASTSSQL G G*	29	Almazán; 2008
64	AGSSSASG QQQESSVSSQ SE -ASTSSQL G G*	29	
EIV10	AG****G*****L*****G*	29	

G.

Nombre del Repetido	Secuencia del Repetido	Longitud del repetido (aa)	Referencia
C	ADSSSASG QQQESSVSSQ SGQ ASTSSQLG**	29	Palmer; 2001
EIV4	A*****G*****G-*****	28	

H.

Nombre del Repetido	Secuencia del Repetido	Longitud del repetido (aa)	Referencia
F	TDSSSASG QQQESSVSSQ SGQ ASTSSQLG**	29	Palmer; 2001
Ny2	T*****G*****GQ*****	29	

I.

Nombre del Repetido	Secuencia del Repetido	Longitud del repetido (aa)	Referencia
Γ	TDSSSASG QQQESSVSSQ SD *ASTSSQLG**	28	Garcia-Garcia; 2004
LaJ1	T*****A****D*****	29	

El alineamiento entre estos dos repetidos se realizó considerando que LaJ1 al igual que el repetido Γ se encuentran agrupados al repetido β.

Tabla A-I.2. Genotipos identificados en las muestras analizadas (A) Muestras obtenidas del rancho “La Joya” localizado en el estado de Jalisco, México. (B) Muestras obtenidas del rancho “El Verdineño” localizado en el estado de Nayarit, México, en las tablas de este hato se presentan * en algunas muestras esto significa que en esos animales solamente se identificó un genotipo pero que el resultado de la PCR evidenció la presencia de más amplicones los cuales por cuestiones metodológicas no se identificaron. Los ? denotan repetidos nuevos que solamente se identificaron en esa muestra por lo tanto no fueron asignados en la lista.

A.

ID de la muestra	Genotipo basándonos en la secuencia de repetidos en tándem de MSP1a				
01A	12/13/13/14				
06B	$\alpha/\beta/\beta/\Gamma/\Gamma$				
32B	$\tau/57$				
40N	12/13				
52N	LaJ2/13/18				
68N	$\alpha/\beta/\beta/15$				
90N	$\alpha/\beta/\beta/\text{NR}$				
09N	T/Q/C/N/B/C/F	EIV4/C/EIV8			
10B	$\alpha/\beta/\beta/\Gamma/\Gamma$	$\alpha/\beta/\Gamma/\Gamma$			
54N	13/13/13/13/13/13	$\alpha/\beta/\beta/\Gamma/\Gamma$			
01N	$\alpha/\beta/\beta/\text{LaJ1}$	EIV4/62/62/EIV11/9	EIV12/10/15/15		
02V	LaJ2/LaJ2/13/18	LaJ2/13/18	18		
05A	T/B/C/N/B/C/F	T/Q/C/N/B/C/F	EIV2/EIV7/EIV7/EIV7/EIV7		
35B	LaJ2/13/18	13/18	EIV2/EIV7/EIV7/EIV7/EIV7	EIV2/EIV7/ $\beta/\beta/\text{NR}$	$\tau/57$

B.

Animal	Genotipos MSP1a								
1562	T/B/C/N/B/C/F								
4511	EIV12/10/15								
4523	28/29/F/F/F/M								
6032	Israeli-4/9/10/10/11/9								
6514	EIV4/62/62/EIV11/9/62/62/ EIV11/9								
7557	28/29/74/29/M/F								
7536	28/29/74/29/M/F								
8504	28/29/74/29/M/F								
1510*	28/29/74/29/M/F								
8618*	$\alpha/\beta/\beta/\Gamma$								
1530*	12/13/13/14								
3518*	EIV12/10/15/15								
5546*	Italy-5								
1545*	60/61/62/62/62/61								
3615*	60/62/62/61/62/62								
3598	EIV4/62/62/EIV11/9								
4544	EIV2/EIV7/EIV7/EIV7/EIV7								
3607	$\alpha/\beta/\beta/\Gamma$	Israeli-4/9/10/Israeli- 3/9/10/11/10							
4525	$\alpha/\beta/\beta/\Gamma$	$\alpha/\beta/\beta/\beta/\Gamma/\Gamma$							
4548	$\alpha/\beta/\beta/\Gamma$	T/C							
4536	$\alpha/\beta/\beta/\beta/\Gamma/\Gamma$	T/Q/C/N/B/C/EIV8							
3611	13/13/13/13	EIV12/10/15							
4592	13/13/13/13	tc63 3 s06 EB							
3579	13/13/13/13/13/13	T/Q/C/N/B/C/EIV8							
3616	13/13/13/13/13/13	T/Q/C/N/B/C/EIV8							
1538	13/13/13/13/13/13	T/Q/C/N/B/C/EIV8							
1549	EIV9/13/13/13/13	EIV12/10/15/15							
2085	EIV1/ $\beta/\beta/\beta/\Gamma$	EIV2/EIV7/EIV7/EIV7/EIV7							
2087	28/29/74/29/M/F	EIV9/13/13							
8519	28/29/74/29/M/F	EIV4/?;62/EIV11/9							
3571	EIV5/62/62/61/62/61	Israeli-4/Italy-5/61							
5552	$\alpha/\beta/\beta/\beta/\Gamma/\Gamma$	$\alpha/\beta/\Gamma/\Gamma$							
1559	13/13/13	28/29/74/29/M/F	EIV12/10/15/15						
043	13/13/13/13	T/B/C/N/B/C/F	EIV4/62/62/EIV 11/9						
049	13/13/13/13	28/29/74/29/M/F	EIV1/ $\beta/\beta/\beta/\Gamma$						
4519	13/13/13/13/13/13	T/B/C/N/B/C/F	EIV1/ $\beta/\beta/\beta/\Gamma$						
3533	13/13/13/13/13/13	T/Q/C/N/B/C/EIV8	T/C/C						
2089	28/29/74/29/M/F	EIV4/62/62/62/62/EIV11/9	EIV3/EIV7/ $\beta/\beta/$						

			EIV6						
3592	Israeli-4/9/10/Israeli-3/9/10/10/9	EIV9/13/13/13/13	EIV12/10/15						
1546	$\alpha/\beta/\beta/\Gamma$	T/B/C/N/B/C/F	EIV12/10/15	EIV3/EIV7/ β/β /EIV6					
1572	13/13/13/13	EIV1/ $\beta/\beta/\beta/\Gamma$	T/B/C/N/B/C/F	EIV4/62/62/EIV11/9					
3597	13/13/13/13/13/13	EIV12/10/15	13/13/13/13/13	T/C					
8532	?/ $\beta/\beta/\Gamma$	$\alpha/\beta/\beta/\Gamma$	28/29/74/29/M/F	28/29/74/29/M/F	EIV12/10/15				
3600	EIV12/10/15	EIV2/EIV7/EIV7/EIV7/EIV7	$\alpha/\beta/\beta/\beta/\Gamma/\Gamma$	$\alpha/\beta/\beta/\Gamma$	13/13/13/13	T/B/C/N/B/C/F			
4538	tc63_3_s06 EB	Israeli-4/9/10/10/11/9	60/61/62/62/62/61	28/29/74/?/62/61	28/29/74/29/M/F	EIV12/10/15/15			
5591	EIV12/10/15/15	EIV3/?/ β/β /EIV6	$\alpha/\beta/\beta/\beta/\beta/\Gamma$	$\alpha/\beta/\beta/\beta/\Gamma$	EIV3/EIV7/?/ β/β /EIV6	EIV3/?/ β/β /EIV6			
4517	$\alpha/\beta/\Gamma/\Gamma$	13/13/13/13	T/B/C/N/B/C/F	EIV1/ $\beta/\beta/\beta/\Gamma$	$\alpha/\beta/\beta/\beta/\Gamma$	EIV12/10/15	EIV2/EIV7/EIV7/EIV7/EIV7		
5585	EIV12/10/15/15	EIV9/13/ Γ/Γ	T/C/C/B/C	$\alpha/\beta/\beta$	?/C/C/C	EIV12/10/15	T/C		
1527	T/Q/C/N/B/C/EIV8	T/B/C/N/B/C/F	$\alpha/\beta/\beta/\beta/\Gamma/\Gamma$	T/Q/C/N/B/C/F	$\alpha/\beta/\beta$ /LaJ1	$\alpha/\beta/\beta/\beta/\Gamma/\Gamma$	EIV4/62/62/EIV11/9	13/F/B/C/EIV8	
3603	60/62/62/61/62	$\alpha/\beta/\beta/\Gamma$	EIV12/10/15/15	EIV2/EIV7/EIV7/EIV7/EIV7	EIV4/62/62/EIV11/9	T/C	α /EIV7/EIV7/EIV7	EIV12/10/15	EIV5/62/61/61/62

Tabla A-I.3. Clasificación de los genotipos MSP1a en familias considerando la estructura de los repetidos y los integrantes.

Familia de genotipo	Variaciones en las estructuras de los repetidos	% de Bovinos infectados
$\alpha/ \beta/ \Gamma$	$\alpha/ \beta/ \Gamma/ \Gamma$ $\alpha/ \beta/, \beta/ \Gamma$ $\alpha/ \beta/ \beta/ \beta/ \Gamma$ $\alpha/ \beta/ \beta/ \beta/ \Gamma/ \Gamma$ $\alpha/ \beta/ \beta/ \Gamma/ \Gamma$ $\alpha/ \beta/ \beta/ \beta/ \beta/ \Gamma$ $\alpha/ \beta/ \beta$ $\alpha/ \beta/ \beta/ \text{LaJ1}$ $\alpha/ \beta/ \beta/ 15$	43.04%
EIV12/ 10/ 15	EIV12/ 10/ 15 EIV12/ 10/ 15/ 15	30.76%
EIV4/ 62/ EIV11/ 9	EIV4/ 62/ 62/ EIV11/ 9 EIV4/ 62/ 62/ 62/ 62/ EIV11/ 9 EIV4/ 62/ 62/ EIV11/ 9/ 62/ 62/ EIV11/ 9	15.37%
LaJ2/ 13/ 18	LaJ2/ LaJ2/ 13/ 18 LaJ2/ 13/ 18	
EIV9/ 13	13/ 13/ 13 13/ 13/ 13/ 13 13/ 13/ 13/ 13/ 13 13/ 13/ 13/ 13/ 13/ 13 EIV9/ 13/ 13 EIV9/ 13/ 13/ 13 EIV9/ 13/ 13/ 13/ 13	23.06%
T/ C/ B	T/ C T/ C/ C T/ C/ C/ C T/ C/ C/ B T/ C/ C/ B/ C	9.22%
EIV2/ EIV7	EIV2/ EIV7 / EIV7/ EIV7 EIV2/ EIV7 / EIV7/ EIV7/ EIV7	7.69
60/61/62	60/ 61/ 62/ 62/ 61 60/ 61/ 62/ 62/ 62/ 61 60/ 62/ 62/ 61/ 62/ 62	21.5%

Tabla A- I.4. Resumen de cada una de las muestras seleccionadas en el que se resalta el número de secuencias *msp2* obtenidas, la cantidad de alelos identificados, los alelos identificados en más de una ocasión y los que solo se identificaron una vez; también se presenta el nombre de los oligonucleótidos con los que se logró amplificar la muestra.

ID de la muestra	Oligonucleótidos utilizados	Total de secuencias analizadas	Alelos Identificados	Alelos identificados más de 2 veces	Alelos identificados solo una vez
ctr	R1,R2,R3,R4 y R5	723	106	54	52
4511	R1,R2,R3,R4 y R5	622	113	25	88
3611	R1,R2,R3,R4 y R5	677	110	39	71
8536	R1, R3 y R4	294	50	15	35

Figura A-I. Ejemplificación del análisis y procesamiento de las secuencias *msp2* con el programa BioEdit 7.0. En el primer panel se muestra el electroferograma obtenido de la muestra 3611 amplificada con el oligonucleótido R1, posteriormente se presenta la secuencia de nucleótidos en la que se resalta la identificación del oligonucleótido; finalmente se muestra la traducción a aminoácidos de la misma muestra.

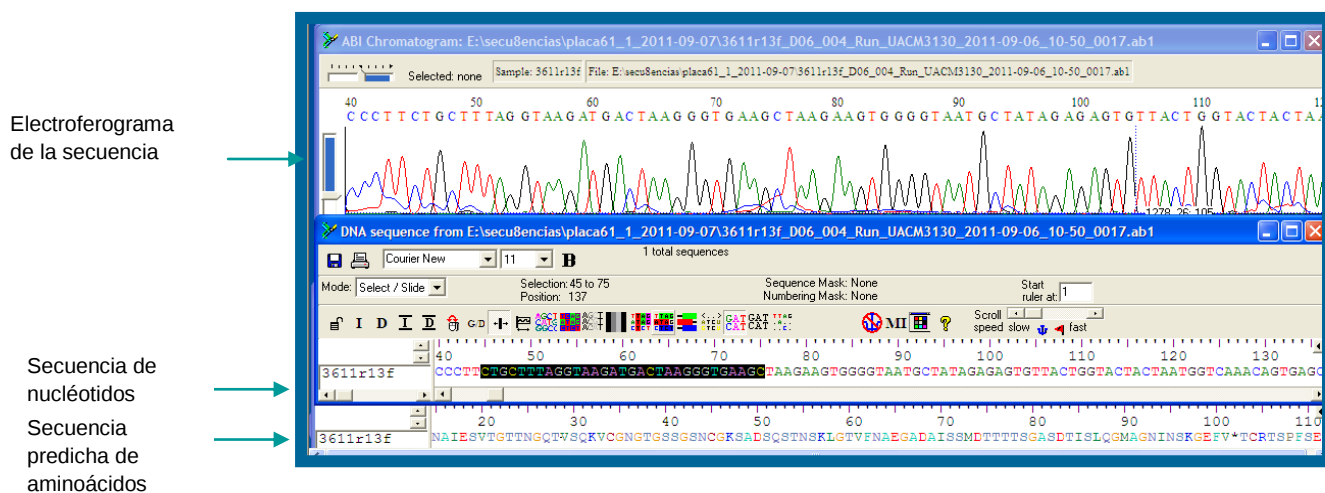
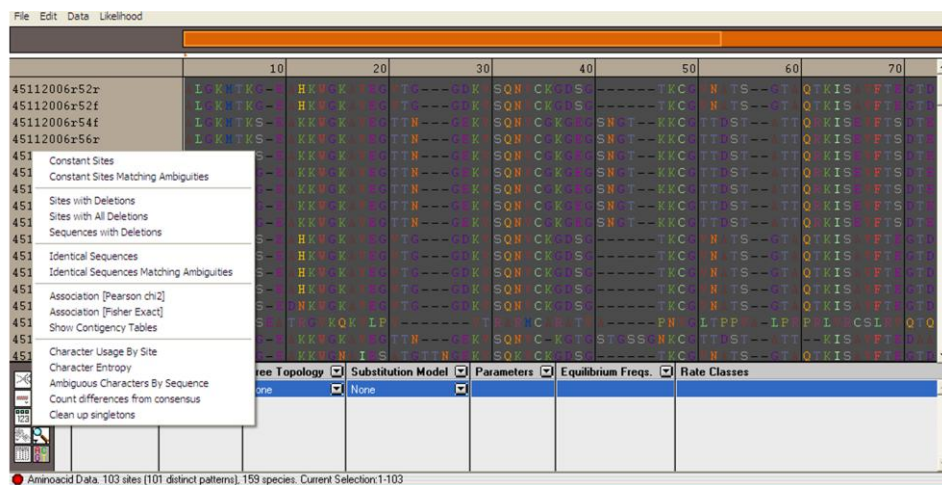


Figura A-I.2. Identificación de secuencias idénticas. Alineamientos del total de secuencias *msp2* obtenidas por animal se analizaron con el programa Hyphy 2.0 1 para llevar a cabo la identificación de alelos idénticos entre todas las secuencias. El programa proporciona una que contiene la información de que secuencias son idénticas comparando una con otra.

Programa HyPhy 2.0



Please cite S.L. Kosakovsky Pond, S. D. W. Frost and S.V. Muse. (2005) HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics* 21: 676-679 if you use HyPhy in a publication

If you are a new HyPhy user, the tutorial located at <http://www.hyphy.org/docs/HyphyDocs.pdf> may be a good starting point.

227(67.76%) duplicate sequences found

8536r13f placa 74 matched 8536r12f es R placa 74
8536r13r es F placa 75 matched 8536r12f es R placa 74
8536r13r placa 74 matched 8536r12f es R placa 74
8536r15r es F placa 74 matched 8536r15f es R placa 74
8536r16f placa 74 matched 8536r15f es R placa 74
8536r16r placa 74 matched 8536r15f es R placa 74
8536r17f placa 74 matched 8536r17r placa 74
8536r19r placa 74 matched 8536r19f placa 74
8536r111r placa 74 matched 8536r111f placa 74
8536r112f placa 74 matched 8536r111f placa 74
8536r112r placa 74 matched 8536r111f placa 74
8536r113r placa 74 matched 8536r113f placa 74
8536r114f es R placa 74 matched 8536r12f es R placa 74
8536r114r es F placa 74 matched 8536r12f es R placa 74
8536r116f placa 74 matched 8536r111f placa 74
8536r116r placa 74 matched 8536r111f placa 74
8536r117f placa 74 matched 8536r111f placa 74
8536r117r placa 74 matched 8536r111f placa 74

Tabla A-I.5. Regiones hipervariables de MSP2 identificadas en este estudio. En la primera columna se presenta el número de la muestra de la cual se obtuvo el material biológico; la segunda columna contiene los números de acceso del Gene Bank de cada una de las secuencias para trabajar, finalmente en el tercer panel se encuentra la secuencia *m*sp2 en aminoácidos. En colores se resaltan secuencias que se obtuvieron de dos muestras diferentes y el asterisco identifica alelos que también fueron obtenidos en muestras del rancho “La Joya”.

Animal	Número de acceso	Región hipervariable de MSP2
4511	KM389088	ATIENTTGGGDVVSQKVCKGTGTGGTNQCGKNTADGNATTKISAVFTEGTEAISSMETATSGATISTSG
8536	KM389063	ATIENTTGSDELSSKKVCGKGDSTGTCGVNATSGTAAQTNGKLSTVFSDEGTDAISSMETATISLQG
4511	AFK11876.1	ATIENTTGSDELSSKKVCGKGDSTGTCGVNATSGTAQTNGKLSTVFNTDGAEAISSMETATISLQGMATNINGKG
8536	AFK11879.1	ATIENTTGSDELSSKKVCKGTGTGGTNQCGVNAASGTTTKISAVFTDEATLLSADTNNVSTSGMAGNING
3611	KM388991	ATIENTTGSVDVSQKVCGKGTLLVAPTSSVVRTPPMAPPRSVRCSLRVRHSNLLSGGGDSINTTG
3611	KM388992	ATIENTTGSVDVSQKVCGKGTTSSTNQCGKNTDGTTKISAVFTDEATLLSAGDTINTTG
3611	KM388993	ATIENTTGSVDVSQKVCGKGTTSSTNQCGKNTDGTTKISAVFTEGTDRTATLLSAGDTIHTTG
3611 y 4511	AFK11964.1	ATIENTTGSVDVSQKVCGKGTTSSTNQCGKNTDGTTKISAVFTEGTDRTATLLSAGDTINTTGMAGNINS
3611	KM388994	ATIENTTGSVDVSQKVCGKGTTSSTNQCGKNTDGTTKISAVFTEGTDRTATLLSAGGDTINTTG
3611	KM388995	ATIENTTGSVDVSQKVCGKGTTSSTNQCGKNTDGTTKISEVFTDEATLLSAGDTINTTG
4511	KM389089	ATIENTTGSVDVSQKVCGNGTSGTGGTQCGKNSGDTNGSSTTQHKISAVFTDEATLLSAGDAINTTG
8536	AFK11913.1	ATIENTTGSVDVSQKVCKGDSGTGCKNASGTAAQTNGKLSTVFSDEGTDAISSMETATISLQG
3611	KM388996	ATIENTTGSVDVSQKVCKGDSGTGCKNTADGNATTKISAVFTEGTEAISSMETATISLQG
3611	KM388997	ATIENTTGSVDVSQKVCKGDSGTGCKNTSGNAAQTNGKLSTVFSDEGTDAISSMETATSGATISTSG
3611	KM388998	ATIENTTGSVDVSQKVCKGDSGTGCKNTSGTAAQTNGKLSTVFRDEGTDAISSMETAPISLQG
3611	KM388999	ATIENTTGSVDVSQKVCKGDSGTGCKNTSGTAAQTNGKLSTVFRDEGTDAISSMETATISLQG
3611, 8536 y 68N	AFK11913.1	ATIENTTGSVDVSQKVCKGDSGTGCKNTSGTAAQTNGKLSTVFSDEGTDAISSMETATISLQGMAGNINS
3611	AFK11913.1	ATIENTTGSVDVSQKVCKGDSGTGCKNTSGTAAQTNGKLSTVFSDEGTDAISSMETATSGATIRTSGMANNINNL
3611	AFK11913.1	ATIENTTGSVDVSQKVCKGDSGTGCKNTSGTAAQTNGKLSTVFSDEGTDAISSMETATSGVTISTSGMANKINNL
3611	KM389000	ATIENTTGSVDVSQKVCKGDSGTCSKNTSGTAAQTNGKLSTVFSDEGTDAISSMETATISVQG
4511	KM389090	ATIENTTGSVDVSQKVCKGENNKCGVNATSGTTAQTAKISAVFTSDTETAQLSTMDTATGSTGTIHLQG

3611	KM389001	ATIENTTGSGDVSQKVCKGTGTGGTIQCGKNTADGNATTKISAVFTEGTEAISSMETATISLQG
3611	KM389002	ATIENTTGSGDVSQKVCKGTGTGGTNQCGKNTADGNAPT KISAVFTEGTEAISSMETATISLQG
4511	KM389091	ATIENTTGSGDVSQKVCKGTGTGGTNQCGKNTADGNATTKISAVFTEGTEAISSMETATFSLQG
3611 y 4511	AFK11883.1	ATIENTTGSGDVSQKVCKGTGTGGTNQCGKNTADGNATTKISAVFTEGTEAISSMETATISLQGMANNINNL
3611	KM389003	ATIENTTGSGDVSQKVCKGTGTGGTNQCGKNTADGNATTKISAVFTEGTEAISSMETATISLR
4511	KM389092	ATIENTTGSGDVSQKVCKGTGTGGTNQCGKNTADGNATTQRKISEVFTSDTETAQLSSDTTNINTTG
4511	KM389093	ATIENTTGSGDVSQKVCKGTGTSGNQCGKNTADGNATTKISAVFTEGTEAISSMETATISLQG
8536	AAQ75021.1	DAIESATGTTNGDPVGNVCRGTGADNSGNNCGPNDGNATTKISTVFNNEGTEAISSMDTTADGTSTISLQG
4511	KM389094	KALEGVTGGDKVSQKVSNNRENNKCGVNATSDTATTKISAVFTEGTD AISADTNNFSTSG
3611	KM389004	KAVEGATGGDKVSQNVCKGDSG TKCGVNATSGTAQTKISAVFTEGTDATQLSADTNNVSTSG
4511	KM389095	KAVEGTTNGEEVSQNVCGKGEGSNGTKKCGTTDSTATTQRKISEVFTSDTETAQLSSDTTNINTTG
3611	KM389005	KAVEGTTNGEKVSQNVCGKGEGSNGTKKCGTTDSTATTKISAVFTEDAAAQLSTMDNTTINTSG
3611	KM389006	KAVEGTTNGEKVSQNVCGKGEGSNGTKKCGTTDSTATTKISAVFTEDAAAQLSTMDNTTINTTG
3611	KM389007	KAVEGTTNGEKVSQNVCGKGEGSNGTKKCGTTDSTATTKISEVFTEGTD TLLSVEGNKDTINFQG
3611	KM389008	KAVEGTTNGEKVSQNVCGKGEGSNGTKKCGTTDSTATTKISEVFTEGTD TLLSVEGNKDTINLQG
4511	AFK11917.1	KAVEGTTNGEKVSQNVCGKGEGSNGTKKCGTTDSTATTQRKISEVFTSDTETAQLSSDTTNINTTGMANNINNL
4511	KM389096	KAVEGTTNGEKVSQNVCGKGEGSNGTKKCGTTDSTATTQRKISEVSTSDTETAQLSSDTTNINTTG
68N	KM389133	KAVEGTTNGEKVSQNVCGNGTGSSGSNCGKNTSGTTATQRKISEVFTDEATLLSADTNNVSTSG
68N	AFK11884.1	KAVEGTTNGEKVSQNVCGNGTGSSGSNCGKNTDSTNNNGKITQAFTADSDTLLSAESSNISTSGMATNING
4511, 3611 y 02V	AFK11971.1	KAVEGTTNGEKVSQNVCKGTGSTGSSGNKCGTTDSTATTKISAVFTEDAAAQLSTMDNTTINTTGMANNIN
4511	KM389097	KAVEGVTGDDKVSQNVCKGDSG TKCGVNATSGTAQTKISAVFTEGTDATQLSADTNNVSTSG
3611	KM389009	KAVEGVTGGDELSKEVCKGENN KCGVNATSGTAAQTNGKLSTVFSDEGTEAISSMETATSGATISTSG
4511	AFK11972.1	KAVEGVTGGDELSKKVCGKGTGTS DTTNQCGTSTAGATTKISAVFTEDAAAQLSTMDTATSSTSTGTISLQGMAGNINS
3611	KM389010	KAVEGVTGGDELSKKVCGKGT TSGNQCGKNTTDGTTKISAVFTEGTDATLLSAAGDTINTTG
3611	AFK11885.1	KAVEGVTGGDELSKKVCGKGT TSGNQCGTSTAGATNKISAVFSADSDTTLLSAESSTSNGTISVQGMAGNINS
4511	KM389098	KAVEGVTGGDELSKKVCGKGT TSGNQCGVNATSGSTNNGKLSTVFNTDGAEAISSMDTTARGTSNTISLQG
4511	AFK11888.1	KAVEGVTGGDELSKKVCGKGT TSGNQCGVNATSGSTNNGKLSTVFNTDGAEAISSMDTTASGTSNTISLQEWRLIT

3611	AFK11888.1	KAVEGVTGGDELSKKVCGKGTSSGNQCGVNATSGSTNNGKLSTVFNTDGAEAISSMDTTASGTSNTISLQGMAGNING
3611	KM389011	KAVEGVTGGDELSKKVCGKGTSSGNQCGVNATSGSTTKISAVFTDEATLLSAAGDTINTTG
4511	AFK11974.1	KAVEGVTGGDELSKKVCGKGTSSGNTNQCGTSTAGATNKISAVFTEGTDATLLSAAGDTINTTGMAGNINS
4511	KM389099	KAVEGVTGGDELSKKVCGKGTSGTGGTNQCGTGTAGATNNNGKITQAFATADSDTLLSAESSTSNGTISVQGG
3611	KM389012	KAVEGVTGGDELSKKVCKGENNKCQVNATSGSPTKISAVFTDEATLLSAAGDTINTTG
4511	KM389100	KAVEGVTGGDELSKKVCKGENNKCQVNATSGSTTKISAVFTDEAALLSAAGDTINTTG
3611	KM389013	KAVEGVTGGDELSKKVCKGENNKCQVNATSGSTTKISAVFTDEATLLSAAGDSLNTTG
3611, 4511 y 8536	KM389014; ACF16203.1	KAVEGVTGGDELSKKVCKGENNKCQVNATSGSTTKISAVFTDEATLLSAAGDTINTTG
4511	KM389101	KAVEGVTGGDELSKKVCKGENNKCQVNATSGSTTKISAVFTDEATLLSAAGDTVNTTG
3611	KM389015	KAVEGVTGGDELSKKVCKGENNKCQVNATSGSTTKISAVFTEGTDTAALLSAAGDTINTTG
3611	KM389016	KAVEGVTGGDELSKKVCKGENNKCQVNATSGSTTKISAVFTGEATLLSAAGDTINTTG
3611	KM389017	KAVEGVTGGDELSKKVCKGENNKCQVNATSGTAAQTNGKLSTVFSDEGTDAILMETATSGATISSSG
3611	KM389018	KAVEGVTGGDELSKKVCKGENNKCQVNATSGTAAQTNGKLSTVFSDEGTDAILMETATSGATISTSG
3611	KM389019	KAVEGVTGGDELSKKVCKGENNKCQVNATSSIAAQTNGLSTVFSDEGTDAISSMEISTSGATISTSG
3611	KM389020	KAVEGVTGGDELSKKVCKGENNKCQVNATSSIAAQTNGLSTVFSDEGTDAISSMETATSGATISTSG
3611	KM389021	KAVEGVTGGDELSKKVCKGENNKCQVNNTSGTAAQTNGKLSTVFSDEGTDAISSMETATSGATISTSG
3611	KM389022	KAVEGVTGGDELSKKVCKGENNQCGKNTSGTTATTQRKISEVFTSDTETAQLSSDTANINTTG
3611	KM389023	KAVEGVTGGDELSKKVCKGENNQCGKNTSGTTATTQRKISEVFTSDTETAQLSSDTTNINTTG
8536	KM389065	KAVEGVTGGDELSKKVCKGTGTDSSGNKCGTNDGNATTKISTVFNTEGTEAISSMDTTASGTSNTISLQG
4511	KM389102	KAVEGVTGGDELSKKVCKGTGTGGTNQCGKNTADGNATTKISAVFTEGTEAISSMETATISLQG
4511	AFK11925.1	KAVEGVTGGDELSKKVCKGTGTGGTNQCGKNTADGTTKISAVFTEDAAAQLSTMDNTTINTTGMAGKH
4511	AFK11926.1	KAVEGVTGGDELSKKVCKGTGTGGTNQCGKNTADGTTKISAVFTSDTETAQLSSDTTNIDTTGMANNINNL
3611	KM389024	KAVEGVTGGDELSKKVCKGTGTGGTNQCGVNAARGTTTKISAVFTDEATLLSADTNNVSTSG
8536	KM389066	KAVEGVTGGDELSKKVCKGTGTGGTNQCGVNAARGTTTKISAVFTDEGRLLSADTNNVSTSG
8536	KM389067	KAVEGVTGGDELSKKVCKGTGTGGTNQCGVNAASGTTAQTKISAVFTDEATLLSADTNNVSTSG
68N	KM389134	KAVEGVTGGDELSKKVCKGTGTGGTNQCGVNAASGTTTKISAVFTDEATLLSADTNNASTSG

8536, 68N y 02V	AFK11890.1	KAVEGVTGGDELSKKVCKGTGTGGTNQCGVNAASGTTTKISAVFTDEATLLSADTNNVSTSG
3611	AFK11891.1	KAVEGVTGGDELSKKVCKGTGTGGTNQCGVNATSGTAQTNGKLSTVFNTDGAEAISSMETATISVQGMAGNING
68N	KM389135	KAVEGVTGGDELSKKVCKGTGTGSGSNCGKNTDSTNNNGKITQAFADSDTTLLSAAGDTINTTG
4511	KM389103	KAVEGVTGGDELSKKVCKGTGTGSNTNQCCKNTADGNATTQRKISEVFTSDTETAQLSSDTTNINTTG
4511	AFK11930.1	KAVEGVTGGDELSKKVCKGTGTGSNTNQCCTSTAGATATQHKISEVFTEGTDATLLSAAGDTINTTGMANNINNL
4511	KM389104	KAVEGVTGGDELSKKVCKGTGTGSNTNQCCTSTAGATATQHKISEVFTEGTDATLLSADTNNVSTSG
4511	KM389105	KAVEGVTGGDELSKKVCKGTGTGSNTNQCCTSTAGATATQHKISEVFTEGTEAISSMETATISLQG
4511	KM389106	KAVEGVTGGDELSKKVCKGTGTSGNQCCKNTADGNATTKISAVFTEGTEAISSMETATISLQG
4511	AFK11931.1	KAVEGVTGGDELSKKVCKGTGTSGNQCCKNTADGNATTQRKISEVFTSDTETAQLSTMENTSTTSGATISTSGMANNIN
4511	KM389107	KAVEGVTGGDELSKKVCKGTTNQCCKNTADGTTAPTKISAVFTEDAAAQLSTMDNTTINTTG
4511	KM389108	KAVEGVTGGDELSKKVCKGTTNQCCKNTADGTTATTKISAVFTEDAAAQLSTMDNTTINTTG
3611 y 02V	AFK11892.1	KAVEGVTGGDELSKKVCKGTTNQCCKNTADGTTATTKISDAFTAGGAELLSSDTNKANIDTTGMANNINNL
4511	AFK11936.1	KAVEGVTGGDELSKKVCKGTTSGSTNQCCKVNATSGTAQTNGKLSTVFNTDGAEAISSMETATISVQGMAGNINS
4511	KM389109	KAVEGVTGGDELSKKVCKGTTNQCCKVNATSGSTTKISAVFTDEATLLSAAGNTINTTG
3611	KM389025	KAVEGVTGGDELSKKVCKGTTNQCCKVNATSGSTTKISAVFTDEATLLSAAGDTINTTG
4511	KM389110	KAVEGVTGGDEPSKKVCKGTTNQCCKVNATSGSTTKISAVFTDEATLLSAAGDTINTTG
8536	KM389068	KAVEGVTGGDKMSQNVNKGDSGKVGWVNATSGTPQTNISAVFIEGTDATQLSADTNNVSTSG
4511	KM389111	KAVEGVTGGDKVSQNVCKGDSGKVGWVNATSGTAQTKISAVFTEGTDATQLSADTNNVSTSG
4511	KM389112	KAVEGVTGGDKVSQNVCKGDSGKVGWVNATSGTAQTKISAVFTEGTDATQLSADTNNVSTSG
4511	KM389113	KAVEGVTGGDKVSQNVCKGDSGKVGWVNATSGTAQTKISAVFTDEATLLSAAGDTINTTG
3611	KM389026	KAVEGVTGGDKVSQNVCKGDSGKVGWVNATSGTAQTKISAVFTEGTDATQLSADTNNVSTSG
4511	KM389114	KAVEGVTGGDKVSQNVCKGDSGKVGWVNATSGTAQTKISAVFTEGTDATQLSADTNNVCTSG
4511 y 02V	AFK11893.1	KAVEGVTGGDKVSQNVCKGDSGKVGWVNATSGTAQTKISAVFTEGTDATQLSADTNNVSTSGMANNINNL
4511	KM389115	KAVEGVTGGDKVSQNVCKGDSGKVGWVNATSGTAQTKISAVFTEGTDATQLSADTNSVSTSG
8536	KM389069	KAVEGVTGGDKVSQNVCKGDSGKVGWVNATSGTAQTKISVVFTEGTDATQLSADTNNVSTSG
4511	KM389116	KAVEGVTGGDKVSQNVCKGTTNQCCKVNATSGTATTKISAVFTEDAAAQLSTMDNTTINTTG
4511	AFK11941.1	KAVEGVTGGDKVSQNVCKGTTNQCCKVNATSGTATTKISAVFTEGTDATQLSADTNNVSTSGMANNINNL

3611	AFK11808.1	KAVEGVTGGDKVSQNVCKGTGTGSDGTTKCGTSTAGATSGTTAQTKISAVFTSDTETAQLSTMDNTTINTTGMANNIN
3611, 4511 y 02V	KM389027	KAVEGVTGGDKVSQNVCRGDSGKCGVNATSGTAQTKISAVFTEGTDATQLSADTNVSTSG
02V	KM389131	KAVENATGTTNGEKVSQKVCGTSSGSTNQCGKNTADGTTATTKISDAFTAGGAELSSDTNKANIDTTG
68N	KM389136	KAVENATGTTNGEKVSQKVCGTSSGSTNQCGTSTAGATNNGKLSTVFNTDGAEAISSMDTTINLQG
68N	KM389137	KAVENATGTTNGEKVSQNVCGNGTGSSGSNCGKNTSGTTATQRKISEVFTDEATLLSADTNVSTSG
3611	KM389028	KAVENATNGAKVSQNVCGKGTGTGSDGNTKKCGTNDGTTATQRKISEVFTDEATLLSAAGDTINTTG
4511	KM389117	KAVENATNGDKVSQNVCGKGTGTGSDGNTKKCGTNDGTTATQRKISEVFTDEATLLSAAGDTINT
3611, 68N y 02V	KM389029	KAVENATNGDKVSQNVCGKGTGTGSDGNTKKCGTNDGTTATQRKISEVFTDEATLLSAAGDTINTTG
3611	KM389030	KAVENATNGDKVSQNVCGKGTGTGSDGNTKKCGTNDGTTATTKISAVFTEDAAAQLSTMDNTTINTTG
3611	KM389031	KAVENATNGDKVSQNVGGKGTGTGSDGNTKKCGTNDGTTATQRKISEVFTDEATLLSAAGDTINTTG
4511	KM389118	KAVESATGTTNGQTVSQNVCGKGTSSGNTKCGVNATSGTAQTKISAVFTEGTDATQLSADTNVSTSG
4511	KM389119	KAVESATGTTNGQTVSQNVCGKGTSSGNTNCGVNATNGSSTTQHKISEVFTEGTEAATQLSADTNVSTSG
3611	KM389032	KAVKGVTTGGDKVSQNVCKGDSGKCGVNATSGTAQTKISAVFTEGTDATQLSADTNVSTSG
4511	KM389120	KLVKCVTTGGDKVSLNVCKGENNCKGVNATSGTATTEISVVFTEGTDVISVHTNNVGTSG
8536	KM389070	NAIESATATTNGDTVSKNVCKGDSGTCGKNTSGTATTKISAVFTDEATLLSADTNVSTSG
3611	KM389033	NAIESATGITNGEKVSQKVCNGTSGTGGPQCGKNSGDTNGSSTTQHKISAVFTDEATLLSAAGDTINTTG
8536	KM389071	NAIESATGTSNGDTVSKNVCKGTGTSDDTNQCGTSTAGATTKISAVFTEDAAAQLSTMDTATSSTSTGTISLQG
3611	KM389034	NAIESATGTTNGEKVSQKVCCKGDSGKCGVNATSGTAQTKISAVFTEGTDATQLSADTNVSTSG
68N	KM389138	NAIESATGTTNGDKVSQNVCGKGTGTGGTNQCGTSTAGATNNGKLSTVFNTDGAEAISSMETATISLQG
8536	KM389072	NAIESATGTTNGDTVSKNVCKDDSGTCGKNTSGTATTKISAVFTEDAAAQLSTMDTATSSTSTGTISLQG
8536	KM389073	NAIESATGTTNGDTVSKNVCKGDSGTCGKNTSGTATTKISAVFTDEATLLSADTNVSTSG
8536	AFK11944.1	NAIESATGTTNGDTVSKNVCKGDSGTCGKNTSGTATTKISAVFTEDAAAQLSTMDTATSSTSTGTISLQG
8536	AFK11896.1	NAIESATGTTNGDTVSKNVCKGTGTDSSGNKCGTNDGNATTKISTVFNTGTEAIISSMDTTASGTSNTISLQG
4511	AFK11896.1	NAIESATGTTNGDTVSKNVCKGTGTDSSGNKCGTNDGNATTKISTVFNTGTEAIISSMDTTASGTSNTISLQGMAGEH
8536	KM389074	NAIESATGTTNGDTVSKNVCKGTGTSDDTNQCGTSTAGATTKISAVFTEDAAAQLSTMDTATSSTSTGTISLQG
4511	AFK11943.1	NAIESATGTTNGDTVSKNVCKGTGTSDDTNQCGTSTAGATTKISAVFTEDAAAQLSTMDTATSSTSTGTISLQGMAGNINS
4511	KM389121	NAIESATGTTNGDTVSKNVCKGTGTSDDTNQCGTSTAGATTKISAVFTEDAAGQLSTMDTATSSTSTGTIGLQG

3611	KM389035	NAIESATGTTNGEKVSQKVCGEGTTSGSTNQCGKNTTDGTTKISAVFTEGDTATLLSAAGDTINTTG
68N	KM389139	NAIESATGTTNGEKVSQKVCNGGTGSSGSNHCGVNTGNTNKISAVFSAEGADAISSMDTTTTSGASGTISVQG
68N	KM389140	NAIESATGTTNGEKVSQKVCNGGTGSSGSNHCGVNTGNTNNGKLSTVFNTDGAEAISSMETATISLQG
4511	AFK11897.1	NAIESATGTTNGEKVSQKVCNGGTGSSGTQCGKNSGDTNGSSTTQHKISAVFTEGTEAISSMETASGASGTISLQGMATKHQW
8536	AAD19629.1	NAIESATGTTNGEKVSQKVCNGGTGSSGTQCGTSTAGATSGSSGTTQRKISEVFTSDTETAQLSTMENTSTTSG
4511	KM389122	NAIESATGTTNGEKVSQKVCNGGTGSTGTTGCKSADSQSTNSKLGTVFNAEGADAISSMDTTTASGTSNTISLQG
4511 y 3611	AFK11898.1	NAIESATGTTNGEKVSQKVCNGTSGTGGTQCGKNSGDTNGSSTTQHKISAVFTEATLLSAAGDTINTTGMAGNINS
3611	AFK12031.1	NAIESATGTTNGEKVSQKVCNGTSGTGGTQCGKNSGDTNGSSTTQHKISAVFTEATLLSAAGTPSTRQDGGNIN
4511	KM389123	NAIESATGTTNGEKVSQKVCNGTSGTGGTQCGKNSGDTNGSSTTQHKISAVFTEDAAAQLSTTDNTTINTTG
3611	KM389036	NAIESATGTTNGEKVSQKVCNGTSGTGGTQCGKNSGDTNGSSTTQHKISAVFTEATLLSAAGDTINTTG
3611	KM389037	NAIESATGTTNGEKVSQKVCNGTSGTGGTQCGKNSGDTNGSSTTQHKISAVFTEGDTATLLSAAGDTINTTG
3611	KM389038	NAIESATGTTNGEKVSQKVCNGTSGTGGTQCGKNSGDTNGSSTTQHKISAVSTDEATLLSAAGDTINTTG
3611	KM389039	NAIESATGTTNGEKVSQKVCNGTSGTGGTQCGKNSGDTNGSSTTQHKISGVFTDEATLLSAAGDTINTTG
3611	KM389040	NAIESATGTTNGEKVSQKVCNGTSGTGGTQCGKNSGDTNGSSTTQHKMSAVFTEATLLSAAGDTINTTG
3611	KM389041	NAIESATGTTNGEKVSQKVCCKGDSGKCGVNATSGTAQTKISAVFTEGDTATQLSADTNNVSTPG
4511 y 3611	AFK11900.1	NAIESATGTTNGEKVSQKVCCKGDSGKCGVNATSGTAQTKISAVFTEGDTATQLSADTNNVSTSGMANNIN
3611	KM389042	NAIESATGTTNGEKVSQKVCCKGDSGKCGVNATSGTTQTKISAVFTEGDTATQLSADTNNVSTSG
68N	KM389141	NAIESATGTTNGEKVSQNVCKGTGTGGTNQCGTSTAGATNNGKLSTVFNTDGAEAISSMETATISLQG
4511	KM389124	NAIESATGTTNGEKVSQNVCKGDSGKCGVNATSGTAQTKISAVFTEGDTATQLSADTNNVSTSG
3611	KM389043	NAIESATGTTNGEKVSQRVCNGTSGTGGTQCGKNSGDTNGSSTTQHKISAVFTEATLLSAAGDTINTTG
3611	KM389044	NAIESATGTTNGGKVSQKVCCKGDSGKCGVNATSGTAQTKISAVFTEGDTATQLSADTNNVSTSG
8536	AFK11990.1	NAIESATGTTSGDELSKKVCGKGTTSNQCQGVNATSGSTNNGKLSTVFSDEGTDIAISSMETATISLQG
8536	KM389075, AAM89963.1	NAIESATGTTSGDELSKKVCGKGTTSNQCQGVNATSGSTNNGKLSTVFSDEGTDIAISSMETATISVQG
8536	AAM89963.1	NAIESATGTTSGDELSKKVCGKGTTSNQCQGVNATSGSTNNGKLSTVFSDEGTDIAISSMETATISVQG
8536	KM389076	NAIESATGTTSGDELSKKVCGKGTTSNQCQGVNATSGSTNNGKLSTVFSDEGTDIAISSMETATISLQG
3611	KM389045	NAIESATGTTSGDTVSKKVCCKGTGTGTTGCKSADSQSTNSKLGTVFNAEGADTATQLSADTNNVSTSG

4511	AFK11994.1	NAIESATGTTSGDTVSKKVCCKGTTSGTQCGKNSGDTSGSTTQHKISAVFTSDTETAQLSSDTTIDTTGMANNIIT*
3611	KM389046	NAIESDTGTTNGEKVSQKVCNGTSGTGGTQCGKNSGDTNGSSTTHHKISAVSTDEATLLSAAGDTINTTG
3611	KM389047	NAIESVTGTTNGQTVSQKVCANGTGSSGSNCGKSADSQSTNSKLGTVFNAEGADAISMDTTTTSGASGTISLQG
02V	KM389132	NAIESVTGTTNGQTVSQKVCCKGTGSGSGNKCCTDSTATTKISAVFTEDAAAQLSTMDNTTINTTG
4511	KM389125	NAIESVTGTTNGQTVSQKVCCKGTTSGSNTNQCGKNTDSTNNNGKITQAFADSDTTLLSAESSNISTSG
4511	KM389126	NAIESVTGTTNGQTVSQKVCCKGTTSGSNTNQCGTSTAGATTKISAVFTEDAAAQLSTMDTATSSTSTGTISLQG
8536	KM389077	NAIESVTGTTNGQTVSQKVCNGTGSSGSNCGKNTSGTAAQTNGKLSTVFSDEGDAISSMETATISLQG
3611	KM389048	NAIESVTGTTNGQTVSQKVCNGTGSSGSNCGKSADSQSTNSKLGTVFNAEGADAISMDTTTTSGASDTISLQG
3611 y 4511	KM389049	NAIESVTGTTNGQTVSQKVCNGTGSSGSNCGKSADSQSTNSKLGTVFNAEGADAISMDTTTTSGASGTISLQG
3611	KM389050	NAIESVTGTTNGQTVSQKVCNGTGSSGSNCGKSADSQSTNSKLGTVFNAEGADAISMETATISLQG
3611	KM389051	NAIESVTGTTNGQTVSQKVCNGTGSSGSNCGKSADSQSTNSKLGTVFNAEGADTATQLSADTNNVSTSG
3611	KM389052	NAIESVTGTTNGQTVSQKVCNGTGSSGSNCGKSADSQSTNSKLGTVFNGEGADAISMDTTTTSGASGTISLQG
4511	AFK11950.1	NAIESVTGTTNGQTVSQKVCNGTGSSGSNCGVNSGTTGSTNGNKISAVFSAEGAEAISSMDTTASGTSNTISLQGWRLIT
3611	KM389053	NAIESVTGTTNGQTVSQKVCNGTGSSGTQCGKNSGDPNGSSPTQQKISAVFTSDTETAQLSTMENTSTTSGATISTSG
3611 y 4511	KM389054	NAIESVTGTTNGQTVSQKVCNGTGSSGTQCGKNSGDTNGSSTTQHKISAVFTSDTETAQLSTMENTSTTSGATISTSG
3611	KM389055	NAIESVTGTTNGQTVSQKVCNGTSGTGGTQCGKNSGDTNGSSTTQHKISAVFTDEATLLSAAGDTINTTG
8536	KM389078	NAIESVTGTTNGQTVSQKVCNGTSGSNTNQCGVNAASGTTTKISAVFTDEAALLSADTNNVSTSG
8536	AFK11952.1	NAIESVTGTTNGQTVSQKVCNGTSGSNTNQCGVNATSGSTNNGKLSTVFNTDGAEAISSMDTTTTSGTSTG
3611	AAM89967.1	NAVENATNGDKVSQNVCKGTGSGSGNKCCTDSTATTKISAVFTEDAAAQLSTMDNTTINTTGMANNIN
3611	KM389056	TTIENTPGSGDELSKKVCGKGDGSGTKCGVNATSGTAQTNGKLSTVFNTDGAEAISSMETATISVQG
3611	KM389057	TTIENTTASGYELSKKVCCKGDSGTKCGVNATSGTAQTNGKLSTVFNTDGAEAISSMETATISVQG
3611	KM389058	TTIENTTGSADLSKKVCGKGDGSGTKCGVNATSGTAQTNGKLSTVFNTDGAEAISSMETATISVQG
8536	KM389079	TTIENTTGSGDELSKKVCGKGDGRGKCGVNATSGTAQTNGKLSTVFNTDGAEAISSMETATISVQG
8536	KM389080	TTIENTTGSGDELSKKVCGKGDGSGTKCEVNATSGTAQTNGKLSTVFNTDGAEAISSMETATISVQG
8536	KM389081	TTIENTTGSGDELSKKVCGKGDGSGTKCEVNATSGTAQTNGKLSTVFNTDGGEAISSMETATISVQG
3611	KM389059	TTIENTTGSGDELSKKVCGKGDGSGTKCGVNATSGTAQTNGKFSTVFNTDGAEAISSMETATISVQG
3611	KM389060	TTIENTTGSGDELSKKVCGKGDGSGTKCGVNATSGTAQTNGKLSTVFHTDGAEAISSMETATISVQG

3611	AFK11876.1	TTIENTTGSGDELSKKVCGKGDSTKCGVNATSGTAQTNGKLSTVFNTDGAEAISSMETATISLQGMATNING
8536y 3611	AFK11903.1	TTIENTTGSGDELSKKVCGKGDSTKCGVNATSGTAQTNGKLSTVFNTDGAEAISSMETATISVQG
8536	KM389082	TTIENTTGSGDELSKKVCGKGDSTKCGVNATSGTAQTNGKLSTVFNTDGAEAISSMETATISVQG
3611	KM389061	TTIENTTGSGDELSKKVCGKGDSTKCGVNATSGTAQTNGKLSTVFSDEGDAISSMETATISLQG
8536	KM389083	TTIENTTGSGDELSKKVCGKGDSTKCGVNATSGTAQTNGKLSTVFSDEGDAISSMETATISVQG
8536	AFK11913.1	TTIENTTGSGDVSQKVCCKGDSGTCGKNSTGTAAQTNGKLSTVFSDEGDAISSMETATISLQGMAGNINS
8536	KM389084	TTIENTTGSGDVSQKVCCKGDSGTCGKNSTGTAAQTNGKLSTVFSDEGDAISSMETATISLQG
4511	KM389127	TTIENTTGSGDVSQKVCCKGTGTGGTNQCGKNTADGTTKISAVFTSDTETAQLSSDTTIDTTG
3611	AFK11905.1	TTVEAATNGQTVSQKVCCKGTTSGTGGTNQCGTGTAGATTKISAVFTEGDAISSMDTTTSGASGTISLQGMAGNINS
4511	KM389128	TTVEAATNGQTVSQKVCCKGTTSGTGGTNQCGTGTAGATTKISAVFTEGDAISSMETATSGATISTSG
4511	KM389129; AAK76933.1	TTVEAATNGQTVSQKVCNGTGSNCGVNSGTTGSTNGNKISAVFSAEGAEAISSMDTTSNGTTINVSG
4511	AAK76933.1	TTVEAATNGQTVSQKVCNGTGSNCGVNSGTTGSTNGNKISAVFSAEGAEAISSMDTTSNGTTINVSGMATNING
3611 y 4511	KM389062	TTVEAATNGQTVSQKVCNGTGSSGSNCGKNTDSTNNGKITQAFTADSDTLLSAESSNISTSG
4511	AFK12053.1	TTVEAATNGQTVSQKVCNGTGSSGSNHCNVNTGNTNNGKLSTVFNTDGAEAISSMDTTASGTSNTISLQGMAGNINS
8536	KM389085	TTVEAATNGQTVSQKVCNGTGSSGTQCGTSTAGATSGSSGTTQRKISEVFTSDTETAQLSTMENTSTTSGATISTSG
4511	AFK12006.1	TTVEAATNGQTVSQKVCNGTSGGSTATTQRKISEVFTEGTDTATQLSADTNNVSTSGMANNINNL
4511	KM389130	TTVEAATNGQTVSQKVCNGTSGGSTGTGCKNATSGSTNNGKITQAFTADSDTLLSAESSTSNGTISVQG
4511	AFK12057.1	TTVEAATNGQTVSQKVCNGTSGGSTGTGCKNATSGTAQTNGKLSTVFNTDGAEAISSMETATISTSGMATNING
8536	KM389086	TTVEAATNGQTVSQKVCCKGTGSTGTGCKGTTDSTATTKISAVFTEGADAISSMDTTASGTSNTISFQG
8536 y 3611	AFK11819.1	TTVEAATNGQTVSQKVCCKGTGSTGTGCKGTTDSTATTKISAVFTEGADAISSMDTTASGTSNTISLQEWRLIA
8536	KM389087	TTVEAATNGQTVSQKVCCKGTGSTGTGCKGTTDSTATTKISAVFTEGADAIWSMDTTASGTSNTISLQG
4511	AFK12058.1	TTVEAATNGQTVSQNVCKGENNCGVNATSGTTAQTKISAVFTSDTETAQLSTMDTATGSTGTINLQGMATNING
8536	AFK11896.1	VSKNVCKGTGTDSSGNKCGTNDGNATTKISTVFNTGTEAISSMDTTASGTSNTISLQGMAGNINSKGEFV

Todas las secuencias con números de acceso que inician con el identificador AFK11xxx fueron reportadas previamente (Ueti y cols, 2012) pero estas secuencias se obtuvieron a partir de muestras provenientes del rancho “El Verdineño”.

Tabla A-I.5. Identificación de microdominios MSP2 y frecuencia de cada uno de estos. En las tablas se resumen la comparación de los microdominios 1, 2 y 3 identificados en el estudio con respecto a los microdominios reportados por Ueti en 2012 que incluyen: microdominios de la cepa St. Maries, los de aislados obtenidos de zonas templadas y microdominios de muestras tropicales. (A) Microdominio1 (B) Secuencias del microdominio2. (C) Microdominio3. En las tablas se presentan: las secuencias del microdominio, en las cuales se subrayan los aminoácidos conservados, las veces en las que se identificó esa secuencia y la frecuencia de cada variable; para el cálculo de la frecuencia el análisis incluyó un total de 3285 secuencias. En la última columna se indica el número de la muestra de la que se obtuvo la secuencia.

A)

St. Maries	Secuencia del microdominio	Número de veces identificado	Frecuencia (%)	Muestras en las que se identificó
1	<u>GTGSSGTQCG</u>	21	0.639	El Verdineño 8536, 4511, 3611
2	<u>GEGSNGTKKCG</u>	93	2.831	El Verdineño4511, 3611
3	<u>GTTSGNQCG</u>	77	2.343	El Verdineño 8536, 4511, 3611; La Joya 02V
5	<u>GTGSSGSNCG</u>	345	10.502	El Verdineño 8536, 4511, 3611; La Joya 68N
Templado				
3	<u>GTGTGGTNQCG</u>	406	12.359	El Verdineño 8536, 4511, 3611; La Joya 68N, 02V
11	<u>GTGSTGSSGNKCG</u>	115	3.500	El Verdineño 4511, La Joya 02V
Tropical				
1	<u>GDSGTKCG</u>	413	12.572	El Verdineño 4511, 3611, 8536; La Joya 02V
2	<u>GTTSGSNTNQCG</u>	36	1.095	El Verdineño 4511, 8536
3	<u>GTTSGSTNQCG</u>	82	2.496	El Verdineño 4511, 3611; La Joya 68N
4	<u>GDSGTCCG</u>	171	5.205	El Verdineño 8536; La Joya 668N
9	<u>GTGSTGTTCCG</u>	16	0.487	El Verdineño 4511, 3611
19	<u>GTGTSGNQCG</u>	5	0.152	El Verdineño 4511; La Joya 02V
21	<u>GENNKCG</u>	493	15.007	El Verdineño 4511, 8536, 3611; La Joya 02V
23	<u>GTGSSGSNHCG</u>	86	2.617	El Verdineño 4511; La Joya 68N
24	<u>GTSGTGGTQCG</u>	91	2.770	El Verdineño 4511, 3611
29	<u>GTTSGTQCG</u>	23	0.700	El Verdineño 4511

B) Microdominio 2

St. Maries	Secuencia del microdominio	Número de veces identificado	Frecuencia (%)	Muestras en las que se identificó
1	<u>CGKNSGDTNGSSTTQHK</u>	101	3.074	El Verdineño 4511, 3611; La Joya 02V
2	<u>CGTTDSTATTK</u>	211	6.423	El Verdineño 4511, 3611, 8536; La Joya 02V
3	<u>CGVNATSGSTNNGK</u>	59	1.796	El Verdineño 4511, 3611, 8536; La Joya 02V
5	<u>CGKNTTDSTNNGK</u>	270	8.219	El Verdineño 4511, 3611, La Joya 02V
Templado				
3	CGVNATSGTAQTNGK	113	3.439	El Verdineño 8536, 3611, 4511
Tropical				
2	<u>CGTSTAGATNK</u>	31	0.943	El Verdineño 4511, 3611
3	<u>CGKNTTDGTTK</u>	74	2.252	El Verdineño 4511, 3611
4	<u>CGKNTSGTAAQTNGK</u>	141	4.292	El Verdineño 8536, 3611; La Joya 68N
6	<u>CGKNTADGNATTK</u>	93	2.831	El Verdineño 4511, 3611
9	<u>CGKSADSQSTNSK</u>	96	2.922	El Verdineño 4511, 3611
14	<u>CGVNATSGTAAQTNGK</u>	35	1.065	El Verdineño 3611
15	<u>CGVNAASGTTTK</u>	280	8.523	El Verdineño 8536, 3611; La Joya 68N, 02V
16	<u>CGKNTADGTTK</u>	17	0.5175	El Verdineño 4511, 3611
19	<u>CGKNTADGNATTQRK</u>	8	0.243	El Verdineño 4511
20	<u>CGVNATSGTAQTK</u>	334	10.167	El Verdineño 4511, 3611, 8536
22	<u>CGKNSGDTSGSTTQHK</u>	23	0.700	El Verdineño 4511
23	<u>CGVNTGNTNNGK</u>	6	0.182	La Joya 68N
26	<u>CGTNDGTTATQRK</u>	222	6.757	El Verdineño 4511, 3611; La Joya 02V, 68N

C) Microdominio 3

St Maries	Secuencia del Microdominio	Número de veces identificado	Frecuencia (%)	Muestras en las que se identificó
1	<u>ETDEATLLSAAGDTI</u>	1125	34.246	El Verdineño 3611, 4511, 8536; L a Joya 02V
2	<u>ETEGTDLLSVEGNKDTI</u>	42	1.278	El Verdineño 3611
3	<u>ENTDGAEISSMDTTASGTSNTI</u>	33	1.004	El Verdineño 3611, 4511, 8536; L a Joya 02V
4	<u>ETEDDAAAQLSTMDNTI</u>	145	4.414	El Verdineño 3611, 4511; L a Joya 02V
5	<u>ETADSDTTLLSAESSNI</u>	249	7.579	El Verdineño 3611, 4511; L a Joya 68N
Templado				
2	<u>ETEGTDATQLSADTNNV</u>	300	9.132	El Verdineño 3611, 4511, 8536; L a Joya 02V
4	<u>FTEGTEAISSMETASGSGTI</u>	1	0.030	El Verdineño 4511
Tropical				
1	<u>ETDEATLLSADTNNV</u>	302	9.193	El Verdineño 8536, 3611; La Joya 02V, 68N
2	<u>ETEGTDATLLSAAGDTI</u>	114	3.470	El Verdineño 3611, 4511
4	<u>FSDEGTDAISSMETATI</u>	164	4.992	El Verdineño 8536, 4511; La Joya 68N
5	<u>ENTDGAEAISSMATATI</u>	133	4.0487	El Verdineño 4511, 3611, 8536; La Joya 68N
6	<u>FTEGTEAISSMETATI</u>	94	2.861	El Verdineño 4511, 3611, 8536
9	<u>FNAEGADAISSMDTTTTSGASGTI</u>	69	2.100	El Verdineño 3611
10	<u>FSADSDTTLLSAESSTSNGTI</u>	23	0.700	El Verdineño 3611, 4511
14	<u>FSDEGTDAISSMETATSGATI</u>	38	1.156	El Verdineño 3611
16	<u>FTSDTETAQLSSDTTNI</u>	104	3.165	El Verdineño 3611, 4511
19	<u>FTSDTETAQLSTMENTSTTSGATI</u>	22	0.669	El Verdineño 4511, 3611, 8536
21	<u>ETEGTDAISADTNNV</u>	8	0.243	

Tabla A-I.7. Nuevas secuencias de microdominios 1, 2 y 3. Estas secuencias fueron identificadas en muestras analizadas en este estudio. Las tablas presentan las secuencias de cada uno de los microdominios en la que se resalta en color los aminoácidos conservados y se presenta la frecuencia de cada uno de estos así como el identificador de la muestra de la que se obtuvo el aislado. A) Microdominio 1 B) Microdominio 2 y C) Microdominio 3.

A)

Secuencia del microdominio 1	Número de veces identificado	Frecuencia (%)	Muestras en las que se identificó:
GTGTGSDGNTKKCG	227	6.979	La Joya 02V, 68N / El Verdineño 3611/ ctr
GTTNQCG	91	2.110	La Joya 02V / El Verdineño 4511, 3611/ ctr
GTGSTGKCG	53	1.61339	El Verdineño 8536/ 3611
GTGSNCG	21	0.639	El Verdineño 4511
GTGTDSSGNKCG	20	0.608	El Verdineño 3611, 8536
GTGSDTTNQCG	19	0.578	El Verdineño 3611, 8536
GTTSGTGGTNQCG	18	0.547	El Verdineño 4511, 3611
GTGTGSGSNCG	17	0.517	La Joya 68N
GSTNQCG	14	0.426	La Joya 68N
GTGTGSNTNQCG	12	0.365	El Verdineño 4511
GENNQCG	8	0.243	El Verdineño 3611
GECSNGTEKCG	6	0.182	ctr
GTGSSGNCG	4	0.121	ctr
GTSGGSTGTTGCG	3	0.091	El Verdineño 4511
DDSGTGGCG	3	0.0910	La Joya 02V/ El Verdineño 8536
GTGTGSDGTTKKCG	2	0.0608	El Verdineño 3611
GTGSTGSSSNKCG	2	0.0608	El Verdineño 4511
GTSG	2	0.060	El Verdineño 451
GSSGSNCKCG	2	0.0608	La Joya 68N
GDSGTGGKSGVG	1	0.030	El Verdineño 8536
GTGSTGSSGDKCG	1	0.0304	La Joya 02V
GTGTGGADQSG	1	0.0304	La Joya 68N
GTTTGTTNQCG	1	0.030	La Joya 68N
GTGGTNQCG	1	0.0304	El verdineño 4511

B) Microdominio 2

Secuencia del Microdominio 2	Número de veces identificado	Frecuencia (%)	Muestras en las que se identificó
CGVNATSGSTTK	418	12.724	El Verdineño 4511, 3611/ ctr
CGKNTADGTTATTK	92	2.800	La Joya 02V/ El Verdineño 4511/ ctr
CGVNTGNTNK	72	2.191	La Joya 68N
CGTTDSTATTQRK	56	1.704	El Verdineño 4511
CGTSTAGATNNGK	35	1.065	La Joya 68N
CGKNTSGTATTK	32	0.974	La Joya 02V/ El Verdineño 8536
CGTSTAGATATQHK	28	0.852	El Verdineño 4511
CGVNSGTTGSTNGNK	25	0.761	El Verdineño 4511
CGTNDGNATTK	19	0.5783	El Verdineño 4511, 3611, 8536
CGTGTAGATTK	18	0.5479	El Verdineño 4511, 3611
CGTSTAGATTK	18	0.547	El Verdineño 4511, 8536
CGTSTAGATSGSSGTTQRK	13	0.395	El Verdineño 8536
CGKNTSGTTATQRK	13	0.395	La Joya 68N
CGTNDGTTATTK	7	0.213	El Verdineño 3611
CGKNTSGTTATTQRK	6	0.182	El Verdineño 3611
CGENTTDSTNNNGK	5	0.152	ctr
CGVNTGNTNNGK	5	0.152	El Verdineño 4511
CGVNAASGTTATQTK	4	0.121	El Verdineño 8536
CGVNATSGTTAQT	3	0.091	El Verdineño 4511
CGKNATSGTAQTNGK	2	0.060	El Verdineño 4511
GSTATQRK	2	0.060	El Verdineño 4511
CGTSTAGATSGTTAQT	2	0.060	El Verdineño 361
CGKNATSGSTNNNGK	1	0.030	El Verdineño 4511
CGKNTTDSTNNNGK	1	0.030	ctr
CGVNTGNTDK	1	0.030	La Joya 68N
GVNTGNTAT	1	0.030	La Joya 68N
CGANTGNTNN	1	0.030	La Joya 68N
CGVAASGTTT	1	0.030	La Joya 68N
CGTGTAGATNNNGK	1	0.030	El Verdineño 4511
GGVNGAGGTATK	1	0.030	La Joya 68N
CRKSTTDTTNNNNN	1	0.030	La Joya 68N
CRKSTSDTANNGN	1	0.030	La Joya 68N
CGTDSTATTQRK	1	0.030	El Verdineño 4511

C) Microdominio 3

Secuencia del Microdominio 3	Número de veces identificado	Frecuencia (%)	Muestras en las que se identificó
FTAGGAELLSSDTNKAN	87	2.648	La Joya 02V/ ctr
FSAEGADAISMDTTTTSGASGT	74	2.252	La Joya 68N
FTEGADAISMDTTASGTSNT	53	1.6136	El Verdineño 8536, 3611
FTEDAAAQLSTMDTATSSTSTGT	44	1.339	La Joya 02V / El Verdineño 8536, 4511
FNTDGAEAISSMDTT	39	1.187	La Joya 68N
FSAEGAEAISSMDTTSSNGTT	21	0.639	El Verdineño 4511
FNTEGTEAISSMDTTASGTSNT	17	0.517	El Verdineño 8536
FTADSDTTLLSAAGDT	16	0.487	La Joya 68N
FTEGTDAISSMETATSGAT	14	0.426	El Verdineño 4511
FNAEGADAISMDTTTTSGTSNT	12	0.365	El Verdineño 4511
FNTDGAEAISSMDTTTTSGTSTGT	12	0.365	El Verdineño 8536, 4511
FNAEGADAISMDTTTTSGASDT	5	0.152	El Verdineño 3611
FTEDAAAQLSTTDNTT	4	0.121	El Verdineño 4511
FNAEGATATQLSADTNN	4	0.121	El Verdineño 3611
FNAEGADTATQLSADTNN	4	0.121	El Verdineño 3611
FSAEGAEAISSMTTASGTSNT	4	0.121	El Verdineño 4511
FTEGTDAISSMDTTTSGASGT	4	0.121	El Verdineño 3611
FTGEATLLSAAGDTINTT	3	0.0913	El Verdineño 3611
FTDEAALLSADTNN	2	0.0608	El Verdineño 8536
FNAEGADAISMETATI	2	0.0608	El Verdineño 3611
FTSDTETAQLSTMDNTT	2	0.0608	El Verdineño 3611
FTDEATLLSGWGV	2	0.0608	El Verdineño 4511
FTEGTEAISSMETATSGAT	2	0.0608	El Verdineño 8536
FTSDTETAQLSTMDTATGSTGT	2	0.0608	El Verdineño 4511

ANEXO II

RESEARCH ARTICLE

Association of *Anaplasma marginale* Strain Superinfection with Infection Prevalence within Tropical Regions

Elizabeth J. Castañeda-Ortiz¹, Massaro W. Ueti^{2,3}, Minerva Camacho-Nuez¹, Juan J. Mosqueda⁴, Michelle R. Mousel², Wendell C. Johnson², Guy H. Palmer^{5*}

1 Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, México D.F., México,

2 Animal Disease Research Unit, USDA-ARS, Pullman, Washington, United States of America,

3 Department of Veterinary Microbiology and Pathology, Washington State University, Pullman, Washington, United States of America, **4** Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Juriquilla, Juriquilla, México,

5 Paul G. Allen School for Global Animal Health, Washington State University, Pullman, Washington, United States of America

* gpalmer@vetmed.wsu.edu



OPEN ACCESS

Citation: Castañeda-Ortiz EJ, Ueti MW, Camacho-Nuez M, Mosqueda JJ, Mousel MR, Johnson WC, et al. (2015) Association of *Anaplasma marginale* Strain Superinfection with Infection Prevalence within Tropical Regions. PLoS ONE 10(3): e0120748. doi:10.1371/journal.pone.0120748

Academic Editor: Roman Ganta, Kansas State University, UNITED STATES

Received: November 28, 2014

Accepted: January 26, 2015

Published: March 20, 2015

Copyright: This is an open access article, free of all copyright, and may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose. The work is made available under the [Creative Commons CC0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) public domain dedication.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files with provision of GenBank accession numbers. The new *msp1a* sequences have been deposited in GenBank (accession numbers KF791969–KF792017); accession numbers for all *msp1a* repeat sequences in the El Verdineño and La Joya animals are provided in [S3 Table](#). Newly identified sequences are provided in [S4 Table](#) and have been deposited in GenBank (accession numbers KM388991–KM389141).

Abstract

Strain superinfection occurs when a second strain infects a host already infected with and having mounted an immune response to a primary strain. The incidence of superinfection with *Anaplasma marginale*, a tick-borne rickettsial pathogen of domestic and wild ruminants, has been shown to be higher in tropical versus temperate regions. This has been attributed to the higher prevalence of infection, with consequent immunity against primary strains and thus greater selective pressure for superinfection with antigenically distinct strains. However an alternative explanation would be the differences in the transmitting vector, *Dermacentor andersoni* in the studied temperate regions and *Rhipicephalus microplus* in the studied tropical regions. To address this question, we examined two tropical populations sharing the same vector, *R. microplus*, but with significantly different infection prevalence. Using two separate markers, *msp1a* (one allele per genome) and *msp2* (multiple alleles per genome), there were higher levels of multiple strain infections in the high infection prevalence as compared to the low prevalence population. The association of higher strain diversity with infection prevalence supports the hypothesis that high levels of infection prevalence and consequent population immunity is the predominant driver of strain superinfection.

Introduction

Strain superinfection occurs when a second, genetically and antigenically distinct pathogen strain infects a host already infected with and having mounted an immune response to a primary strain of the same microbial species [1]. The ability of the second strain to evade the immune response generated by a primary strain has been shown to underlie superinfection for viral, bacterial, and protozoal pathogens, thus creating a selective pressure for antigenic divergence among strains [1–6]. At the host population level, high infection rates with a primary

Funding: Elizabeth J. Castañeda Ortiz was supported by Universidad Autónoma de la Ciudad de México. This research was supported by the U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service Grant 5348-32000-033-00D (MWU, MRM, WCJ) and the National Institutes of Health R37 AI44005 (GHP). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

strain and consequent strain-specific immune responses would be expected to generate higher prevalence of superinfection as there would be few naïve hosts and new infections would require superinfection [7].

We and others have tested this model using *Anaplasma marginale*, a tick-borne rickettsial pathogen of domestic and wild ruminants. Superinfection is associated with strain-specific alleles encoding Major Surface Protein (Msp)-2, the immunodominant surface protein [4,8,9]. The second strain must encode at least one unique *msp2* allele with expression at the time of superinfection [4]. In tropical regions with high infection prevalence and consequent immunity, the rates of superinfection are significantly greater than in lower prevalence temperate regions [9,10]. That the superinfecting strains are genetically distinct has been demonstrated using both variable multi-locus analysis and detection of diverse sets of *msp2* alleles [9,10]. While these comparisons between tropical and temperate regions support the relationship between high infection prevalence and superinfection levels, there is an alternative explanation in that the transmitting vector in tropical regions, *Rhipicephalus microplus*, differs from that in the examined temperate regions, *Dermacentor andersoni* [11–13]. To determine whether the relationship between infection prevalence and strain superinfection also held in regions where transmission was mediated by the same vector, we identified two tropical regions with significantly different infection prevalence and determined the number of genotypically unique strains within infected animals using a strain-specific marker, *msp1α*, and the *msp2* repertoire [9,14,15]. Herein we report the results of these analyses and discuss the results in the context of strain superinfection.

Materials and Methods

Study sites and determination of infection prevalence

Two cattle herds within tropical regions in Mexico were selected for the study; these herds, designated La Joya and El Verdineño, were located in the states of Jalisco and Nayarit, respectively (Fig. 1). The El Verdineño herd is located in the National Research Institute for Forestry, Agriculture and Livestock (INIFAP) station at Santiago Ixcuintla, Nayarit (21°48'N, 105°12' W). The La Joya herd is located near the INIFAP station at Tapalpa, Jalisco (19°36'N, 103°36'W). *Rhipicephalus microplus* is present in both sites, consistent with its broad distribution in tropical Mexico. Blood samples were collected within the same month from approximately 80 animals per site with matching for age (8–12 months). None of the animals had been vaccinated against *A. marginale* nor treated with antibiotics to clear the infection. Infection prevalence was determined using the Msp5 competitive enzyme linked immunosorbent assay (CELISA) according to the manufacturer's guidelines (VMRD). From the subsets of seropositive animals, genomic DNA was then extracted (Qiagen) and *msp5* PCR used to confirm *A. marginale* bacteremic animals [11].

Strain identification using *msp1α* genotyping

A. marginale strains were identified by amplifying, cloning, and sequencing *msp1α*, a single copy chromosomal gene that is present in all examined strains but differs among strains in the number and sequence of nucleotide repeats [14,16,17]. To amplify the *msp1α* tandem repeat region, primers from a flanking conserved region present in all examined *A. marginale* were designed. The primer sets (forward 5'-GTG CTT ATG GCA GAC ATT TCC- 3' and reverse 5'- CTC AAC ACT CGC AAC CTT GG- 3') were used with PCR conditions of 94°C for 5 min; 30 cycles of 94°C for 30 sec, 57°C for 30 sec, 72°C for 35 sec, and a final extension of 72°C for 7 min. An internal primer *msp1α*NF (5'-CGC ATT ACA CGT TCC GTA TG-3') was used with the reverse primer from the first reaction to increase the sensitivity for detecting *msp1α* at



Fig 1. Study sites. A) Prevalence of infection as determined using serology and nested PCR and B) Geographic location of the herds in Mexico. The location of Santiago Ixcuintla, Nayarit is 21°48'N, 105°12' W and Tapalpa, Jalisco is 19° 36' N, 103° 36' W.

doi:10.1371/journal.pone.0120748.g001

low levels of bacteremia. For the semi-nested PCR, the conditions were: 94°C for 5 min, 30 cycles of 94°C for 35 sec, 65°C for 58 sec, 72°C for 30 sec and a final extension of 72°C for 10 min. Amplicons were cloned into pCR4-TOPO-TA (Invitrogen) and plasmid DNA from at least five clones of each sample was extracted with Wizard plus SV minipreps (Promega). The presence of the insert was confirmed by *EcoRI* digestion and sequenced in both directions with a Big Dye kit and an ABI 3100 Prism automated sequencer (Applied Biosystems). The sequences were analyzed using the program BIOEDIT [18] to identify genotypes.

Anaplasma marginale msp2 allelic repertoire

The *msp2* allelic repertoire was determined for a subset of samples from each site by amplifying genomic DNA using primer sets *msp2F* (5'- CTG CTT TAG GTA AGA TGA CTA AGR GTG ARG C- 3') in combination with each of five reverse primer sets as previously described [9]. The amplicons were cloned into pCR4-TOPO-TA (Invitrogen) and plasmid DNA from 96 bacterial clones of each sample was extracted with Wizard plus SV minipreps (Promega). All inserts were sequenced in both directions as described above. The sequences were edited using BioEdit software and analyzed with HyPhy 2.0 [19].

Ethics statement

The protocol for animal handling and venipuncture was approved by the Comité Interno de Desarrollo Científico of INIFAP and the Washington State University Institutional Animal Care and Use Committee (protocol 04–326). Cattle were manually restrained (<5 minutes) and blood samples were obtained by jugular venipuncture (<0.0005% blood volume; one sampling per animal). The El Verdineño herd belongs to and was sampled with approval of the

National Research Institute for Forestry, Agriculture and Livestock (INIFAP). The La Joya herd is privately owned and was sampled with approval of the owner.

Results

Infection prevalence

The infection rate in La Joya, Jalisco was 36% (30 positive/84 sampled) while that in El Verdineño, Nayarit was 100% (82/82). The difference was statistically significant (Fisher's Exact Test $p < 0.0001$).

Strain identification using *msp1α* genotyping

Blood from bacteremic (*msp5* PCR positive) animals infected with *A. marginale* was further analyzed to determine if these animals were infected with a single or multiple *A. marginale* genotypes. Based on cloning and sequencing of *msp1α* (Table 1, S1 Table, S2 Table) there was a statistically significant difference (Fisher's Exact Test, $p = 0.009$) in the proportion of superinfected animals between the high prevalence El Verdineño herd (86%; 37/43) and the lower prevalence La Joya herd (50%; 7/14). Using *msp1α* sequence as a genotypic marker for individual strains, the mean number of strains per infected animal in the high prevalence El Verdineño herd was 3.5 ± 2.1 , significantly greater ($p = 0.03$, unpaired t-test) than the 2.1 ± 1.4 strains in the lower prevalence La Joya herd. The majority of the *msp1α* repeat sequences had been previously reported in independent studies; all newly reported sequences (Table 2) were identified in at least two infected animals and the same sequence identified by independent amplification and sequencing in different laboratories by different individuals. The new *msp1α* sequences have been deposited in GenBank (accession numbers KF791969–KF792017); accession numbers for all *msp1α* repeat sequences in the El Verdineño and La Joya animals are provided in S3 Table.

Msp2 repertoire

The *msp2* repertoire within an infected host is determined by both the coding alleles (< 10 per strain) and the expressed copy (1 per bacterium but oligoclonal at a given timepoint in infection) [20,21]. Examination of experimentally superinfected animals reveals a marked and statistically significant increase in the repertoire as compared to animals infected with a single

Table 1. Number of unique *A. marginale msp1α* genotypes detected per infected animal^a.

Number of unique genotypes	Number of animals	
	El Verdineño	La Joya
1	6	7
2	11	2
3	10	2
4	5	2
5	3	1
6	4	0
7	2	0
8	0	0
9	2	0

^aBased on number and sequence of repeats

doi:10.1371/journal.pone.0120748.t001

Table 2. Newly identified *A. marginale* *msp1α* genotypes detected in infected animals from El Verdineño and La Joya.

Genotype	Access #	Sequence of encoded repeats ^a
A	M32871	DDSSSASGQQQESSVSSQSE-ASTSSQLG
EV1	KF791980	T*****S*****L***DQ*****
EV2	KF791982	T*****G*****GQ*****
EV3	KF791981	A*****G*****G*****
EV4	KF791977	T*****GD*****L*P*GQ*****VG
EV5	KF791975	A*G*****G*****GQ*****
EV6	KF791981	A*G*****L**GGQ*****
EV7	KF791982	T*****L*P*GQ*****VG
EV8	KF791990	T*****G*G*****GQ*****
EV9	KF791996	AG****G*****L*****G
EV10	KF791986	A*G***GD*****D*****
EV11	KF791978	A*****L*R*GQ*****
EV12	KF791973	T*****GD***G*G*****GQ*****S*
LJ1	KF791991	T*****L*P*GQ*****S*
LJ2	KF791993	T*****A****D*****

^aComparison to the prototype *A. marginale* Florida strain *Msp1a* tandem repeat (A) with repeats found in El Verdineño (EV) and La Joya (LJ) infected animals. A star (*) indicates an identical amino acid and a dash indicates a deletion.

doi:10.1371/journal.pone.0120748.t002

strain infected [9]. Using >3000 *msp2* sequences, ~300 to 700 sequences per individual animal, there was a statistically significant increase ($p = 0.03$, unpaired t-test) in the *msp2* repertoire in identified superinfected animals from El Verdineño as compared to single strain infected animals from La Joya. The mean number of *msp2* sequences in the selected El Verdineño cohort was 71 ± 27 as compared to 10 ± 2 in the La Joya cohort. The majority of the *msp2* sequences and the individual hypervariable microdomains have been previously reported [9]. Newly identified sequences are provided in S4 Table and have been deposited in GenBank (accession numbers KM388991–KM389141).

Discussion

The present study supports the overall hypothesis that strain superinfection increases with higher levels of infection prevalence, providing increased selective pressure at the population level for transmission of genetically distinct strains [7,9]. This conclusion is based on three observations. First, there was a significant increase ($p = 0.009$) in the proportion of the population infected with ≥ 2 *msp1α* genotypes in the high prevalence El Verdineño herd as compared to La Joya. Second, the absolute number of genotypes per infected animal was significantly greater in the high prevalence herd ($p = 0.03$). The *msp1α* genotype has been shown to be a marker for individual strain identity; whole genome sequencing of strains initially identified by *msp1α* genotype has confirmed that they differ in multiple sites across the genome [10,21,22]. Third, independent analysis of the *msp2* repertoire in cohorts of infected animals revealed a statistically significant increase ($p = 0.03$) in the number of *msp2* sequences in infected animals from the high prevalence El Verdineño herd as compared to La Joya. The size of the *msp2* repertoire, derived from 5–10 chromosomal loci per strain and a single expression site locus [8,17,21], reflects not only infection with multiple strains, but also that the strains encode unique variants of the immunodominant surface proteins required for strain superinfection [4,8,9].

The results are consistent with two previous studies examining strain superinfection between high infection prevalence herds in tropical regions with low prevalence populations in temperate regions. Using analysis of the *msp2* repertoire, Ueti *et al.* demonstrated a statistically significant ($p < 0.0001$) increase in the repertoire in infected animals in tropical regions as compared to both low prevalence temperate regions and experimental single strain infections [9]. The expansion of the repertoire was accompanied by an increase in the sequence diversity of the encoded Msp2 proteins and an increase in the number of unique combinations of hyper-variable microdomains within the surface exposed Msp2 domain, both observations consistent with immune evasion during strain superinfection [9,23,24]. Using a multi-locus analysis independent of both *msp1α* and *msp2*, Vallejo-Esquerre *et al.* identified a significant increase ($p = 0.0004$) in superinfection in a high (>90%) prevalence tropical population (Veracruz, Mexico) as compared to temperate regions in the United States [10]. The detection of 3.3 ± 1.2 strains in the Veracruz study using multi-locus typing [10] is similar to the detection of 3.5 ± 2.1 unique *msp1α* genotypes in the present study; this concordance between high prevalence herds in different regions in the tropics and using independent samples and methods supports the relationship between superinfection and prevalence.

The prior studies comparing occurrence of superinfection with infection prevalence were potentially confounded by differences in the tick vector between the studied temperate regions, where *Dermacentor andersoni* is the vector and *R. microplus* is not present, and the tropical regions, where *R. microplus* is the vector and *D. andersoni* is absent [12,13]. Conceivably, *R. microplus* could be responsible for enhanced transmission of a second strain due to higher infection rates (percentage of fed ticks that become infected) or levels within the infected ticks that provided a transmission advantage. Direct comparison of infection rates were not significantly different using *R. microplus* versus *D. andersoni* fed on animals infected with either a temperate or tropical strain [11]. However, the tropical strain, isolated in Puerto Rico, replicated in the salivary glands of *R. microplus* at the time of transmission to levels over 10^6 organisms/salivary gland as compared to the temperate strain levels in *D. andersoni* of approximately $10^{3.5}$ organisms/salivary gland [11]. The present study resolved the question as to whether the association between superinfection and prevalence was maintained under conditions where the same vector tick species was responsible for transmission. *R. microplus* is present in both the La Joya and El Verdineño study sites, consistent with prior mapping studies, and no other known tick vectors for *A. marginale* are present in these regions [12, 25]. Whether differences exist at the sub-species level, e.g., genetically distinct populations of *R. microplus*, in the capacity to transmit *A. marginale* and if these may underlie differences in infection prevalence within tropical regions is unknown. Scoles *et al.* reported that geographically separated populations of the temperate vector tick *Dermacentor andersoni* differ in susceptibility to *A. marginale* at the level of the midgut [26], however whether this affects transmission efficiency or incidence of superinfection remains unresolved.

The present findings support that infection prevalence, associated with immunity against a primary strain and then selecting for superinfection with additional genetically and antigenically distinct strains [7], is the unifying link with the occurrence of superinfection. Whether strain superinfection occurs as a linear function of primary strain infection prevalence within the host population or, alternatively, reflects threshold functions in primary strain infection prevalence and immunity is unknown. Inclusion of additional herds with differing levels of infection prevalence and examining occurrence of superinfection relative to primary infection over time are approaches that can be used to test these hypotheses and further advance understanding of strain superinfection.

Supporting Information

S1 Table. *A. marginale* *msp1α* genotypes present in singly and superinfected cattle in El Verdineño (Nayarit). The unique variable repeat sequence is designated by a letter, number, or alphanumeric combination. The sequences have been deposited in GenBank and the accession numbers are provided in [S3 Table](#). The *msp1α* genotype is designated by the number and order of the repeats, listed 5' to 3'.

(PDF)

S2 Table. *A. marginale* *msp1α* genotypes present in singly and superinfected cattle in La Joya (Jalisco). The unique variable repeat sequence is designated by a letter, number, or alphanumeric combination. The sequences have been deposited in GenBank and the accession numbers are provided in [S3 Table](#). The *msp1α* genotype is designated by the number and order of the repeats, listed 5' to 3'.

(PDF)

S3 Table. *A. marginale* *msp1α* repeat sequences in the current study. The repeat designation, strain name and location of first reported isolation, and GenBank accession number.

(PDF)

S4 Table. Unique *A. marginale* Msp2 hypervariable regions identified in the current study. The animal number, GenBank accession number, and encoded hypervariable sequences.

(PDF)

Acknowledgments

We would like to thank Nancy Kumpula-McWhirter, Beverly Hunter, David Herndon, Genea Flynn and Eduardo Carrillo for their technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GHP EJCO MWU MCN WCJ MRM JJM. Performed the experiments: EJCO MWU WCJ MRM. Analyzed the data: GHP MWU EJCO MRM MCN. Contributed reagents/materials/analysis tools: JJM MCN MWU EJCO GHP. Wrote the paper: GHP EJCO MWU. Critique of draft manuscript: EJCO MWU WCJ MRM JJM MCN.

References

1. Smith DM, Richman DD, Little SJ. HIV superinfection. *J Infect Dis*. 2005; 192:1438–444.
2. Blackard JT. HCV superinfection and reinfection. *Antivir Ther*. 2012; 17:11443–1448.
3. Rogovsky AS, Bankhead T. Bacterial heterogeneity is a requirement for host superinfection by the Lyme disease spirochete. *Infect Immun*. 2014; 82:14542–4552.
4. Futse JE, Brayton KA, Dark MJ, Knowles DP, Palmer GH. Superinfection as a driver of genomic diversification in antigenically variant pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105:12123–2127. doi: [10.1073/pnas.0802147105](#) PMID: [18723685](#)
5. Chen DS, Barry AE, Leliwa-Sytek A, Smith T- A, Peterson I, Brown SM, et al. A molecular epidemiological study of *var* gene diversity to characterize the reservoir of *Plasmodium falciparum* in humans in Africa. *PLoS One*. 2011; doi: [10.1371/journal.pone.0016629](#)
6. Hutchinson OC, Picozzi K, Jones NG, Mott H, Sharma R, Welbern SC et al. Variant surface glycoprotein gene repertoires in *Trypanosoma brucei* have diverged to become strain specific. *BMC Genomics*. 2007; doi: [10.1186/1471-2164-8-234](#)
7. Palmer GH, Brayton KA. Antigenic variation and transmission fitness as drivers of bacterial strain structure. *Cell Microbiol*. 2013; 15: 1969–1975. doi: [10.1111/cmi.12182](#) PMID: [23941262](#)

8. Rodriguez JL, Palmer GH, Knowles DP, Brayton KA. Distinctly different *msh2* pseudogene repertoires in *Anaplasma marginale* strains that are capable of superinfection. *Gene* 2005; 361: 127–132. PMID: [16202540](#)
9. Ueti MW, Tan Y, Broschat SL, Castañeda Ortiz EJ, Camacho-Nuez M, Mosqueda JJ et al. Expansion of variant diversity associated with high prevalence of pathogen strain superinfection under conditions of natural transmission. *Infect Immun*. 2012; 80: 2354–2360. doi: [10.1128/IAI.00341-12](#) PMID: [22585962](#)
10. Vallejo Esquerre E, Herndon DR, Alpírez Mendoza F, Mosqueda J, Palmer GH. *Anaplasma marginale* superinfection attributable to pathogen strains with distinct genomic backgrounds. *Infect Immun*. 2014; 82: 5286–5292. doi: [10.1128/IAI.02537-14](#) PMID: [25287920](#)
11. Futse JE, Ueti MW, Knowles DP, Palmer GH. Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: Retention of vector competence in the absence of vector-pathogen interaction. *J Clin Micro*. 2003; 41: 3829–3834. PMID: [12904396](#)
12. Estrada-Peña A, García Z, Sánchez HF. The distribution and ecological preferences of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexico. *Exp Appl Acarol*. 2006; 38: 307–316. PMID: [16612672](#)
13. James AM, Freier JE, Keirans JE, Durden LA, Mertins JW, Schlatter JL. Distribution, seasonality, and hosts of the Rocky Mountain wood tick in the United States. *J Med Entomol*. 2006; 43: 17–24. PMID: [16506443](#)
14. de la Fuente J, Ruybal P, Mtshali MS, Naranjo V, Shuqing L, Mangold AJ et al. Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. *Vet Microbiol*. 2007; 119: 382–390. PMID: [17084044](#)
15. Palmer GH, Rurangirwa FR, McElwain TF. Strain composition of the ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a mammalian reservoir for tick-transmission. *J Clin Micro*. 2001; 39: 631–635. PMID: [11158120](#)
16. Allred DR, McGuire TC, Palmer GH, Leib SR, Harkins TM, McElwain TF et al. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3220–3224. PMID: [1691504](#)
17. Brayton KA, Kappmeyer LS, Herndon DR, Dark MJ, Tibbals DL, Palmer GH et al. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 844–849. PMID: [15618402](#)
18. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Series*. 1999; 41: 95–98.
19. Kosakovsky Pond SL, Frost SDW, Muse SV. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinform Appl Note* 2005; 21: 676–679.
20. Brayton KA, Knowles DP, McGuire TC, Palmer GH. Efficient use of small genome to generate antigenic diversity in tick-borne ehrlichial pathogens. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2001; 98: 4130–4135. PMID: [11274438](#)
21. Dark MJ, Herndon D, Kappmeyer LS, Gonzales MP, Nordeen E, Palmer GH et al. Conservation in the face of diversity: multistrain analysis of an intracellular bacterium. *BMC Genomics*. 2009; 10: 16–28. doi: [10.1186/1471-2164-10-16](#) PMID: [19134224](#)
22. Noh SM, Brayton KA, Knowles DP, Agnes JT, Dark MJ, Brown WC, et al. Differential expression and sequence conservation of the *Anaplasma marginale msp2* gene superfamily outer membrane proteins. *Infect Immun*. 2006; 74: 3471–3479. PMID: [16714578](#)
23. Barbet AF, Lundgren A, Yi J, Rurangirwa FR, Palmer GH. Antigenic variation of *Anaplasma marginale* by expression of MSP2 sequence mosaics. *Infect Immun*. 2000; 68: 6133–6138. PMID: [11035716](#)
24. Futse JE, Brayton KA, Knowles DP, Palmer GH. Structural basis for segmental gene conversion in generation of *Anaplasma marginale* outer membrane protein variants. *Mol Micro*. 2005; 57: 212–221.
25. Rodríguez SD, García Ortiz MA, Jiménez Ocampo R, Vega y Murguía CA. Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in Mexico. *Infect Genet Evol*. 2009; 9: 1092–1101. doi: [10.1016/j.meegid.2009.09.007](#) PMID: [19786123](#)
26. Scoles GA, Ueti MW, Palmer GH. Variation among geographically separated populations of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) in midgut susceptibility to *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). *J Med Entomol*. 2005; 42: 153–162. PMID: [15799524](#)

Expansion of Variant Diversity Associated with a High Prevalence of Pathogen Strain Superinfection under Conditions of Natural Transmission

Massaro W. Ueti, Yunbing Tan, Shira L. Broschat, Elizabeth J. Castañeda Ortiz, Minerva Camacho-Nuez, Juan J. Mosqueda, Glen A. Scoles, Matthew Grimes, Kelly A. Brayton and Guy H. Palmer
Infect. Immun. 2012, 80(7):2354. DOI: 10.1128/IAI.00341-12.
Published Ahead of Print 14 May 2012.

Updated information and services can be found at:
<http://iai.asm.org/content/80/7/2354>

REFERENCES

These include:

This article cites 42 articles, 23 of which can be accessed free at: <http://iai.asm.org/content/80/7/2354#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), [more»](#)

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Expansion of Variant Diversity Associated with a High Prevalence of Pathogen Strain Superinfection under Conditions of Natural Transmission

Massaro W. Ueti,^a Yunbing Tan,^b Shira L. Broschat,^{b,c} Elizabeth J. Castañeda Ortiz,^d Minerva Camacho-Nuez,^d Juan J. Mosqueda,^e Glen A. Scoles,^a Matthew Grimes,^c Kelly A. Brayton,^{c,f} and Guy H. Palmer^{c,f}

Animal Diseases Research Unit, USDA-ARS, Pullman, Washington, USA^a; School of Electrical Engineering and Computer Science, Washington State University, Pullman, Washington, USA^b; Department of Veterinary Microbiology and Pathology, Washington State University, Pullman, Washington, USA^c; Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, México D.F., México^d; Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Juriquilla, México^e; and Paul G. Allen School for Global Animal Health, Washington State University, Pullman, Washington, USA^f

Superinfection occurs when a second, genetically distinct pathogen strain infects a host that has already mounted an immune response to a primary strain. For antigenically variant pathogens, the primary strain itself expresses a broad diversity of variants over time. Thus, successful superinfection would require that the secondary strain express a unique set of variants. We tested this hypothesis under conditions of natural transmission in both temperate and tropical regions where, respectively, single-strain infections and strain superinfections of the tick-borne pathogen *Anaplasma marginale* predominate. Our conclusion that strain superinfection is associated with a significant increase in variant diversity is supported by progressive analysis of variant composition: (i) animals with naturally acquired superinfection had a statistically significantly greater number of unique variant sequences than animals either experimentally infected with single strains or infected with a single strain naturally, (ii) the greater number of unique sequences reflected a statistically significant increase in primary structural diversity in the superinfected animals, and (iii) the increase in primary structural diversity reflected increased combinations of the newly identified hypervariable microdomains. The role of population immunity in establishing temporal and spatial patterns of infection and disease has been well established. The results of the present study, which examined strain structure under conditions of natural transmission and population immunity, support that high levels of endemicity also drive pathogen divergence toward greater strain diversity.

Antigenically variant pathogens establish persistent infection in their mammalian hosts by sequential generation of new variants that escape immune clearance (13, 22). Overrepresented among both sexually transmitted and vector-borne pathogens, these include agents responsible for many of the poorly controlled infectious diseases of animals and humans (13, 22, 23, 26, 40). Continual molecular variation, effected via diverse mechanisms from mutation in RNA viruses to recombination of large multi-gene families in bacteria and protozoa (13, 21), must generate sufficient structural change to evade recognition by existing immune effectors. The result is the presence within the host of a diverse oligoclonal or polyclonal population of structurally unique pathogens derived from the original infecting strain (13, 25, 26, 36).

Superinfection occurs when a second, genetically distinct pathogen strain infects a host that has already mounted an immune response to a primary strain (37). For antigenically variant pathogens, the implied hypothesis is that the superinfecting strain is sufficiently different to generate its own unique, nonoverlapping oligoclonal or polyclonal variant population. We tested this hypothesis by examining *Anaplasma marginale* variant population structure in experimental infections and in natural infections within temperate and tropical regions where, respectively, single-strain infection and strain superinfections predominate.

A. marginale is a rickettsial pathogen that establishes persistent infection in ruminant hosts, domestic and wild, as a reservoir for onward tick-borne transmission (27). Persistent bacteremia is mediated by variation of the immunodominant outer membrane

protein, major surface protein 2 (Msp2) (4, 8, 9, 14, 15). Msp2 variants are generated by a process of gene conversion in which donor alleles or oligonucleotide segments of the alleles are recombined into an expression site (4, 7–9). This mechanism is common among numerous bacterial and protozoal pathogens, including those causing relapsing fever, sleeping sickness, and syphilis (5, 11, 19, 31, 33, 42). The resulting new Msp2 variants evade recognition by the existing immune response (14). Over time, the variant population becomes increasingly complex; this diversity can be quantified at the pathogen population level within individual animals (17) and, collectively, within an animal population. This allows testing the hypothesis that maintaining superinfection in the host is linked to marked expansion of variant diversity. Acceptance of this hypothesis would support a requirement that the second strain establishes infection by the same mechanism by which a primary strain persists—generation of new variants. Rejection of this hypothesis would indicate that superinfection is permitted or

Received 31 March 2012 Returned for modification 12 April 2012

Accepted 3 May 2012

Published ahead of print 14 May 2012

Editor: R. P. Morrison

Address correspondence to Guy H. Palmer, gpalmer@vetmed.wsu.edu.

K.A.B. and G.H.P. contributed equally to this article.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/IAI.00341-12

blocked by a distinct mechanism, which was recently established to occur at the host tissue level for *Plasmodium falciparum* (32). Herein, we report testing this hypothesis and discuss the results in the context of determinants of pathogen strain structure under conditions of natural transmission.

MATERIALS AND METHODS

Quantification of Msp2 variants in single-strain infection and superinfection. *A. marginale* single-strain infections were established experimentally using the St. Maries, EMφ, and 6DE strains (29, 34). Naïve calves, verified as uninfected using the Msp5 competitive enzyme-linked immunosorbent assay (C-ELISA) serologic assay, were infected with *A. marginale* of each strain (38). For experimental superinfection, primary infection was established by intravenous inoculation with the 6DE strain followed by feeding *Dermacentor andersoni* ticks infected with the St. Maries strain (16, 35, 39). The strain typing and complete *msp2* allelic repertoire for each of these strains have been reported previously (7, 12, 29, 34). To capture both the complete donor allelic repertoire and the expressed variant population, primers were designed to amplify the *msp2* conserved regions flanking the central hypervariable region (HVR). Briefly, one universal forward primer and five unique reverse primers were designed to amplify the conserved regions of *msp2* alleles. The primer sequences are as follows: universal forward, 5'-CTG CTT TAG GTA AGA TGA CTA AGR GTG ARG-3'; reverse 1, 5'-GCT ATT AAT GTT GCC CGC CAT CCC-3'; reverse 2, 5'-GCC ATT GAT GTT RGT TGC CAT CCC-3'; reverse 3, 5'-CTC AGG YTA TTA ATG TTA TTC GCC ATYCC-3'; reverse 4, 5'-GCC ATT AAT GTT GCC CGC CAT CCC-3'; and reverse 5, 5'-CCA TTG ATG TTA TTC GCC ATT CC-3'. The reaction was conducted in a 25-μl reaction mixture containing 5 μl of extracted genomic DNA, 12.5 μl of PCR master mix (Roche), and a 1.6 μM concentration of each primer set. The PCR was carried out under the following conditions: 95°C for 2 min; 30 cycles of 95°C for 30 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 30 s; final extension at 72°C for 3 min; and holding at 4°C. Following PCR amplification, amplicons from each primer set were cloned into pCR-4 TOPO vector (Invitrogen) and used to transform *Escherichia coli*; colonies containing inserts were then selected for sequencing. A minimum of 96 clones from each primer set were sequenced by using the BigDye kit and ABI Prism automated sequencer. Sequences were compiled and initially analyzed using the VECTOR NTI software suite (Invitrogen).

Once verified to capture the complete allelic repertoire, the same approach was used for single-strain infections and superinfections occurring under conditions of natural transmission. Animals in the states of Oregon and Washington in the United States and the state of Nayarit in Mexico were initially screened serologically using Msp5 C-ELISA, and positive animals were confirmed by *msp5* PCR. These populations are referred to as “temperate” and “tropical,” respectively; the temperate region populations were located between 43°59'N and 48°71'N, while the tropical region populations were located between 20°36'N and 23°05'N. Amplification and sequencing of the *msp2* allelic repertoire were done as for the experimental infections. The total number of unique sequences was determined for each infected animal and within each of the three infected populations: control (experimental infections), temperate, and tropical (natural infections). For independent determination of strain composition, the single-copy *msp1α* gene was PCR amplified and sequenced using primers and conditions previously described in detail (29). The GenBank accession numbers are presented at the end of Materials and Methods.

Dissimilarity among the Msp2 variant population. To measure dissimilarity (or breadth of variant population) both within each animal and within each animal population, HVR sequences were aligned using the open-source software program AlignMe (Alignment of Membrane Proteins) with the Blosum62 scoring matrix (20, 24). The Blosum matrix is based on the statistics of amino acid substitutions among clustered sequences. Each variant sequence is compared pairwise with all others within the same infected animal; the diversity scores of individuals within

the three populations were determined, and the mean diversity for each population was calculated. Relative mismatch/match and negative/positive scores were used to account for differences in length as the size of the encoded HVR differs among *msp2* alleles within and among strains; gap penalties of 10 and 1 were used for opening and extension gaps, respectively.

Identification of and combinatorial diversity among hypervariable region microdomains. To identify variable microdomains within the Msp2 HVR, unique Msp2 sequences were screened for conserved residues within the HVR using an in-house visualization program. After visually validating the conserved features, the identified hypervariable microdomains within the HVR were then used in two separate analyses to examine their contribution to overall diversity. Each complete HVR sequence can be considered a combination of these microdomains. For the first analysis, the total number of possible permutations of the microdomains was determined using $i \times j \times k$, where i is the number of unique sequences in microdomain 1, j is the number of unique sequences in microdomain 2, and k is the number of unique sequences in microdomain 3. A larger number of distinct combinations indicates greater diversity. For the second analysis, the hypervariable microdomains were clustered using the serial version of the open-source software program pClust (41). The pClust program uses the Smith-Waterman algorithm to perform pairwise comparison of protein sequences and creates a graph from the results. Each graph node represents a sequence, and edges connect related sequences with an alignment score greater than a given cutoff value; clusters of similar proteins are created from the graph based on the number of edges between nodes. Based on the cluster information, all theoretical permutations of the microdomains can be determined: for example, if the numbers of clusters for the three microdomains are $c1$, $c2$, and $c3$, respectively, then the number of possible combinations is $c1 \times c2 \times c3$.

Nucleotide sequence accession numbers. The GenBank accession numbers for the sequences determined in this study are as follows: experimental single-strain infections (control), JQ933531 to JQ933589; experimental strain superinfections, JQ933590 to JQ933613; natural infections in the tropical region, JQ933614 to JQ933796; and natural infections in the temperate region, JQ933797 to JQ933847.

RESULTS

Quantification of Msp2 variants in single-strain infection and superinfection. The method for identifying the *msp2* variant repertoire was validated using experimental infections with each of three *A. marginale* strains with unique allelic repertoires. In each infection, the amplification and sequencing approach identified all of the *msp2* donor alleles (Table 1). Importantly, the full allelic repertoire could be identified during both acute and persistent bacteremia (Table 1). The mean number of unique variants for this control group of experimental, single-strain infections was 11.6 ± 3.1 . Independent amplification of *msp1α* confirmed the *A. marginale* strain identity and the presence of only the single infecting strain (Fig. 1). The full sets of alleles could also be detected in experimental superinfections using the 6DE and St. Maries strains (Table 1 and Fig. 1).

The number of unique variants was determined for naturally infected individual animals in both the temperate and tropical regions. Infected animals in the temperate region had a mean of 13.3 ± 3.6 unique variants, while those in the tropical region had a mean of 46.6 ± 7.8 variants. The number of unique variants in the tropical region was significantly greater than that in the temperate region and compared to the single-strain experimental controls ($P < 0.0001$; Student's t test with Bonferroni's correction for multiple comparisons). In contrast, there was no difference between the temperate region animals and the single-strain controls ($P = 0.38$). Genotyping based on the *msp1α* strain marker

TABLE 1 Detection of *Anaplasma marginale* strain-specific alleles

Detection of allele during infection with strain(s):						
St. Maries						
Allele ^a	Acute ^b	Persistent ^c		6DE	EMφ	6DE and St. Maries ^d
		Infection 1	Infection 2			
Ψ1	+	+	+	+	–	+
Ψ2	+	+	+	+	–	+
G11	+	+	+	+	–	+
9H1	+	+	+	–	–	+
E6/F7	+	+	+	+	–	+
Ks4	–	–	–	–	+	–
Ks8	–	–	–	–	+	–
Ks20	–	–	–	–	+	–
Ks35	–	–	–	+	–	+
Ks37	–	–	–	–	+	–
Ks42	–	–	–	+	–	+
Ks46	–	–	–	–	+	–
Ks47	–	–	–	–	+	–
Ks48	–	–	–	–	+	–

^a The chromosomal sets of alleles as defined in references 7 and 34. The St. Maries and 6DE strains share 4 alleles (34); the EMφ strain has a completely distinct set of alleles.
^b Detection of alleles during acute bacteremia.
^c Detection of alleles in each of two persistent infections at different time points.
^d Detection of alleles during superinfection with the 6DE (primary) and St. Maries (secondary) strains.

identified only a single strain in 90% of the animals within the temperate populations. In contrast, >95% of the tropical region animals contained more than one *msp1α* genotype, indicative of superinfection, with a range of 2 to 5 strains in individual animals (Fig. 1).

Dissimilarity among the Msp2 variant population. To determine whether the quantitative increase in the number of unique variants represented an increase in diversity among the variant population, all variants within an individual were compared pairwise. Using both mismatch/match (Fig. 2A) and negative/positive (Fig. 2B) metrics for comparison, naturally infected animals within the tropics revealed significantly greater dissimilarity in their variant population compared to animals infected under conditions of natural transmission in a temperate region and compared to animals infected with a single strain experimentally. There was no significant difference in dissimilarity with either metric ($P > 0.20$) between the experimental infections and the temperate region infections. The slightly greater variability in the experimental infections may reflect the inclusion of animals infected by direct intravenous inoculation rather than via feeding of infected ticks, which constitutes a bottleneck in variant diversity (28).

Identification of and combinatorial diversity among hyper-variable region microdomains. Initial examination of the 388 unique Msp2 sequences in the single-strain experimental infections and both the temperate and tropical populations revealed 10 highly conserved “tethers” within the hypervariable region. These 10 tethers consisted of 1 to 6 amino acids and were conserved in 373/388 sequences (Fig. 3). The remaining 15 sequences contained a minimum of eight of the tethers but were excluded from further microdomain analysis. Utilizing these highly conserved tethers, the overall HVR was separated into three hypervariable microdomains. The number of unique combinations of these mi-

crodomains provided a measure of dissimilarity unbiased by the conserved residues: there were 112 unique microdomain combinations among the variants in the tropical group, with 57 in the temperate group and 32 in the experimental single-strain controls. Cluster analysis, using pClust, was used to identify microdomain combinations that generated markedly distinct Msp2 variants, controlling for those microdomains that are very similar and unlikely to yield structurally unique variants. The specific connectivity between these individual microdomains—how frequently one microdomain is present with another for each variant in each individual infection—was determined for each population (Fig. 4). While the numbers of theoretical microdomain combinations were not significantly different among the three populations, the actual number of combinations (Fig. 4) was significantly higher ($P \leq 0.01$) for the tropical population than those for either the control or temperate populations.

DISCUSSION

The present study has three new findings relevant to understanding the strain structure of highly antigenically variant pathogens. The first is that strain superinfection is associated with a significant increase in variant diversity—thus, we accept the primary hypothesis of the study. This conclusion is supported by progressive analysis of variant composition: (i) animals with naturally acquired superinfection had a statistically significantly greater

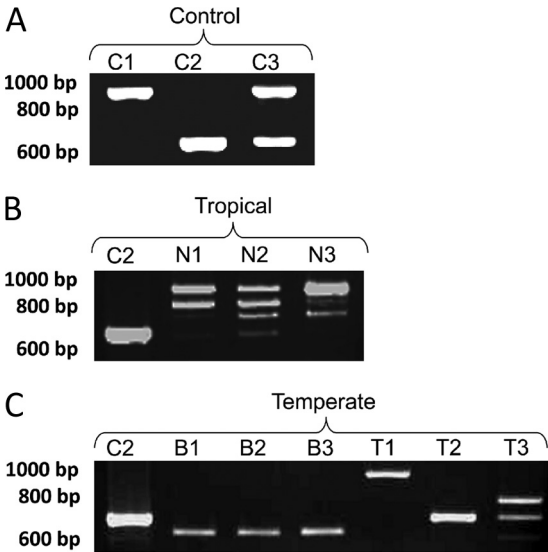


FIG 1 Detection of single strains and strain superinfection following experimental and natural *Anaplasma marginale* transmission. The *A. marginale* strain-specific genetic marker *msp1α* was amplified from blood of either experimentally infected animals or animals naturally infected within temperate or tropical regions, and the amplicon was size separated by electrophoresis for visualization. All amplicons were sequenced to verify identity. The panels show only a representative cohort of the examined animals in each population. (A) The control group experimentally infected with either the 6DE strain (C1), St. Maries strain (C2), or a superinfection with St. Maries and 6DE (C3). (B) The tropical region group infected by natural transmission. N1 to N3 represent individual superinfected animals from Nayarit, Mexico. C2 is the St. Maries strain and serves as an internal control for detection of single-strain infections. (C) The temperate region group infected by natural transmission. B1 to B3 represent individual animals from Burns, OR, and T1 to T3 represent individual animals from Tonasket, WA. C2 is the St. Maries strain and serves as an internal control for detection of single strain infections.

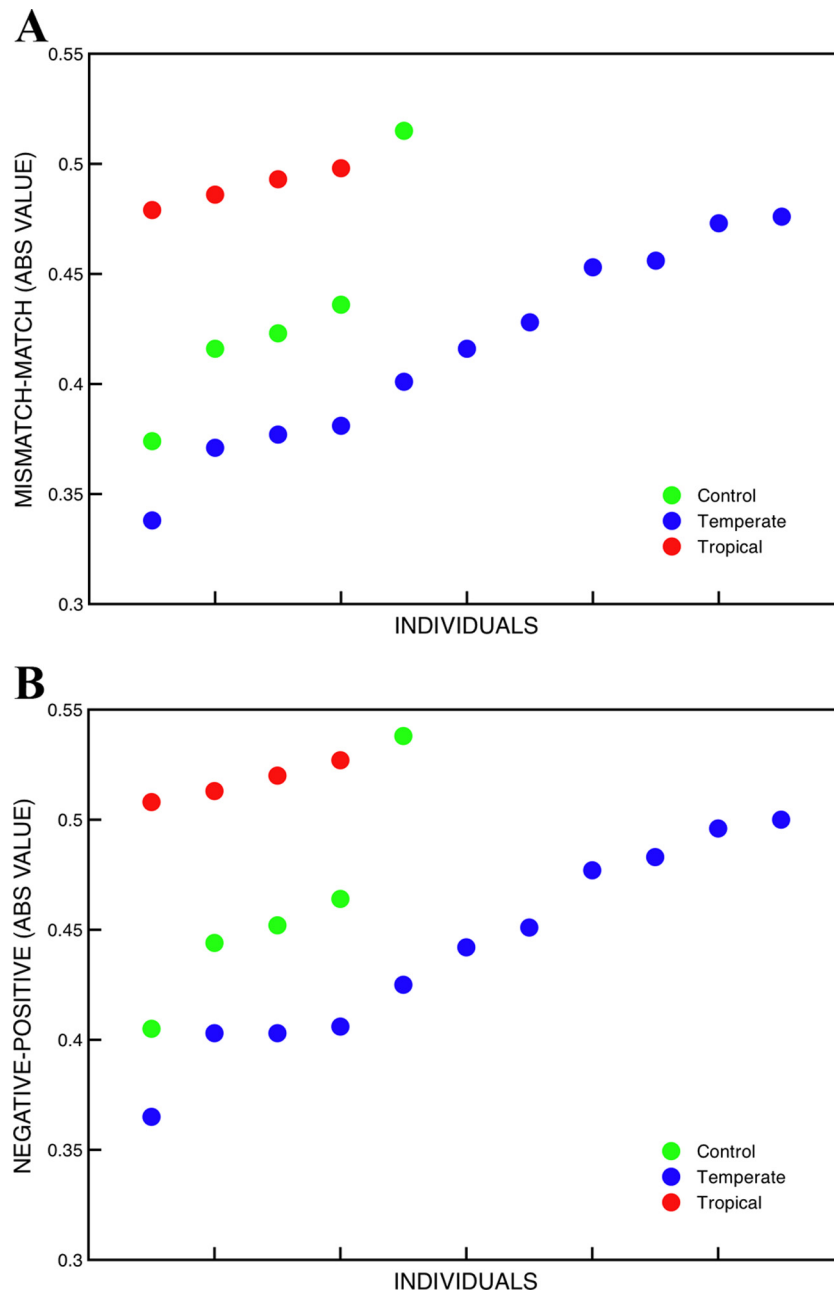
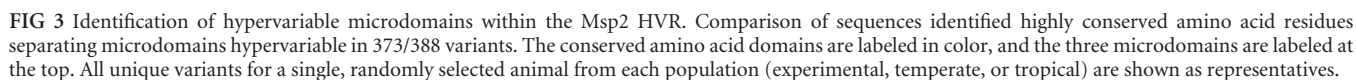


FIG 2 Msp2 diversity in experimental infections and in animals naturally infected in tropical versus temperate regions. Mean values of relative scores for individual animals within the two naturally infected populations and the experimental control animals were determined using AlignMe with the Blossum62 scoring matrix for all unique Msp2 HVR sequences in a pairwise comparison. Each dot represents data from a minimum of 480 sequencing reactions. The absolute (ABS) values of mean mismatch/match scores are on the y axis of panel A, and negative/positive scores are on the y axis of panel B; the x axis represents individuals. The higher score indicates greater diversity among variants. For both analyses, there was greater dissimilarity in the variant population of the tropical region animals than in animals infected with a single strain experimentally ($P < 0.05$) or animals under conditions of natural transmission in a temperate region ($P = 0.0001$ for match/mismatch analysis and $P = 0.00008$ for negative/positive analysis).

number of unique Msp2 sequences than animals either experimentally infected with single strains or infected with a single strain naturally, (ii) the greater number of unique sequences reflected a statistically significant increase in primary structural diversity in the superinfected animals, and (iii) the increase in primary structural diversity reflected increased combinations of the newly identified hypervariable microdomains. These findings under conditions of natural transmission are consistent with those from

previous experimental studies in which *A. marginale* strain superinfection was established when the second strain differed in its *msp2* allelic repertoire compared to the primary strain and the unique alleles were expressed by the second strain at the time of superinfection (16, 18).

The ability to detect all donor alleles and an oligoclonal repertoire of expressed variants using strains for which the complete allelic repertoire has been sequenced provides confidence that the



The second finding is the identification of a high rate of strain superinfection in animals naturally infected within the areas of high transmission. Previous studies in temperate regions indicated that strain superinfection is relatively uncommon, with detection in 0 to 10% of naturally infected animals (29, 30). In the present study, the temperate region population represented cohorts of two groups of 406 animals. The incidence of confirmed superinfection was 10%. In contrast, >95% of the cohort of the 112 tropical region animals revealed superinfection with 2 to 5 genotypically distinct strains. Importantly, this observation supports an overarching epidemiologic theory for the occurrence of strain superinfection (26). The allelic divergence among strains has been theorized to be driven by the requirement for superin-

The third new finding is the identification of Msp2 hypervariable microdomains. Based on analysis of ~ 400 unique variants derived from both temperate and tropical region strains, there are three distinct variable microdomains separated by short but highly conserved elements. The overall Msp2 primary structure is hydrophobic N- and C-terminal regions flanking the central hydrophilic surface domain (8, 17). The N- and C-terminal regions, which form β barrels, are highly conserved among all variants, and

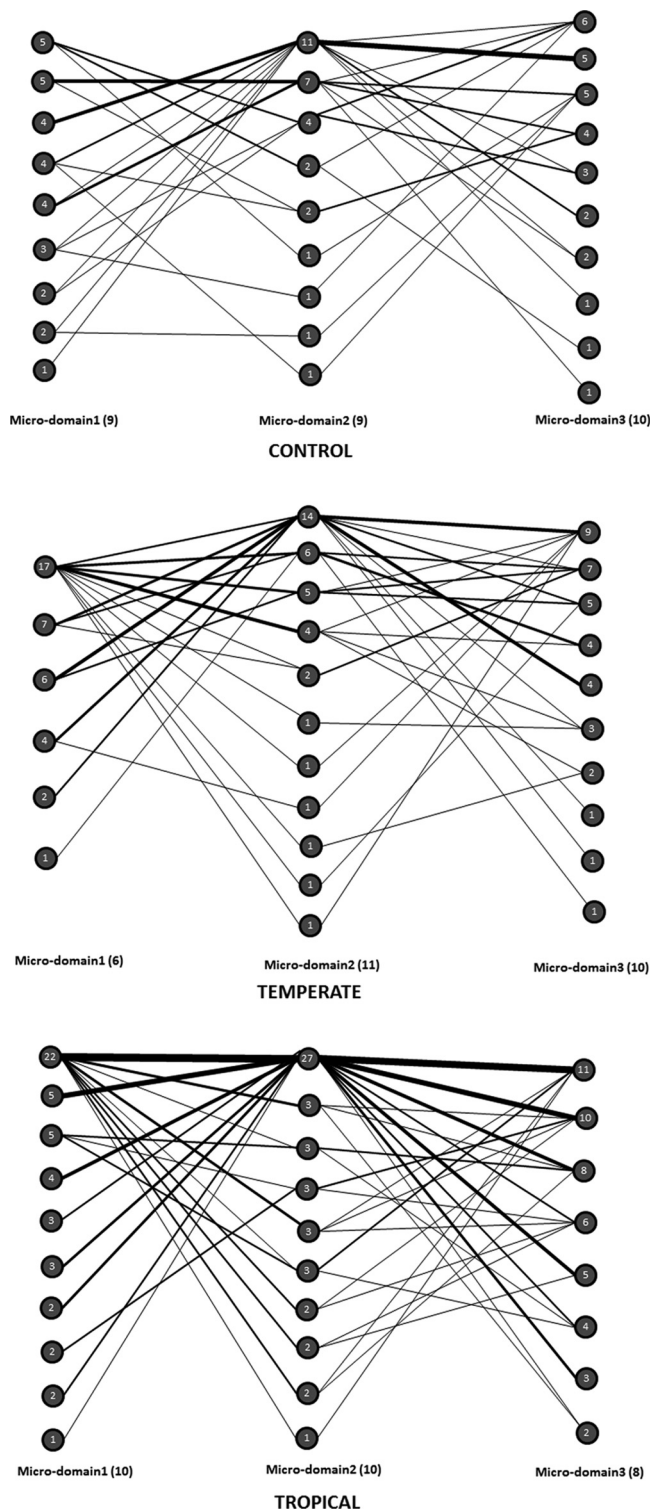


FIG 4 Connectivity between individual hypervariable microdomains among Msp2 variants. The frequency with which one microdomain is present with another for each variant in each cluster was determined for each population. The number of variants within each cluster is indicated within the circle. Line thickness represents the actual connections between microdomains; the connectivities between microdomains 1 and 2 and microdomains 2 and 3 were independent. The observed number of independent combinations was significantly higher ($P \leq 0.01$) for the tropical population than those for either the control or temperate populations.

the encoding 5' and 3' domains provide the "anchor" points for gene conversion (8, 17). Although conserved, these N- and C-terminal regions are poorly immunogenic and only very weakly bound by antibody from either natural infection or in immunized and protected animals (1, 3, 43). In contrast, the hydrophilic central region is surface exposed and highly immunogenic but also highly variable among donor alleles within a strain and alleles across strains (1, 3, 16, 34, 43). The identification of the hypervariable microdomains separated by conserved oligopeptides provides a foundation for understanding how the process of segmental gene conversion, which essentially assembles the various microdomains in the central region (4, 9, 17), generates a unique variant but allows retention of sufficient structural integrity to maintain Msp2 membrane location and function. This process and structure are analogous to those employed by both *Borrelia burgdorferi* VlsE and *Treponema pallidum* TprK: VlsE variants are generated from combinations of six variable microdomains, while TprK variants are generated from seven (26). All three pathogens utilize segmental gene conversion, thus linking the mechanism to the variable microdomain structure.

The role of population immunity in establishing temporal and spatial patterns of infection and disease has been well established (2). The results of the present study, which examined strain structure under conditions of natural transmission and population immunity, support that high levels of endemicity also drive pathogen divergence toward greater strain diversity. We propose that this model for divergence will be broadly applicable to antigenically variable pathogens, especially those such as African trypanosomes that have the genomic capacity to generate allelic diversity (5, 6). Understanding the selective forces under conditions of natural transmission and among populations with different levels of immunity underlies our ability to better predict and respond to shifts in disease patterns.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by National Institutes of Health grant AI44005, Wellcome Trust GR075800M, U.S. Department of Agriculture grants ARS 5348-32000-033-00D and CSREES 35604-15440, and BARD grant US-4187-09C.

We appreciate the excellent technical support of James Allison, Sara Davis, Ralph Horn, Nancy Kumpula-McWhirter, and Kathy Mason.

REFERENCES

- Abbott JR, Palmer GH, Howard CJ, Hope JC, Brown WC. 2004. *Anaplasma marginale* major surface protein 2 CD4⁺ T-cell epitopes are evenly distributed in conserved and hypervariable regions (HVR), whereas linear B-cell epitopes are predominantly located in the HVR. *Infect. Immun.* 72:7360–7366.
- Adams B, Sasaki A. 2009. Antigenic distance and cross-immunity, invasibility and coexistence of pathogen strains in an epidemiological model with discrete antigenic space. *Theor. Popul. Biol.* 76:157–167.
- Agnes JA, et al. 2011. Identification of *Anaplasma marginale* outer membrane protein antigens conserved between *A. marginale sensu stricto* strains and the live *Anaplasma marginale* subsp. *centrale* vaccine. *Infect. Immun.* 79:1311–1318.
- 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.
- Barry JD, Marcello L, Morrison LJ, Read AF, Lythgoe K. 2005. What the genome sequence is revealing about trypanosome antigenic variation. *Biochem. Soc. Trans.* 33:986–989.
- Berriman M, et al. 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309:416–422.
- Brayton KA, et al. 2005. Complete genome sequencing of *Anaplasma*

- marginalis* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102:844–849.
8. Brayton KA, Knowles DP, McGuire TC, Palmer GH. 2001. Efficient use of small genome to generate antigenic diversity in tick-borne ehrlichial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:4130–4135.
 9. 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.
 10. Centurion-Lara A, et al. 2004. Gene conversion: a mechanism for generation of heterogeneity in the *tpk* gene of *Treponema pallidum* during infection. Mol. Microbiol. 52:1579–1596.
 11. Dai Q, et al. 2006. Antigenic variation by *Borrelia hermsii* occurs through recombination between extragenic repetitive elements on linear plasmids. Mol. Microbiol. 60:1329–1343.
 12. Dark MJ, et al. 2009. Conservation in the face of diversity: multistrain analysis of an intracellular bacterium. BMC Genomics 10:16–28.
 13. Deitsch KW, Lukehart SA, Stringer JR. 2009. Common strategies for antigenic variation by bacterial, fungal and protozoan pathogens. Nat. Rev. Microbiol. 7:493–503.
 14. French DM, Brown WC, Palmer GH. 1999. Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsiaemia. Infect. Immun. 67:5834–5840.
 15. French DM, McElwain TF, McGuire TC, Brown WC, Palmer GH. 1998. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsiaemia. Infect. Immun. 66:1200–1207. (Erratum, 66:2400.)
 16. Futse JE, Brayton KA, Dark MJ, Knowles DP, Palmer GH. 2008. Superinfection as a driver of genomic diversification in antigenically variant pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105:2123–2127.
 17. Futse JE, Brayton KA, Knowles DP, Palmer GH. 2005. Structural basis for segmental gene conversion in generation of *Anaplasma marginale* outer membrane protein variants. Mol. Microbiol. 57:212–221.
 18. Galletti MF, Ueti MW, Knowles DP, Brayton KA, Palmer GH. 2009. Independence of *Anaplasma marginale* strains with high and low transmission efficiencies in the tick vector following simultaneous acquisition by feeding on a superinfected mammalian reservoir host. Infect. Immun. 77:1459–1464.
 19. Giacani L, et al. 2010. Antigenic variation in *Treponema pallidum*: TprK sequence diversity accumulates in response to immune pressure during experimental syphilis. J. Immunol. 184:3822–3829.
 20. Henikoff S, Henikoff JG. 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89:10915–10919.
 21. Holland J, et al. 1982. Rapid evolution of RNA genomes. Science 215:1577–1585.
 22. Johnson WE, Desrosiers RC. 2002. Viral persistence: HIV's strategies of immune system evasion. Annu. Rev. Med. 53:499–518.
 23. Kato N. 2000. Genome of hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequence diversity, and variation. Microb. Comp. Genomics 5:129–151.
 24. Khafizov K, Staritzbichler R, Stamm M, Forrest LR. 2010. A study of the evolution of inverted-topology repeats from LeuT-fold transporters using AlignMe. Biochemistry 49:10702–10713.
 25. Llaure AS, Andino R. 2010. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. PLoS Pathog. 6:e1001005. doi:10.1371/journal.ppat.1001005.
 26. Palmer GH, Bankhead T, Lukehart SA. 2009. Nothing is permanent but change: antigenic variation in persistent bacterial pathogens. Cell. Microbiol. 11:1697–1705.
 27. Palmer GH, Brown WC, Rurangirwa FR. 2000. Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. Microbes Infect. 2:167–176.
 28. Palmer GH, et al. 2007. Selection for simple MSP2 variants during *Anaplasma marginale* transmission to immunologically naïve animals. Infect. Immun. 75:1502–1506.
 29. Palmer GH, et al. 2004. Stochastic transmission of multiple genotypically distinct *Anaplasma marginale* strains within an endemic herd. J. Clin. Microbiol. 42:5381–5384.
 30. 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.
 31. Pays E, et al. 1983. Gene conversion as a mechanism for antigenic variation in trypanosomes. Cell 34:371–381.
 32. Portugal S, et al. 2011. Host-mediated regulation of superinfection in malaria. Nat. Med. 17:732–737.
 33. Rich SM, Sawyer SA, Barbour AG. 2001. Antigen polymorphism in *Borrelia hermsii*, a clonal pathogenic bacterium. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:15038–15043.
 34. Rodriguez JL, Palmer GH, Knowles DP, Brayton KA. 2005. Distinctly different *msp2* pseudogene repertoires in *Anaplasma marginale* strains that are capable of superinfection. Gene 361:127–132.
 35. Scoles GA, Ueti MW, Palmer GH. 2005. Variation among geographically separated populations of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) in midgut susceptibility to *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). J. Med. Entomol. 42:153–162.
 36. Simmonds P. 2004. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus—15 years on. J. Gen. Virol. 85:3173–3180.
 37. Smith DM, Richman DD, Little SJ. 2005. HIV superinfection. J. Infect. Dis. 192:438–444.
 38. Torioni de Echaide S, et al. 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.
 39. Ueti MW, et al. 2007. Identification of midgut and salivary glands as specific and distinct barriers to efficient tick-borne transmission of *Anaplasma marginale*. Infect. Immun. 75:2959–2964.
 40. Wei X, et al. 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. Nature 422:307–312.
 41. Wu C, Kalyanaraman A. 2008. An efficient parallel approach for identifying protein families in large-scale metagenomic data sets, p 1–10. Proceedings of the IEEE/ACM Supercomputing Conference, Austin, TX.
 42. Zhang JR, Norris SJ. 1998. Genetic variation of the *Borrelia burgdorferi* gene *vlsE* involves cassette-specific, segmental gene conversion. Infect. Immun. 66:3698–3704.
 43. Zhuang Y, Futse 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 persistent infection. Infect. Immun. 75:5185–5190.

ANEXO III

Soluciones necesarias para el ensayo de ELISA:

Buffer de recubrimiento

Na_2CO_3 0.745g

NaHCO_3 1.495g

Disolver en 800 ml de agua destilada y ajustar el pH a 9.6. Completar el volumen a 1000ml.

PBS (Buffer de fosfatos)

NaCl 8.0g

KCl 0.2g

Na_2HPO_4 1.15g

KH_2PO_4 0.2g

Disolver en 800 ml de agua destilada y ajustar el pH a 7.6. Llevar a volumen final de 1000 ml, esterilizar por autoclave.

PBS – Tween 20

PBS con 0.05% v/v de Tween 20.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 21 de Abril del 2015, en la Ciudad de México D.F. para obtener el grado de Doctora en Ciencias Genómicas, a la M. en C. Elizabeth Jacqueline Castañeda Ortiz.

Dra. Minerva Camacho Nuez

Dr. Guy H. Palmer

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Dra. Claudia Selene Zárate Guerra

Dr. Mario César López Camarillo

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez
