



**Universidad del Papaloapan**

---

---

**Campus Tuxtepec**

**Diagnóstico molecular de Anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) en bovinos de la Cuenca del Papaloapan mediante PCR**

**TESIS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**Ingeniera en Biotecnología**

PRESENTA:

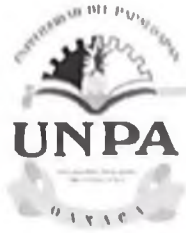
**FABIOLA SALDAÑA ASCENCIÓN**

**Director:** Dr. José Abad Zavaleta

**San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, 2024.**

---

---



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN  
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

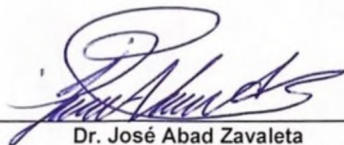
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS


En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 19 de marzo de 2024 a las 16:00 h, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "Diagnóstico molecular de Anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) en bovinos de la Cuenca del Papaloapan mediante PCR" presentada por la alumna Fabiola Saldaña Ascención, con número de matrícula 17090039, aspirante al título de Licenciatura.

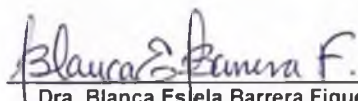
Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que el aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

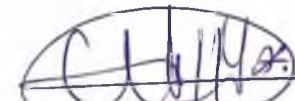
Tuxtepec, Oaxaca, a 19 de marzo de 2024.

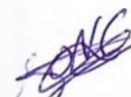
ATENTAMENTE  
LA COMISIÓN REVISORA

  
Dr. José Abad Zavaleta  
Profesor Investigador Titular "B"  
Universidad del Papaloapan  
Director de Tesis

  
Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo  
Profesor Investigador Titular "B"  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa  
Profesor Investigador Titular "A"  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
Dr. Wilber Hernández Montiel  
Profesor Investigador Asociado "B"  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
Dr. Oscar Núñez Gaona  
Profesor Investigador Titular "A"  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN  
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Tuxtepec, Oaxaca, a 04 de abril de 2024  
Oficio No. JCIB/001/01/2024

**Lic. Yesenia Barrientos Arenal**  
Jefa de Servicios Escolares  
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna **Fabiola Saldaña Ascención**, con número de matrícula 17090039, con título definitivo "**Diagnóstico molecular de Anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) en bovinos de la Cuenca del Papaloapan mediante PCR**" para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

Dr. Víctor Manuel Meza Villalvazo (Presidente, Universidad del Papaloapan)  
Dr. Wilber Hernández Montiel (Secretario, Universidad del Papaloapan)  
Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa (Vocal, Universidad del Papaloapan)  
Dr. Oscar Núñez Gaona (Primer Suplente, Universidad del Papaloapan)  
Dr. Miguel Ángel Peña Rico (Segundo Suplente, Universidad del Papaloapan)

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente

*Terra uberrima, mens aperta  
Bou Lo-tama, chi ji jú*



*Jacqueline Capataz Tafur*  
Dra. Jacqueline Capataz Tafur  
Jefa de Carrera de Ingeniería en  
Biotecnología  
Universidad del Papaloapan



*J. López Arjona*  
Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjona  
Vice Rector Académico  
Universidad del Papaloapan

c.c.p. Dr. José Abad Zavaleta. Director de tesis. Para su conocimiento  
c.c.p. Fabiola Saldaña Ascención. Alumna. Para su conocimiento  
c.c.p. Archivo

Campus Loma Bonita  
Av. Ferrocarril S/N. Col. Ciudad Universitaria, Loma  
Bonita, Oaxaca C.P. 68400  
Tel/Fax: 01 281 872 92 30

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

Campus Tuxtepec  
Circuito Central N° 200, Col. Parque Industrial,  
Tuxtepec, Oaxaca. C.P. 68301  
Tel/Fax: 01 287 875 9240

## HOJA DE ORIGINALIDAD

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por poner todos los medios necesarios para llegar hasta aquí y ser el guía en mi camino. Quiero recordar lo bueno que has sido siempre para mí.

A mis padres por hacer posible este y todos mis sueños, por hacer de mí lo que soy hoy y no dejar de creer que puedo lograr todo lo que me proponga.

A mi hermana Vane, por acompañarme y animarme en los momentos más difíciles. Deseo siempre compartir nuestras vidas y verte lograr todos tus sueños.

A mis tíos Isabel, Carmen, Marcelo y Manuel, por procurarme y apoyarme, este logro también ha sido posible gracias a ustedes.

A mis tíos Félix y Estela, que aún a la distancia han visto por mi hermana y por mí, siempre creyendo en nosotras.

A toda mi familia, por darme palabras de ánimo, por sentirse orgullosos de mis logros y brindarme su cariño a lo largo de toda mi vida.

A mi director de tesis el Dr. José Abad Zavaleta, por aceptarme desde aquel verano de investigación brindándome la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por recibirme como su tesista. Gracias por darme su apoyo y confianza durante este trayecto.

A mis profesores Fernando Amaya e Iván Tovar, por creer en mi capacidad y enseñarme que existe un mundo lleno de cosas por descubrir y aprender.

A los profesores de la Universidad del Papaloapan que durante sus clases me dieron las bases para continuar mi aprendizaje.

A mi amiga Ana Belén, por acompañarme en todo momento, por nunca dejar de creer en mí, alegrarse de mis logros y llorar conmigo cuando es necesario, hay amigos que son como hermanos, es lo que eres para mí.

A los amigos que conocí en la Universidad Iván, Dani, Mitzi, Bety, Nancy y Lau, gracias por su valiosa amistad y compañía durante la carrera.

A mis amigos Hafid, Carmen y Max, por brindarme su amistad y hacer que el tiempo en el laboratorio fuera mejor.



## DEDICATORIA

A mis padres Israel y Catalina,  
por ser y estar. ❤️

## ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>XII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XIII</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>14</b>
<b>1. ANTECEDENTES.....</b>	<b>16</b>
1.1    Producción de bovinos en el trópico mexicano .....	16
1.2    Enfermedades prevalentes en bovinos de zonas tropicales .....	17
1.2.1 <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	17
1.3    Tristeza parasitaria bovina .....	19
1.4    Babesiosis .....	19
1.5    Anaplasmosis .....	20
1.5.1    Signos clínicos.....	21
1.5.2    Mecanismo de transmisión .....	22
1.5.3    Tratamientos .....	23
1.5.4    Normatividad.....	24
1.6 <i>Anaplasma marginale</i> .....	24
1.6.1    Características del genoma de <i>A. marginale</i> .....	25
1.6.2    Proteínas de superficie de membrana externa .....	26
1.6.3    Diagnóstico .....	27
1.6.4    Técnica de PCR.....	28
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>30</b>
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>31</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
4.1    Objetivo general .....	31
4.2    Objetivos específicos .....	31
<b>5. DIAGRAMA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>32</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
6.1    Ubicación de hatos ganaderos .....	33
6.2    Toma de muestras .....	33
6.3    Almacenamiento y procesamiento de muestras .....	35
6.4    Extracción de ADN bacteriano.....	35

6.5	Verificación y cuantificación del ADN extraído .....	36
6.6	Análisis y búsqueda bioinformática para el diseño de oligonucleótidos y secuencia control36	
6.6.1	Diseño de oligonucleótidos .....	36
6.6.2	Diseño de secuencia control.....	37
6.7	Clonación en <i>E. coli</i> .....	39
6.8	Amplificación de muestras .....	41
6.8.1	PCR del gen 16S rRNA con oligonucleótidos universales .....	42
6.9	Secuenciación .....	43
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>44</b>
7.1	Integridad y pureza del ADN bacteriano extraído.....	44
7.2	PCR <i>in silico</i> .....	45
7.3	Diseño del control sintético.....	47
7.4	Clonación en <i>E. coli</i> .....	48
7.5	Amplificación de muestras .....	50
7.6	Secuenciación .....	52
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>9.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>56</b>
<b>10.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXOS .....</b>		<b>64</b>
	Anexo 1. Preparación de soluciones .....	64
	Anexo 3. Protocolo de extracción de productos de PCR con el Kit de extracción QIAquick® ...	70
	Anexo 4. Vector de clonación pGEM-T easy.....	71
	Anexo 5. Medio de cultivo LB Sólido (100 mL).....	72
	Anexo 6. Método de extracción por lisis alcalina.....	73
	Anexo 7. Cuantificación de ADN bacteriano extraído de los bovinos muestreados.....	74
	Anexo 8. BLAST de las secuencias obtenidas. ....	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Morfología de <i>R. microplus</i> ..	18
<b>Figura 2.</b> Distribución mundial de anaplasmosis.....	20
<b>Figura 3.</b> Distribución de casos de anaplasmosis en México. ....	21
<b>Figura 4.</b> Frotis de sangre bovina. ....	27
<b>Figura 5.</b> Ubicación de hatos muestreados.....	33
<b>Figura 6.</b> Toma de muestra sanguínea de la vena auricular. ....	34
<b>Figura 7.</b> Esquema de fusión de los fragmentos Cam 1 y Cam 2. ....	39
<b>Figura 8.</b> Esquema del protocolo de reacción de PCR de colonia.....	40
<b>Figura 9.</b> Esquema del protocolo de reacción de PCR. ....	42
<b>Figura 10.</b> ADN bacteriano. ....	44
<b>Figura 11.</b> PCR in silico. Realizada para los nueve genomas del género <i>Anaplasma</i> .....	45
<b>Figura 12.</b> Secuencia del gen <i>msp1<math>\alpha</math></i> .....	46
<b>Figura 13.</b> Producto de amplificación de la fusión de los fragmentos Cam 1 – Cam 2.....	47
<b>Figura 14.</b> Productos de amplificación de PCR de colonia de la clonación.....	48
<b>Figura 15.</b> Alineamiento de la secuencia de la clona 2a con la región M13.....	49
<b>Figura 16.</b> Alineamiento de la secuencia de la clona 4b con la región M13.....	50
<b>Figura 17.</b> Productos de la amplificación del fragmento de 83 pb del gen <i>msp1<math>\alpha</math></i> . ....	51
<b>Figura 18.</b> Productos de la amplificación del fragmento de 83 pb del gen <i>msp1<math>\alpha</math></i> . ....	52
<b>Figura 19.</b> Alineamiento de la secuencia del gen <i>msp1a</i> con las secuencias obtenidas de la secuenciación. ....	53
<b>Figura 20.</b> Esquema del vector pGEM-T easy.....	71

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Estados con producción bovina bajo el sistema de Doble Propósito (DP).....	16
<b>Tabla 2.</b> Taxonomía de <i>A. marginale</i> .....	25
<b>Tabla 3</b> Características del genoma de <i>A. marginale</i> .....	25
<b>Tabla 4.</b> Métodos de detección de anaplasmosis .....	28
<b>Tabla 5.</b> Bovinos muestreados por comunidad.....	34
<b>Tabla 6.</b> Oligonucleótidos diseñados para amplificar un fragmento de 83 pb del gen <i>msp1<math>\alpha</math></i> ....	37
<b>Tabla 7.</b> Oligonucleótidos diseñados para amplificar un fragmento de 207 pb del gen <i>msp1<math>\alpha</math></i> ..	37
<b>Tabla 8.</b> Oligonucleótidos diseñados para generar el control positivo mediante PCR de fusión .	38
<b>Tabla 9.</b> Programa de fusión para los fragmentos Cam 1 y Cam 2 .....	38
<b>Tabla 10.</b> Oligonucleótidos utilizados en la PCR de colonia.....	40
<b>Tabla 11.</b> Componentes de la reacción de PCR.....	41
<b>Tabla 12.</b> Componentes de reacción de PCR .....	43
<b>Tabla 13.</b> Resumen de la pureza de las muestras de ADN.....	44
<b>Tabla 14.</b> Mediciones obtenidas en Nanodrop .....	47
<b>Tabla 15.</b> Mediciones obtenidas en Nanodrop de la extracción del plásmido .....	49
<b>Tabla 16.</b> Resumen del alineamiento de los resultados obtenidos .....	53

## TABLA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
<i>A. marginale</i>	<i>Anaplasma marginale</i>
<i>B. bigemina</i>	<i>Babesia bigemina</i>
<i>B. bovis</i>	<i>Babesia bovis</i>
<i>B. indicus</i>	<i>Bos indicus</i>
<i>B. taurus</i>	<i>Bos taurus</i>
ELISA	Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas
CABI	Centro de Biociencia Agrícola Internacional
CFSPH	Centro de Seguridad y Salud Pública
DP	Doble propósito
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
μl	Microlitro
μM	Micromolar
mL	Mililitro
mm	Milímetro
msp	Proteína principal de superficie (gen)
MSP	Proteína principal de superficie (proteína)
nt	nucleótidos
nPCR	Reacción en cadena de la polimerasa anidada
OIE	Organización Mundial de la Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pb	Pares de bases
pM	Picomolar
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
TPB	Tristeza parasitaria bovina

## RESUMEN

En México, la industria ganadera es una de las principales actividades económicas y es afectada por distintos factores, entre ellos, enfermedades causadas por patógenos, resultando en pérdidas económicas de hasta el 25 %. Los patógenos son transmitidos por distintos vectores, siendo uno de los más importantes la garrapata (*R. microplus*), capaz de transmitir microorganismos como *Babesia spp.* y *Anaplasma spp.* que parasitan los glóbulos rojos de los bovinos y otras especies de animales de interés zootécnico. La anaplasmosis, es causada por distintas especies de *Anaplasma spp.*, y se caracteriza por provocar anemia, fiebre, depresión, ictericia, debilidad, ataxia, y cuando se presenta la enfermedad causada por *A. marginale*, puede causar abortos y muerte súbita. El tratamiento de esta enfermedad se realiza con antibióticos, que son utilizados de manera descontrolada ya que por lo regular no se cuenta con un diagnóstico adecuado, pues los métodos de detección, como los frotis sanguíneos, presentan falsos negativos debido a que el resultado depende en gran medida de la carga bacteriana en sangre. Los métodos serológicos como ELISA y moleculares con PCR basados en el gen *msp5*, presentan falsos positivos, ya que tiene una reacción cruzada con otras especies de *Anaplasma spp.* Debido a lo anterior, en el presente trabajo, se generó un método de diagnóstico molecular con PCR, rápido y preciso para la detección de anaplasmosis causada específicamente por *A. marginale*, basado en el gen *msp1 $\alpha$* . El método de diagnóstico molecular se utilizó para detectar *A. marginale* en los bovinos susceptibles en la Cuenca del Papaloapan, para esto, se tomaron muestras sanguíneas de las venas auriculares y coccígeas, se extrajo el ADN y se realizó la amplificación de las muestras con dos pares distintos de oligonucleótidos (*Fam - Ram* y *msp1 $\alpha$ F - msp1 $\alpha$ R*). Se diseñó un control sintético mediante una PCR de fusión, de la cual se obtuvo el fragmento Cam T con el fin de evitar variaciones en el control positivo. Por medio de la secuenciación, se confirmaron casos positivos para la enfermedad con un porcentaje de identidad mayor al 99.3 % obtenido de un alineamiento con las secuencias reportadas en la base de datos del NCBI. Asimismo, se encontró la presencia de *A. marginale* en equinos, lo cual abre la posibilidad de extender el estudio a otras especies de interés zootécnico, así como el interés por identificar las cepas presentes en la región.

## ABSTRACT

In Mexico, the livestock industry is one of the main economic activities and is affected by various factors, including diseases caused by pathogens, resulting in economic losses of up to 25%. Pathogens are transmitted by various vectors, with one of the most important being the tick (*R. microplus*), capable of transmitting microorganisms such as *Babesia spp.* and *Anaplasma spp.* that parasitize the red blood cells of cattle and other species of zootechnical interest. Anaplasmosis is caused by distinct species of *Anaplasma spp.*, and is characterized by causing anemia, fever, depression, jaundice, weakness, ataxia, etc., and when the disease caused by *A. marginale* occurs, it can cause abortions and sudden death. The treatment of this disease is conducted with antibiotics, which are used in an uncontrolled manner since there is usually no adequate diagnosis, as detection methods, such as blood smears, often yield false negatives because the result depends largely on the bacterial load in the blood. Serological methods such as ELISA and molecular methods with PCR based on the *msp5* gene present false positives, as they cross-react with other species of *Anaplasma spp.* Due to the above, in the present work, a rapid and accurate molecular diagnostic method with PCR was developed for the detection of anaplasmosis caused specifically by *A. marginale*, based on the *msp1 $\alpha$*  gene. The molecular diagnostic method was used to detect *A. marginale* in susceptible cattle in the Papaloapan Basin. For this, blood samples were taken from the auricular and coccygeal veins, DNA was extracted, and the samples were amplified with two different pairs of oligonucleotides (*Fam - Ram* and *msp1 $\alpha$ F - msp1 $\alpha$ R*). A synthetic control was designed through a fusion PCR, from which the Cam T fragment was obtained to avoid variations in the positive control. Through sequencing, positive cases for the disease were confirmed with an identity percentage greater than 99.3% obtained from an alignment with sequences reported in the NCBI database. Likewise, the presence of *A. marginale* was found in horses, which opens the possibility of extending the study to other species of zootechnical interest, as well as the interest in identifying the strains present in the region.

## INTRODUCCIÓN

En México, la actividad ganadera constituye como una de las principales actividades económicas donde mensualmente se producen cerca de 12.5 millones de pesos en carne y 8.5 millones pesos en de leche (SIAP, 2022a, 2022b), las zonas tropicales y subtropicales son donde más se practica esta actividad con un 50 % de la producción, siendo el ganado bovino explotado bajo el sistema de doble propósito el de mayor relevancia para la producción ganadera mexicana (Rangel *et al.*, 2017). Sin embargo, se ve afectada por enfermedades causadas por virus, bacterias y hongos, donde se estima que el 80 % de estos son transmitidos por diversos ectoparásitos, siendo la garrapata *Rhipicephalus microplus* el principal vector debido a su amplia distribución (Benavides *et al.*, 2016). Además, es considerada como el segundo vector transmisor de enfermedades después del mosquito *Aedes aegypti* (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2018). Entre los patógenos que transmite *Rhipicephalus microplus* se encuentra la rickettsia *Anaplasma marginale* que provoca anaplasmosis (Galliazi y Peirano, 2020).

Esta enfermedad se distribuye a nivel mundial y representa una de las principales causas de pérdidas económicas en zonas ganaderas tropicales y subtropicales (Almazán, 2018). Entre sus principales síntomas se encuentran anemia, fiebre, depresión, ictericia, debilidad, ataxia, hemoglobinuria, temblores, abortos y muerte súbita (De León y Rubio, 2021).

Los antibióticos más comunes para tratar la anaplasmosis son las tetraciclinas, sin embargo, debido a su mal manejo se han desarrollado cepas de *A. marginale* resistentes haciendo que el ciclo de la enfermedad continúe sin interrupciones a pesar de la aplicación de medicamentos (Fernández, 2018). En los últimos años, se ha buscado desarrollar vacunas con rickettsias vivas y muertas a partir de la sangre de bovinos infectados (Almazán *et al.*, 2018), también vacunas tipo implante que se realizan con proteínas de *A. marginale*. Cabe destacar que no están aprobadas para su comercialización y su uso solo sirve para aminorar los síntomas, pero no evita la enfermedad (Curtis *et al.*, 2020).

Comúnmente, el diagnóstico de anaplasmosis se realiza por frotis sanguíneos, pruebas serológicas y en menor medida, diagnóstico molecular; los frotis sanguíneos con tinción de Giemsa, únicamente evidencian la presencia de hemoparásitos en sangre, no se puede definir de que microorganismo se trata y se necesita tener un alto nivel de parasitemia; la prueba serológica

más utilizada es el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas competitivo (c-ELISA), es un inmunoanálisis de competición en el que interviene un anticuerpo con la capacidad de unirse a la proteína de superficie MSP5 de *A. marginale* sin embargo, la prueba puede ser inespecífica y resulta en falsos positivos debido a una reacción cruzada ya que ésta proteína se encuentra en diversas especies de *Anaplasma spp.* (Fernández, 2018; Silva *et al.*, 2021).

El desarrollo de técnicas moleculares que permitan el diagnóstico rápido y preciso para la detección de *A. marginale* es necesario para el sector agropecuario regional, debido a que los métodos existentes no son fiables para diagnosticar esta enfermedad que impacta negativamente a la bovinocultura.

Debido a lo anterior, se generó un método de diagnóstico molecular rápido y preciso para la detección de anaplasmosis causada específicamente por *A. marginale*, basado en el gen *msp1 $\alpha$* , que ha sido utilizado como marcador molecular para estas bacterias. El método se aplicó en bovinos susceptibles a anaplasmosis de la Cuenca del Papaloapan donde la movilidad del ganado es continua.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Producción de bovinos en el trópico mexicano

La ganadería es una de las principales actividades económicas a nivel mundial, aproximadamente mil millones de personas dependen de esta industria y se estima que para el año 2050 tendrá un aumento del 70 % (FAO, 2021). En México, el área tropical abarca 51'278,600 hectáreas distribuidas mayoritariamente en 11 estados de la República que corresponden al 26.2 % del territorio nacional; de éstas, cerca del 56 % son dedicadas a la producción pecuaria, donde se pastorean más de 15 millones de bovinos de los cuales, entre el 50 y 67 % que se encuentran en zonas de marginación, se explotan bajo el sistema de doble propósito (Tabla 1) (Rangel *et al.*, 2017).

**Tabla 1** Estados con producción bovina bajo el sistema de Doble Propósito (DP).

Estados	Cabezas de ganado	Grado de marginación
Campeche	668,465	Alto
Chiapas	2,611,432	Muy alto
Colima	185,614	Bajo
Michoacán	2,036,503	Alto
Morelos	138,404	Alto
Nayarit	666,143	Alto
Oaxaca	1,826,633	Muy alto
Quintana Roo	121,274	Bajo
Sinaloa	1,635,441	Medio
Tabasco	1,692,442	Alto
Veracruz	4,470,648	Alto
Otros estados	19,600,620	-
<b>Total</b>	<b>35,653,619</b>	-

El ganado de doble propósito, son cruces de *Bos taurus*, *Bos indicus* y criollo, destinado a la producción de carne y leche (Arce *et al.*, 2017). Las razas *B. taurus* mezcladas son; Pardo suizo, Holstein y Simental, mientras que las razas *B. indicus* son Brahman, Gyr, Sardo Negro, Indobrasil, Nelore y Guzerat (Cortés-López *et al.*, 2012).

La producción ganadera de DP es preferida en granjas familiares ya que este tipo de sistemas son flexibles y adaptables a zonas tropicales con altos índices de temperatura y humedad, además, se necesita poca inversión para el establecimiento de este sistema productivo (Rangel *et al.*, 2020; Ruíz-Guevara *et al.*, 2018).

En la Cuenca del Papaloapan, especialmente en el área perteneciente a Oaxaca, el ganado de DP se cría tanto en sistemas de tras patio o familiar, así como en sistemas extensos o semi extensos, donde las praderas son continuamente pastoreadas y solo los productores con más desarrollo tecnológico practican el pastoreo rotativo (Cortés-López *et al.*, 2012).

## **1.2 Enfermedades prevalentes en bovinos de zonas tropicales**

Estudios retrospectivos indican que en las ganaderías de zonas tropicales existe un grave problema de salud, ocasionado por la propagación de enfermedades endémicas. La mayoría de las unidades de producción ganadera no disponen de un calendario de sanidad animal y generalmente la aplicación de fármacos se realiza cuando ya inició el brote de enfermedades (Díaz *et al.*, 2003). En el caso del ganado vacuno, prevalecen enfermedades como la mastitis, brucelosis y cuadros clínicos asociados a *E. coli* (ELANCO, 2023). Algunas de ellas transmitidas por algunas especies de moscas picadoras (*Stomoxys calcitrans*) y tabánidos (*Tananidae*) (Aubry y Geale, 2011).

En los últimos años, uno de los mayores problemas sanitarios para el desarrollo de la producción ganadera son las garrapatas, este es el caso de *Rhipicephalus microplus* (Silva *et al.*, 2021), que es la principal transmisora de agentes patógenos tales como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*, que pueden formar un complejo de padecimientos conocido como tristeza parasitaria bovina (Galliazzi y Peirano, 2020).

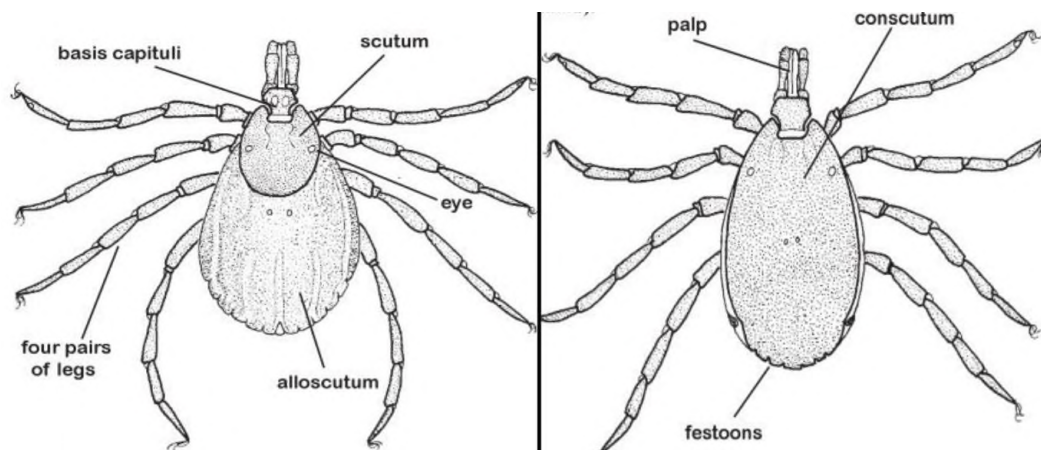
### **1.2.1 *Rhipicephalus microplus***

En diversas partes del mundo se conoce a *R. microplus* como la garrapata del ganado, sobre todo en el continente americano donde su propagación se debió principalmente al transporte comercial del ganado desde el continente asiático. La alta carga de garrapatas en los animales produce daño corporal y una baja producción de carne y leche que se traduce en múltiples pérdidas económicas (Domínguez *et al.*, 2016).

### 1.2.1.1 Identificación y morfología

El Centro de Seguridad y Salud Pública (CFSPH) describe a *R. microplus* como miembro de la familia Ixodidae (garrapatas duras), bajo el género *Rhipicephalus*, que antes era conocido como *Boophilus* (CFSPH, 2007).

Entre sus características se destaca que posee un escudo dorsal (*scutum*) de color marrón anaranjado. El cuerpo tiene forma ovalada y es más ancho en la porción anterior. El color del cuerpo varía de marrón a azul grisáceo, con áreas blancas en la parte anterior y en los bordes. Su aparato bucal (*basis capitulum*) sobresale cuando se ve desde arriba, tienen una placa espidual (*alloscutum*) redondeada, palpos (*palps*) cortos y 4 pares de patas (Figura 1).



**Figura 1.** Morfología de *R. microplus*. Se observa de forma posterior y anterior, donde se resaltan algunas de sus características, el escudo dorsal (*scutum*), aparato bucal (*basis capitulum*) la placa espidual (*alloscutum*) redondeada, palpos (*palps*), bordes en forma de festones (*festoons*) y 4 pares de patas. Modificado de Pottinger, 2019.

### 1.2.1.2 Ciclo biológico

*R. microplus* completa su ciclo de vida en un solo hospedero y consta de cuatro estadios: huevo, larva, ninfa y adultez (Amaro-Estrada *et al.*, 2020). El ciclo comienza cuando las larvas se adhieren a un hospedero y se desarrollan por 19-25 días, luego las hembras caen y depositan sus huevos en el suelo (aproximadamente 3,000 huevos).

Pasados 30 días los huevos eclosionan para dar lugar a larvas con tres pares de patas, se adhieren a un huésped y durante siete días se alimentan y mudan al estadio de ninfa con cuatro pares de patas.

Siete días más tarde se vuelven adultos y se llenan de sangre (ingurgitación) hasta alcanzar 8 mm de tamaño aproximadamente y de nuevo las hembras están listas para desprenderse y depositar sus huevos (Benavides *et al.*, 2016).

### **1.3 Tristeza parasitaria bovina**

También conocida como fiebre de la garrapata, es un complejo de enfermedades que consta de: babesiosis, provocada por dos parásitos protozoarios *B. bovis* y *B. bigemina*, y anaplasmosis, causada por distintas cepas de *Anaplasma*, siendo *A. marginale* la que afecta de forma significativa al ganado bovino; ambas enfermedades son transmitidas principalmente por la garrapata *R. microplus* (Benavides *et al.*, 2016; De León y Rubio, 2021).

Clínicamente son difíciles de diferenciar ya que, la TPB se caracteriza por la presencia de anemia, fiebre, depresión, ictericia, debilidad, ataxia, hemoglobinuria, temblores. En el caso de la anaplasmosis también pueden presentarse abortos y muerte súbita (De León y Rubio, 2021). La intensidad de los síntomas depende del animal infectado, la virulencia de la cepa, la zona geográfica y el sistema productivo (Benavides *et al.*, 2016).

### **1.4 Babesiosis**

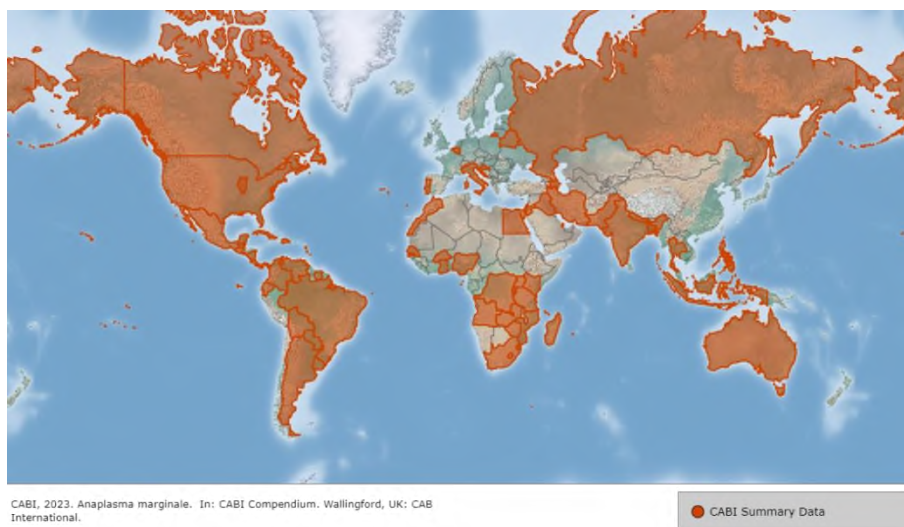
También conocida como piroplasmosis, en bovinos, es una enfermedad provocada principalmente por dos protozoarios del género *Babesia*, *B. bovis* y *B. bigemina* (Ozubek *et al.*, 2020). Se distribuye a nivel mundial en zonas tropicales y subtropicales, su vector de transmisión definitivo son las garrapatas. En México se asocia con la presencia de las garrapatas *R. microplus* y *R. annulatus*, que son los principales vectores de transmisión (Almazán *et al.*, 2018).

Estos protozoarios se reproducen de forma asexual al interior de los glóbulos rojos del huésped, cuando la enfermedad es provocada por *B. bigemina*, los síntomas que se presentan son anemia, ictericia y hemoglobinuria, mientras que *B. bovis* suele causar una sintomatología más grave que incluye malestares como hipotensión, vasodilatación, aumento de la permeabilidad endotelial y daño en los endotelios de los capilares que llevan a los animales a manifestar comportamiento agresivo, falta de equilibrio y respiración acelerada. Otros síntomas graves de la babesiosis son abortos y muerte del animal en algunos casos (De León y Rubio, 2021; Ozubek *et al.*, 2020).

## 1.5 Anaplasmosis

Se trata de una enfermedad causada por bacterias del orden de las Rickettsias, donde *A. marginale* es la que provoca afecciones graves al ganado bovino. Los síntomas característicos son anemia hemolítica que puede llegar a provocar abortos por su rápido progreso, pérdida de la producción de leche y peso, incluso se han reportado muertes de animales que no pueden superar los síntomas graves de la afección (Fernández, 2018).

Se distribuye a nivel mundial (Figura 2) y representa una de las principales causas de pérdidas económicas en zonas ganaderas tropicales y subtropicales (Amaro-Estrada *et al.*, 2020; Kocan *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Distribución mundial de *anaplasmosis*. Se observan las regiones donde se ha reportado la presencia de dicha enfermedad, mediante una recopilación de artículos provenientes de las regiones marcadas en color naranja según el Centro de Biociencia Agrícola Internacional (CABI, 2023).

Se estima que en las zonas tropicales mexicanas el 25 % de las pérdidas totales podría relacionarse con la anaplasmosis ya que, en la exportación del ganado, éste es rechazado de áreas libres de anaplasmosis porque no cubre con los estándares de calidad, otra razón es que su padecimiento disminuye la producción de carne y leche, así como abortos e incremento en los índices de mortalidad (Almazán *et al.*, 2018; Aubry y Geale, 2011).

Una aproximación de la incidencia de anaplasmosis en México fue realizada en el año 2009, con datos recopilados en 2006 (Rodríguez *et al.*, 2009). El estudio se realizó mediante pruebas serológicas y como resultado se obtuvo que la mayor incidencia de bovinos infectados se concentra en el Pacífico, el litoral del Golfo de México y en el sureste del país. En la figura 3 se muestra su distribución, en verde los estados con 10 - 50 % de bovinos positivos mientras que los estados en color naranja tienen a más del 50 % de bovinos enfermos (Figura 3).



**Figura 3.** Distribución de casos de anaplasmosis en México. Adaptado de los datos recopilados en 2006 de distintos estudios realizados para diagnosticar anaplasmosis mediante frotis sanguíneos (Rodríguez *et al.*, 2009).

### 1.5.1 Signos clínicos

La anaplasmosis consta de tres fases: aguda, hiperaguda y crónica, según Fernández (2018). De primera instancia, en la fase aguda el animal infectado presenta fiebre, seguida de anorexia, depresión y debilidad. Los eritrocitos se destruyen, pero no se libera la hemoglobina, lo que da como resultado mucosas pálidas y sangre de aspecto acuoso hasta llegar a ictericia (mucosas amarillentas) (Corona, 2004).

En la fase hiperaguda los síntomas de la fase aguda continúan, sin embargo, para este punto aproximadamente el 90 % de los eritrocitos ya han sido parasitados. Otras afecciones son abortos,

fallos cardiopulmonares, incluso la muerte del animal. Se presentan comúnmente entre 24 - 36 horas después del pico de parasitemia (Corona, 2004; Silva *et al.*, 2021)

Por último, la forma crónica tiene ausencia de signos clínicos típicos, los bovinos pueden generar una respuesta regenerativa a la anemia después seis a diez semanas, sin embargo, existen recaídas ante la fiebre y la anemia. Además, permanecen como portadores de rickettsia que durante toda su vida (Fernández, 2018; Silva *et al.*, 2021).

### **1.5.2 Mecanismo de transmisión**

Se conocen tres posibles mecanismos de transmisión de *A. marginale*: transmisión mecánica, transplacentaria y biológica (Aubry y Geale, 2011).

#### **1.5.2.1 Transmisión mecánica**

Se han encontrado especies de moscas picadoras (*Stomoxys calcitrans*) y tabánidos (*Tananidae*) que pueden transmitir *A. marginale*. Debido a que se alimentan de forma interrumpida, migrando de un animal a otro, si han ingerido sangre de un bovino enfermo son capaces de contagiar a bovinos sanos (Aubry y Geale, 2011; De León y Rubio, 2021).

Otro tipo de transmisión mecánica sucede cuando hay fómites contaminados con sangre fresca, lo que puede resultar en la propagación de la bacteria dentro del mismo rebaño, así como los pocos cuidados que tienen los productores al manipular a los animales con los mismos instrumentos, como jeringas, pinzas, equipo para descornar, herramientas de castración y equipo para marcaje (Silva *et al.*, 2021).

#### **1.5.2.2 Transmisión transplacentaria**

Algunos estudios reportan la posibilidad de la transmisión vertical de *A. marginale*, cuando las vacas contraen la bacteria en el segundo o tercer trimestre, ya que los eritrocitos infectados entran a la placenta por medio del transporte sanguíneo de la madre hacia el producto, el ternero nace con peso bajo, anemia y debilidad, incluso puede morir si no es tratado a tiempo (Gonçalves *et al.*, 2005; Kocan *et al.*, 2010).

#### **1.5.2.3 Transmisión biológica**

La transmisión de *A. marginale* ocurre principalmente a través de *R. microplus*. Las larvas, ninfas y garrapatas adultas adquieren la bacteria al alimentarse del ganado infectado y migran hacia el

intestino donde se reproducen. Viajan hacia el intestino medio y a otros tejidos como las glándulas salivales donde continúan replicándose en fase logarítmica.

En una segunda ingurgitación, después de la muda (ninfas), las garrapatas secretan *A. marginale* en su saliva mientras se alimentan de la sangre de su huésped y de este modo la bacteria entra en la sangre del bovino (Amaro-Estrada *et al.*, 2020). Al tener contacto con el torrente sanguíneo, la rickettsia entra en el glóbulo rojo y se encierra en una vacuola donde se divide por fisión binaria hasta alcanzar ocho cuerpos de inclusión, las nuevas bacterias salen del eritrocito sin destruirlo, pero dejándolo sin función, y continúan infectando a otros eritrocitos sanos (Silva *et al.*, 2021).

### 1.5.3 Tratamientos

Los métodos de prevención y control mencionados por Fernández *et al.* (2018), para el control de *R. microplus*, incluyen el uso de acaricidas, antibióticos y vacunas. Los acaricidas como: los organofosforados, piretroides sintéticos, amitraz y lactonas macrocíclicas son dirigidos en contra de las garrapatas, sin embargo, su uso indiscriminado ha provocado el surgimiento de cepas de *R. microplus* resistentes, por lo tanto, tampoco existe el control de enfermedades transmitidas por este vector como la Anaplasmosis (Corona, 2004; Fernández, 2018).

Los medicamentos más comunes para tratar la enfermedad son bacteriostáticos derivados de tetraciclinas, hasta ahora los únicos aprobados son la clorotetraciclina y oxitetraciclina (Aubry y Geale, 2011). Estos se basan en la inhibición de la síntesis de proteínas, intercalándose con el ADN o uniéndose de forma irreversible a los ribosomas y ARN mensajero (Silva *et al.*, 2021). Los animales tratados de forma oportuna sobreviven a la enfermedad ya que los signos clínicos disminuyen, sin embargo, el agente infeccioso no puede ser eliminado. Se ha reportado que debido al mal uso de estos antibióticos se pueden generar cepas de *A. marginale* resistentes (Aubry y Geale, 2011).

En los últimos años se ha buscado desarrollar vacunas con rickettsias vivas y muertas (Almazán *et al.*, 2018), una vacuna desarrollada a partir de *A. centrale* vivas, una bacteria menos virulenta que *A. marginale*, brinda protección cruzada pero su uso representa un riesgo de transmisión de otros patógenos al ganado ya que no son vacunas inocuas, además en países como Estados Unidos, México y la Unión Europea está prohibida su aplicación (Silva *et al.*, 2021). También se ha intentado desarrollar vacunas tipo implante que se realizan con proteínas de *A. marginale*, cabe

destacar que no están aprobadas para su comercialización y su uso solo sirve para aminorar la fuerza de los síntomas, no evita la enfermedad (Curtis *et al.*, 2020).

#### **1.5.4 Normatividad**

En México, la NOM-019-ZOO-1994 establece que, si se presenta un brote de tristeza parasitaria bovina se debe realizar el diagnóstico y los resultados deben presentarse a la SAGARPA antes de cumplir 30 días de ser recibidos, además que deben certificarse por veterinarios avalados en el control de garrapatas *Boophilus spp. (Rhipicephalus spp.)*.

Según el código Sanitario para los animales terrestres de la OIE (2021), se debe asegurar con un certificado internacional que los animales crecieron en zonas libres de anaplasmosis bovina por lo menos durante dos años anteriores o que sean negativos a pruebas de diagnóstico por lo menos un mes antes de su transporte. Por último, se establece que los bovinos deben someterse a un tratamiento acaricida y asegurar que se encuentran libres de garrapatas.

#### **1.6 *Anaplasma marginale***

En el género *Anaplasma* se incluyen ocho especies (*A. marginale*, *A. centrale*, *A. phagocytophilum*, *A. ovis*, *A. platys*, *A. bovis*, *A. odocoilei* y *A. capra*). Cuatro de ellas han sido encontradas en bovinos, *A. marginale*, *A. centrale*, *A. bovis* y *A. capra* (Rar *et al.*, 2021) sin embargo, las últimas tres no provocan cuadros clínicos de importancia.

*A. marginale* es la agente causal de anaplasmosis bovina en su forma más severa, sin embargo se ha encontrado en rumiantes salvajes como búfalo (*Bubalus bubalis*) bisonte americano (*Bison bison*), venado bura (*Odocoileus hemionus*), venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y alces (*Cervus elaphus nelsoni*) (Aubry y Geale, 2011; Rar *et al.*, 2021).

Es una bacteria Gram-negativa que pertenece al género *Anaplasma*, de la familia *Anaplasmataceae*, del orden de las rickettsias (Tabla 2), es un microorganismo intracelular obligado que tiene forma cocoide y mide entre 0.3 y 0.8 µm de diámetro (Amaro-Estrada *et al.*, 2020).

**Tabla 2.** Taxonomía de *A. marginale*

<b>Dominio</b>	Bacteria	<b>Familia</b>	Anaplasmataceae
<b>Filo</b>	Proteobacterias	<b>Género</b>	<i>Anaplasma</i>
<b>Clase</b>	Alphaproteobacteria	<b>Especie</b>	<i>Anaplasma marginale</i>
<b>Orden</b>	Rickettsiales		

**1.6.1 Características del genoma de *A. marginale***

El genoma de la bacteria *A. marginale* fue secuenciado por Brayton *et al.* en 2005 (Tabla 3). Contiene 1,197,687 pb, con un porcentaje de G-C del 49 %, que es inusual en organismos intracelulares obligados, donde se han encontrado porcentajes entre 30 y 35 % (Battilani *et al.*, 2017) . Cuenta con 949 secuencias codificantes de ADN de aproximadamente 1,077 pb, ocho sitios de marco abierto de lectura (ORF) y un único operón donde se encuentra la secuencia correspondiente al ARN ribosómico y 37 ARN de transferencia correspondiente a los 20 aminoácidos (Brayton *et al.*, 2005).

**Tabla 3** Características del genoma de *A. marginale*

Tamaño del genoma (pb)	1,197,687
G – C %	49
Proteínas codificantes	86
Genes codificantes de proteínas	949
Asignación funcional	567
Asignación familiar conservada	107
Conservación hipotética	126
Hipotéticos	151
Pseudogenes funcionales	14
ORF de dominio dividido	8
Densidad de genes	0.79
Longitud media del gen (pb)	1,077
ARN ribosómicos	3
ARN de transferencia	37

Las bacterias pertenecientes a la familia de las *Anaplasmataceae* poseen proteínas de superficie de membrana externas (MSP), éstas han sido relacionadas con funciones de respuesta entre patógeno - huésped (Battilani *et al.*, 2017).

### **1.6.2 Proteínas de superficie de membrana externa**

Se han descrito dos superfamilias msp1 y msp2 que incluyen 9 y 56 miembros, respectivamente (Brayton *et al.*, 2005). De estas familias se han estudiado seis genes que son blancos de respuesta inmune del hospedero contra el patógeno y se han utilizado como referencia de la diversidad genética de las distintas cepas de *A. marginale* (Amaro-Estrada *et al.*, 2020).

#### **1.6.2.1 Superfamilia MSP1**

La proteína MSP1 es un heterodímero compuesto por dos polipéptidos MSP1a y MSP1b (Dos Santos *et al.*, 2019). Se demostró que esta proteína es una adhesina, es decir, funciona como un receptor entre *A. marginale* y el eritrocito, aunque a la fecha no se conoce su mecanismo de acción (Battilani *et al.*, 2017).

El polipéptido MSP1a está codificado por el gen msp1 $\alpha$  que tiene una única copia en el genoma, posee un dominio conservado de 23 aminoácidos y otro variable que consta 31 aminoácidos en el cual se encuentran repeticiones en tándem (Ocampo *et al.*, 2008). Algunos estudios han determinado que este gen es útil para la caracterización de las distintas cepas de *Anaplasma spp.* (Brayton *et al.*, 2005; Dos Santos *et al.*, 2019). Por otro lado, el polipéptido MSP1b no puede utilizarse como marcador ya que es polimórfico incluso dentro de la misma población y está formado por varios genes con al menos cuatro copias (Corona, 2004).

#### **1.6.2.2 Superfamilia MSP2**

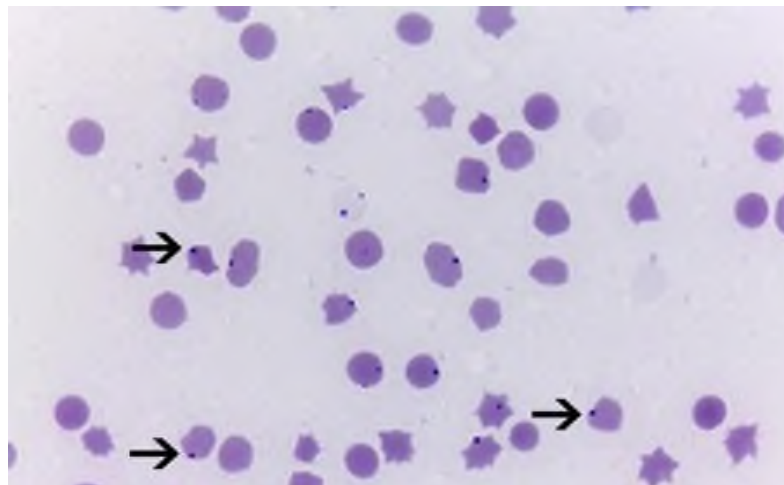
En ella se han clasificado cuatro proteínas MSP con números consecutivos del 1 al 4. La proteína MSP2 (36 kDa), codificada por una familia multigénica con el mismo nombre, donde se encuentran hasta siete pseudogenes con alto grado polimórfico (Battilani *et al.*, 2017; Brayton *et al.*, 2005), se ha demostrado que en la fase aguda de la enfermedad se transcriben distintas copias para evitar el reconocimiento por parte del sistema inmune del hospedero (Corona, 2004).

MSP3 (86 kDa), es una proteína que posee dos formas polimórficas dentro del ciclo de la enfermedad, se ha especulado que estas formas provienen de una recombinación con algún pseudogen de la proteína MSP2 (Brayton *et al.*, 2005; Corona, 2004).

El gen que codifica la proteína MSP4 (31 kDa) es altamente conservado en todas las especies de *Anaplasma spp.*, por lo cual no puede ser utilizado para la caracterización (Battilani *et al.*, 2017). Mientras que, el gen *mSP5*, codifica a la proteína dimérica MSP5 (19 kDa) y tiene una sola copia en el genoma, al igual que el gen *mSP4*, es altamente conservado y estable en todas las cepas de *A. marginale* (Amaro-Estrada *et al.*, 2020; Corona, 2004), debido a que ambos están presentes en diversas *Anaplasma spp.* no son utilizados para la caracterización de una especie en específico.

### 1.6.3 Diagnóstico

El diagnóstico de la anaplasmosis por medio del cuadro clínico es sugestivo debido a que se realiza comúnmente por la observación de signos clínicos y pruebas de laboratorio que se basan en frotis sanguíneos, pruebas serológicas y en ocasiones, diagnóstico molecular (Aubry y Geale, 2011; Corona, 2004). Los frotis sanguíneos, evidencian la presencia de hemoparásitos solo en la fase aguda donde los niveles son superiores a 10<sup>6</sup> eritrocitos infectados por ml, es un método tedioso cuando se requiere analizar un gran número de muestras, además es imposible diferenciar entre *Anaplasma spp.*, incluso su diferenciación con protozoarios causantes de babesiosis es muy difícil debido a su que poseen forma y tamaño parecidos, por lo tanto, los frotis sanguíneos no son del todo útiles para su reconocimiento (Figura 4) (Corona, 2004).



**Figura 4.** Frotis de sangre bovina. Se muestran estructuras intraeritrocíticas redondas, posiblemente se trata de *A. marginale*. Modificada de (Henker *et al.*, 2020).

Otro método, es la realización de inmunoanálisis de competición (c-ELISA) donde un anticuerpo se une a la proteína de superficie (MSP5) de *A. marginale*. Este ensayo utiliza un antígeno recombinante denominado rMSP5 y un anticuerpo monoclonal (MAb) específico para MSP5 (De

León y Rubio, 2021; Silva *et al.*, 2021). La proteína MSP5 está presente en todas las especies del género *Anaplasma*, presenta actividad cruzada entre las especies *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *A. phagocytophilum* y *Ehrlichia spp.* (Primo *et al.*, 2019).

#### 1.6.4 Técnica de PCR

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro*, que aprovecha la función de la ADN polimerasa extraída de *Thermus aquaticus*, donde se generan millones de copias de una secuencia específica de ADN. Incluye diversos componentes como oligonucleótidos, iones específicos, Taq polimerasa, dNTPs, ADN molde y agua (Kralik y Ricchi, 2017).

La técnica comienza con una desnaturalización inicial que tiene como propósito separar las hebras de ADN molde, seguida de una serie de ciclos (generalmente 30 - 35) que incluyen desnaturalización (90 - 94 °C) para producir cadenas simples de ADN, alineación de los oligonucleótidos (50 - 65 °C) que flanquean el fragmento a amplificar, y extensión (68 - 72 °C), que es el proceso donde la Taq polimerasa elonga los fragmentos añadiendo dNTPs, al final se agregan unos minutos de extensión final para asegurar la elongación total de los fragmentos de interés (Peña-Castro *et al.*, 2013). Además de los métodos serológicos antes mencionados, el diagnóstico de anaplasmosis puede realizarse mediante la técnica de PCR, siendo las variantes más comunes la PCR de punto final, nPCR y qPCR (Tabla 4).

**Tabla 4.** Métodos de detección de anaplasmosis

Método de detección	Gen	Organismo detectado	Referencia
qPCR	msp5	<i>A. marginale</i> y <i>A. ovis</i>	(Bacanelli <i>et al.</i> , 2014)
c-ELISA	msp5	<i>A. marginale</i> y <i>A. centrale</i>	(Primo <i>et al.</i> , 2019)
nPCR	msp5	<i>A. marginale</i> y <i>A. centrale</i>	(Guarnizo <i>et al.</i> , 2020)
qPCR	16s ARNr	<i>Anaplasma spp.</i> y <i>Ehrlichia spp.</i>	(Parvizi <i>et al.</i> , 2020)
PCR	msp1β	<i>A. marginale</i>	(Nasreldin <i>et al.</i> , 2020)
PCR	msp5	<i>A. marginale</i> y <i>A. centrale</i>	(Silva <i>et al.</i> , 2021)
PCR	msp4	<i>A. marginale</i>	(Junsiri <i>et al.</i> , 2020)
nPCR	msp1α	<i>A. marginale</i>	(Dos Santos <i>et al.</i> , 2019)

En animales infectados de manera persistente se han detectado los genes *msp1 $\beta$* , *msp4*, *msp5* y *16s*, sin embargo, éstos se han encontrado en diversas especies de *Anaplasma spp.*, por lo que son métodos de detección de anaplasmosis, pero no de *A. marginale* (Bacanelli *et al.*, 2014) que es la que provoca el cuadro clínico severo de la enfermedad (Amaro-Estrada *et al.*, 2020).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La industria ganadera es una de las principales actividades económicas en México y es afectada por la presencia de patógenos que causan múltiples enfermedades impactando directamente en la producción de carne y leche, entre ellas la anaplasmosis bovina, que en las zonas tropicales puede llegar a representar hasta el 25 % de pérdidas monetarias.

El principal vector en la transmisión de la anaplasmosis es la garrapata *R. microplus* que además puede transmitir otras enfermedades como la babesiosis, formando un complejo conocido como tristeza parasitaria bovina (anaplasmosis y babesiosis al mismo tiempo) sin embargo, en su fase aguda, la anaplasmosis puede provocar abortos y muerte. El tratamiento de estas enfermedades se realiza con antibióticos como las tetraciclinas, que son utilizadas de manera descontrolada por los productores ya que por lo regular no se cuenta con un diagnóstico real de la enfermedad que causa el cuadro clínico, provocando el desarrollo de cepas resistentes a antibióticos de uso común.

Los métodos de detección como los frotis sanguíneos presentan falsos negativos debido a que el resultado depende en gran medida de la carga bacteriana en sangre. Los métodos moleculares como los ELISA y PCR (incluyendo sus variantes como qPCR y nPCR), presentan falsos positivos, pues el gen *msp5* en el que comúnmente se basa la detección, tiene una reacción cruzada con otras especies de *Anaplasma* como *A. centrale*, *A. ovis*, *A. phagocytophilum* y *Ehrlichia spp.* Esto representa una gran desventaja para diagnosticar de forma específica *A. marginale* en bovinos.

A partir dicha necesidad, se generó un método de diagnóstico molecular rápido y preciso para la detección de anaplasmosis causada específicamente por *A. marginale*, basado en el gen *msp1 $\alpha$* , que ha sido utilizado como marcador molecular para estas bacterias. El método se aplicó en bovinos susceptibles a anaplasmosis de la Cuenca del Papaloapan donde la movilidad del ganado es continua.

### **3. HIPÓTESIS**

El diagnóstico molecular oportuno y confiable, basado en la técnica de PCR, permitirá identificar de forma precisa a la bacteria *Anaplasma marginale*, causante de anaplasmosis en bovinos de la Cuenca del Papaloapan región Oaxaca.

### **4. OBJETIVOS**

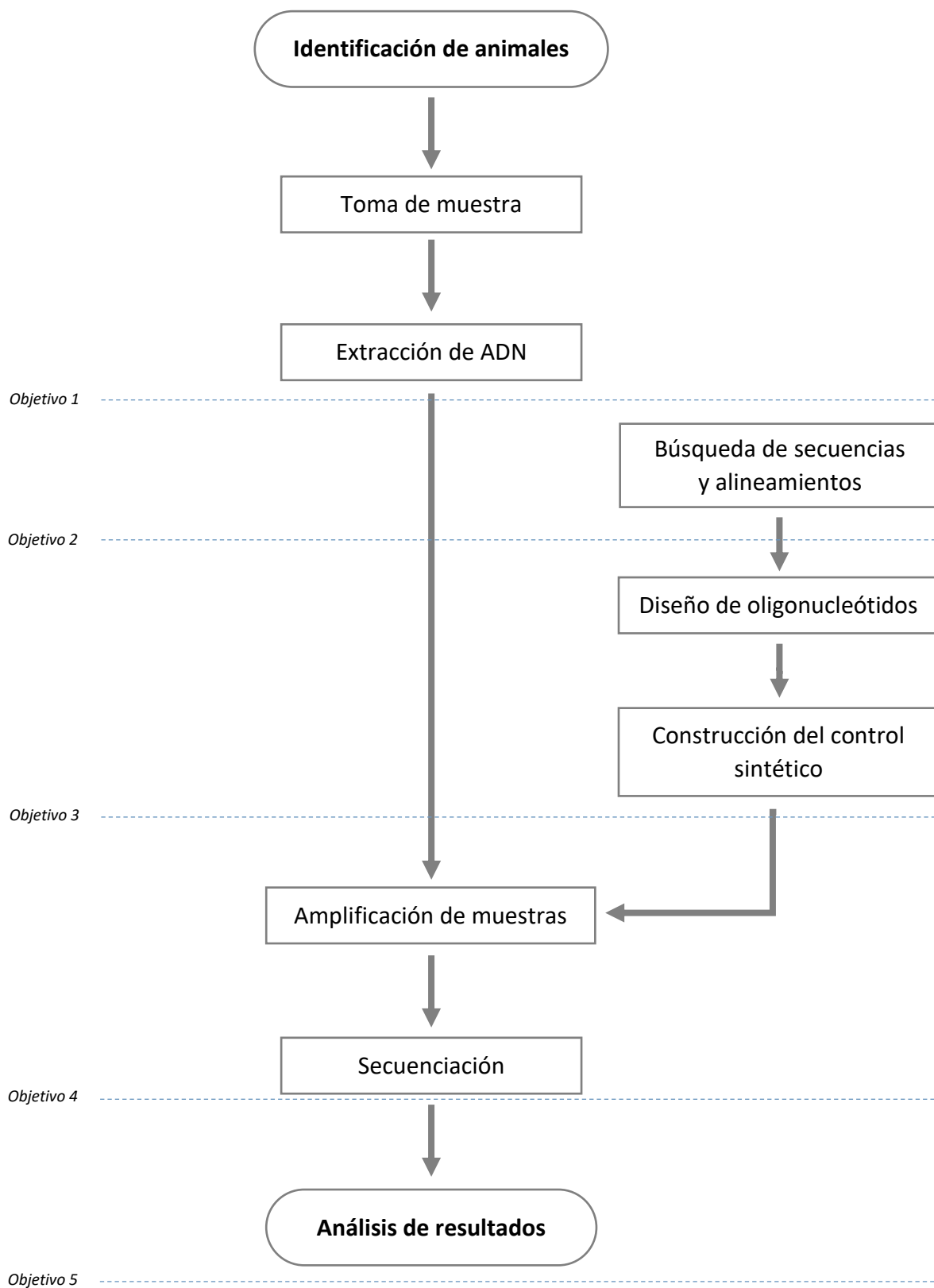
#### **4.1 Objetivo general**

Diseñar un método de diagnóstico molecular adecuado para identificar de forma precisa la enfermedad anaplasmosis en bovinos, causada por *Anaplasma marginale*, basado en la técnica de PCR.

#### **4.2 Objetivos específicos**

1. Identificar la región de un gen de *Anaplasma marginale* como base del método de diagnóstico, mediante una revisión de literatura.
2. Diseñar y obtener la construcción de un control sintético para utilizarlo como control positivo de la presencia de *Anaplasma marginale*.
3. Realizar los ensayos mediante la técnica de PCR y secuenciar los positivos para corroborar los resultados.
4. Comparar las secuencias obtenidas con los reportes de bases de datos.

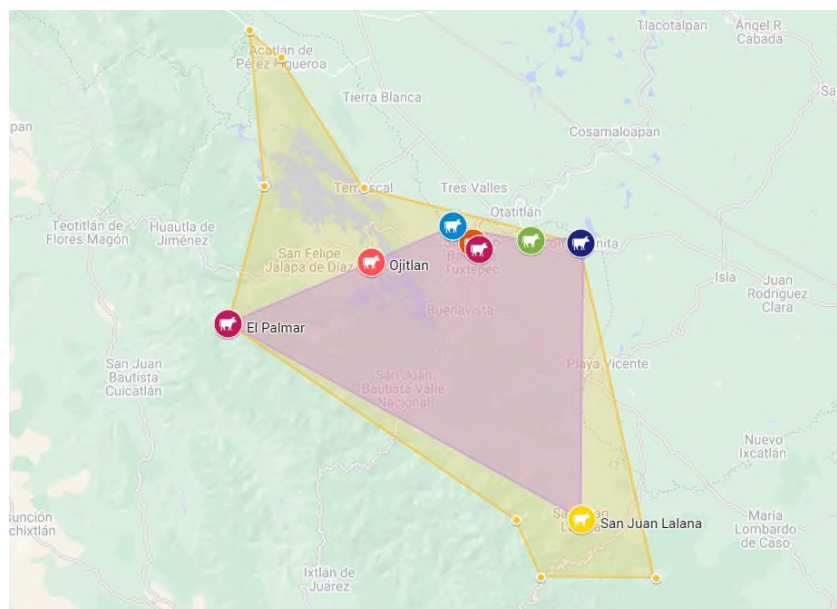
## 5. DIAGRAMA EXPERIMENTAL



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Ubicación de hatos ganaderos

Se seleccionaron ocho ranchos de tres comunidades ubicadas en municipios de la Cuenca del Papaloapan, pertenecientes a los municipios de San Juan Bautista Tuxtepec: El porvenir (18°15'14.26 N; 96°22'44.47 W) , San Lucas Ojtlán (18°3'41.36" N; 96°23'53.63" W), Zacate Colorado (18°08'56.266 N; 96°11'21.477 W) Benemérito Juárez (18°11'38.22 N; 96°00'05.24 W) y El Palmar (18°12'72.22 N; 96°17'88.89 W) , en Loma Bonita: Loma Bonita (18°01'19.8 N; 95°51'33.342 W) y San Benito (17°59'11.888 N; 95°54'32.342 W) , y en San Juan Lalana: San Juan Rio Manso (17°40'11.255 N; 95°52'48.603 W) (Figura 5).



**Figura 5.** Ubicación de hatos muestreados. Se tomaron 52 muestras en ranchos ubicados en municipios pertenecientes a la Cuenca del Papaloapan, región Oaxaca

### 6.2 Toma de muestras

Se recolectaron 52 muestras de sangre (Tabla 5), algunas de las venas auriculares (Figura 6) y otras de la vena coccígea (5 – 7 ml) en tubos Vacutainer® con EDTA como anticoagulante y fueron identificadas al momento del muestreo. Los criterios para la selección de los bovinos muestreados fueron los siguientes: Apariencia fenotípica propia de cruza de alguna raza *Bos taurus* x *Bos indicus*, presencia de garrapatas en el cuerpo y síntomas como debilidad, deshidratación y bajo peso.

**Tabla 5.** Bovinos muestreados por comunidad.

Municipio	Comunidad	Muestras
San Juan Bautista Tuxtepec	El Porvenir	11
	San Lucas Ojitlán	2
	Zacate Colorado	9
	El Palmar	8
	Benemérito Juárez	9
	Centro de Salud Animal	4
San Juan Lalana	San Juan Río Manso	5
Loma Bonita	San Benito	4
	Loma Bonita	6
<b>TOTAL</b>		<b>58</b>

Asimismo, se obtuvieron cuatro muestras por parte del Laboratorio del Centro de Salud Animal de la Unión Ganadera Regional del Norte de Oaxaca, las cuales se catalogaron como posibles casos de anaplasmosis, dos de bovinos y dos de equinos, relacionando los síntomas referidos por los dueños al veterinario encargado de dicho laboratorio. También, se recibieron dos muestras por parte de un productor de San Lucas Ojitlán.



**Figura 6.** Toma de muestra sanguínea de la vena auricular.

Previo a la toma de muestra se realizó la identificación e inmovilización del bovino siguiendo la metodología del “Manual veterinario para la toma de muestra” (PANAFTOSA – OPS/OMS. 2017).

### **6.3 Almacenamiento y procesamiento de muestras**

Las muestras fueron depositadas en una hielera con una temperatura entre 2 - 8 °C y se transportaron al Laboratorio de Biotecnología Animal del Centro de Investigaciones Científicas de la Universidad del Papaloapan, ubicada en Circuito Central 200, Parque Industrial, 68301 San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, donde fueron almacenadas a -20 °C hasta su procesamiento.

### **6.4 Extracción de ADN bacteriano**

Se utilizó el kit de extracción de ADN bacteriano (Norgen Biotek Corp.), el protocolo se siguió de acuerdo con las especificaciones del fabricante y se describe a continuación:

Se añadieron 20 µL de Proteinasa K (incluida en el Kit) a un tubo de microcentrífuga, más 200 µL de sangre, se mezcló con ayuda de una micropipeta, posteriormente se agregaron 300 µL de Buffer de lisis, se mezcló por 10 segundos en un vórtex. Se incubó a 55 °C por 10 minutos y se centrifugó a 11,960 rpm por 2 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo, se añadieron 110 µL de etanol de grado molecular y se mezcló por 10 segundos en un vórtex, luego se centrifugó a 11,960 rpm por 1 minuto.

Para la preparación de la columna, ésta se colocó en tubo de recolección y se añadió el sobrenadante, se centrifugó a 7,830 rpm por 1 minuto, se descartó el líquido y la columna fue colocada en el mismo tubo de recolección. Se añadieron 500 µL de solución WN y se centrifugó a 7,830 rpm por 1 minuto, se descartó el líquido y se colocó la columna en un tubo de recolección. Después, se agregaron 500 µL de solución A y se centrifugó a 11,960 rpm por 1 minuto. Se descartó el líquido y se colocó la columna en el mismo tubo. El lavado con la solución A se repitió una vez más, pero se centrifugó por 2 minutos. Finalmente, para la elución del ADN se colocó la columna en un tubo de elución y se añadieron 100 µL de Buffer de elución y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, posteriormente se centrifugó a 7,830 rpm por 2 minutos. Las muestras extraídas se etiquetaron y fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso.

Todos los procesos de centrifugación fueron realizados en una microcentrífuga PrO-Analytical (Centurion Scientific Ltd) con un rotor de 8.75 cm de diámetro.

## 6.5 Verificación y cuantificación del ADN extraído

El ADN extraído se analizó por espectrofotometría en un Nanodrop 2000c (Thermo Scientific®) para cuantificar su pureza. A la par se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % para verificar la integridad del ADN. Para ello se cargaron 4 µL de ADN más 1 µL de Buffer de carga 6 X DNA Loading Dye. El corrimiento se llevó a cabo con Buffer TAE 1 X por 30 min a 120 Volts en una cámara ENDURO™ (Electrophoresis systems) y se realizó la tinción del gel en una solución de bromuro de etidio (0.1 mg/µl), posteriormente se visualizó en un sistema de Foto documentación InGenius LHR Gel Doc System Lab (Syngene), donde se observaron bandas referentes a ADN genómico (Anexo 1).

## 6.6 Análisis y búsqueda bioinformática para el diseño de oligonucleótidos y secuencia control

### 6.6.1 Diseño de oligonucleótidos

Se analizaron los genes correspondientes a seis proteínas de superficie que son clave en el reconocimiento huésped - patógeno y se seleccionó el gen *msp1α* debido a que solo tiene una copia en el genoma de *A. marginale*.

Se realizó una búsqueda de todas las secuencias reportadas del gen *msp1α* en la base de datos del NCBI, los criterios de dicho escrutinio fueron el rango de la secuencia (600 - 3,000 pb) y la fecha de reporte (2005 - 2022). Posteriormente, se seleccionaron las secuencias que fueran específicamente de *A. marginale* y no fueran cepas de un mismo estudio, se excluyeron las secuencias con la leyenda de "No verificación". Aplicando los criterios de búsqueda y selección se obtuvieron 49 secuencias, con las cuales se realizó un alineamiento en el programa MEGA X (Anexo 2), que fue utilizado como base para el diseño de los oligonucleótidos y la secuencia control. El diseño de los oligonucleótidos se realizó siguiendo las siguientes condiciones: el porcentaje citosina - guanina (% CG = 40 - 60), tamaño entre 20 - 26 nucleótidos, temperatura de alineamiento entre 50 - 60 °C y productos no mayores a 150 pb.

Los oligonucleótidos obtenidos fueron *Fam* (directo) y *Ram* (reverso), estos amplifican un fragmento de 83 pb del gen *msp1α* de *A. marginale*, el fragmento obtenido se nombró *Cam T* y se utilizó como secuencia control (Tabla 6).

**Tabla 6.** Oligonucleótidos diseñados para amplificar un fragmento de 83 pb del gen *msp1α*

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño (nt)	T. alineamiento (°C)
<i>Fam</i>	5'...GTGCTTATGGCAGACATTTCC...3'	21	59.5
<i>Ram</i>	5'...ATCGCAAGATTAATATACTAAATTTT...3'	26	55.2

Posteriormente, se realizó una búsqueda en la literatura para obtener información sobre oligonucleótidos específicos para *A. marginale* que hayan sido reportados con anterioridad. Se seleccionaron los reportados por Kovalchuk *et. al* (2020). Este par de oligonucleótidos fueron utilizados en una segunda PCR para la confirmación de la presencia de *A. marginale* en las muestras recolectadas (Tabla 7)

**Tabla 7.** Oligonucleótidos diseñados para amplificar un fragmento de 207 pb del gen *msp1α*

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño (nt)	T. alineamiento (°C)
<b>Mspa1F</b>	5'...TGTTGGAACCTAGGCTTATAG...3'	22	58.4
<b>Msp1aR</b>	5'...CTTCTGCTGATCTTCTGTCTC...3'	22	62.1

Se realizó una PCR *in silico* para el ensayo de genomas procariotas en el servidor <http://insilico.ehu.eus/> (Bikandi *et al.*, 2004), con el fin de confirmar de forma teórica que ambos pares de oligonucleótidos son capaces de amplificar solo una región del gen *msp1α*.

Se proporcionaron los oligonucleótidos *Fam* (5'...GTGCTTATGGCAGACATTTCC...3') y *Ram* (5'...ATCGCAAGATTAATATACTAAATTTT...3') y se realizó el ensayo para los nueve genomas del género *Anaplasma* disponibles en la plataforma.

### 6.6.2 Diseño de secuencia control

Se determinó que el tamaño de la secuencia control sería de 83 pb, que es la región flanqueada por los oligonucleótidos *Fam* y *Ram*, a partir de esto se utilizaron dos fragmentos de 49 pb, el fragmento *Cam 1* con dirección 3' a 5' y el segundo fragmento *Cam 2* con la misma dirección, pero de forma reversa complementaria, con un solapamiento de 15 nt entre el final del primer fragmento y el inicio del segundo. Ambos oligonucleótidos se unieron mediante una PCR de fusión

(Overlap-PCR), para dar lugar al fragmento *Cam T* (Tabla 8). La secuencia esperada *Cam T*, así como la de los fragmentos a partir de las cuales se obtuvo son las siguientes:

**Tabla 8.** Oligonucleótidos diseñados para generar el control positivo mediante PCR de fusión

Fragmentos	Secuencia
<i>Cam T</i>	5'...GTGCTTATGGCAGACATTTCCATATACTGTGCAGTATGGTTGTGCTCCCCAAT TGTTAAAATTTAGTATATTAATCTTGCGAT...3'
<i>Cam 1</i>	5'...GTGCTTATGGCAGACATTTCCATATACTGTGCAGTATGGTTGTGCTCCC...3'
<i>Cam 2</i>	5'...ATCGCAAGATTAATACTAAATTTTAAACAATTGGGGAGCACAACCATA...3'

Para la PCR de fusión se siguió el protocolo descrito por Santiago (2019) (Tabla 9).

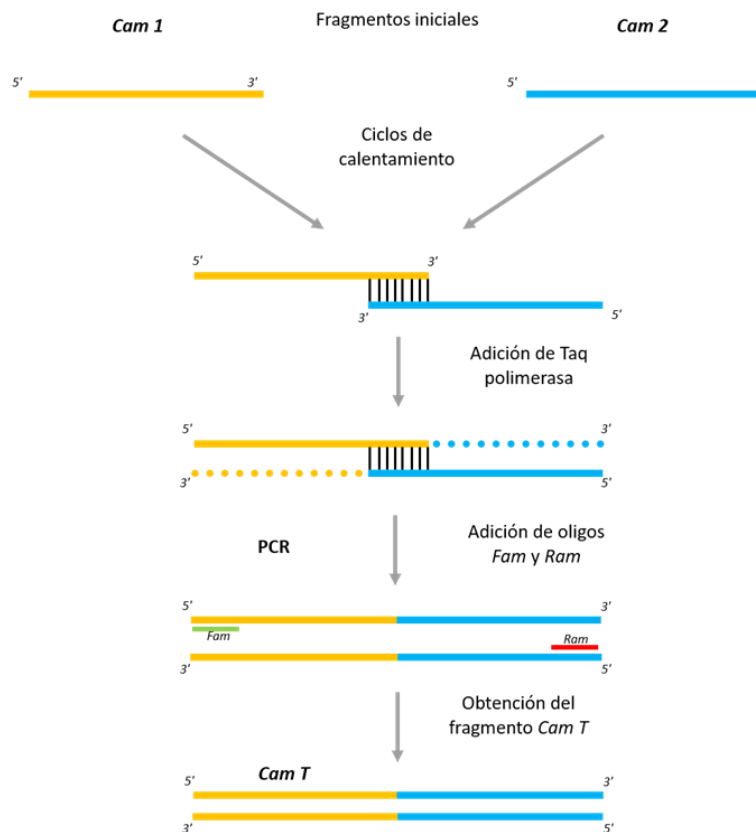
**Tabla 9.** Programa de fusión para los fragmentos *Cam 1* y *Cam 2*

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1	95	5 min	1
2	94 (-2 en cada ciclo)	1 min	35
3	24	25 min	1
<b>PAUSA</b>			
Tomar 10 µL de la reacción y agregar 10 µL de mezcla de polimerasa con buffer y dNTPs (volumen final: 20 µL).			
4	68	5 min	1
<b>PAUSA</b>			
Tomar 8 µL de la reacción y agregar a 12 µL de la mezcla de reacción de PCR con los primers <i>Fam</i> y <i>Ram</i> .			
5	94	3 min	1
6	94		
7	60.7	30 seg	35
8	72		
9	72	5 min	1
10	4	∞	1

Donde se utilizaron como molde los dos fragmentos (*Cam 1* y *Cam 2*), se siguió un programa para su fusión que consistió en un primer ciclo de 5 minutos a 95 °C y posteriormente 35 ciclos de 1 minuto donde en cada uno se disminuyen 2 °C, hasta llegar a 24 °C donde se mantiene a esta temperatura por 25 minutos.

Se pausó el termociclador y se tomaron 10  $\mu$ L de la reacción y se mezclaron con 10  $\mu$ L de enzima DreamTaq (Mezcla 2X de polimerasa, DNTP's y Buffer), para obtener un volumen final de 20  $\mu$ L. Se continuó la reacción, colocando el nuevo tubo en el termociclador donde se incubó a 72 °C por 5 minutos.

Por último, realizó una PCR convencional, donde se tomaron 8  $\mu$ L de la mezcla anterior y se agregaron a un nuevo tubo con 10  $\mu$ L de DreamTaq y 1  $\mu$ L de cada oligonucleótido (Figura 7). Una vez que se obtuvo el producto de PCR, se realizó un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 3 %, dicha muestra se purificó con el kit QIAquick (QIAGEN) (Anexo 3) y cuantificó en un Nanodrop 2000c (Thermo Scientific®).



**Figura 7.** Esquema de fusión de los fragmentos *Cam 1* y *Cam 2*. Se esquematiza el proceso de la PCR de fusión donde sobresale el solapamiento de 15 nt entre los fragmentos *Cam 1* y *Cam 2*.

### 6.7 Clonación en *E. coli*

El fragmento de 83 pb purificado se ligó al vector pGEM - T easy (Anexo 4) y se insertó en células de *E. coli* químicamente competentes One Shot™ TOP10 (Invitrogen), siguiendo las especificaciones proporcionadas por el fabricante. Del cultivo en medio sólido selectivo, se

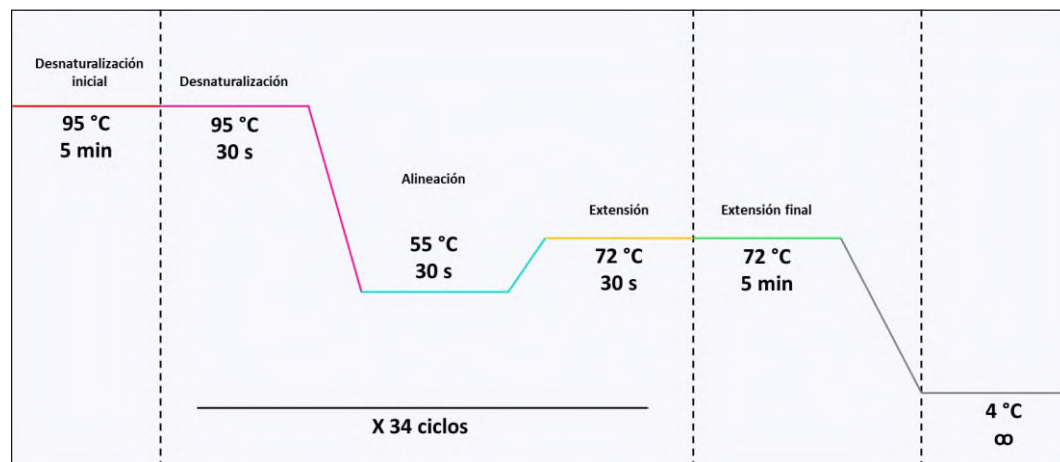
seleccionaron ocho colonias blancas y fueron cultivadas en un medio líquido adicionado con ampicilina (100 µg/mL) a 37 °C durante 12 horas. Pasado el tiempo, se extrajo el plásmido por medio de una lisis alcalina (Anexo 5 y 6), este procedimiento fue llevado a cabo en el laboratorio de Biología molecular y Biotecnología vegetal de la Universidad del Papaloapan.

Para confirmar que las colonias seleccionadas efectivamente contuvieran el inserto, se realizó una PCR de colonia, donde a la mezcla de reacción se le añadió una colonia con ayuda de una punta estéril. Los oligonucleótidos utilizados fueron los M13 directo y reverso (Tabla 10).

**Tabla 10.** Oligonucleótidos utilizados en la PCR de colonia

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño (nt)	T. alineamiento (°C)
<b>M13 Directo</b>	5'... GTAAAACGACGGCC...3'	14	55
<b>M13 Reverso</b>	5'... CATGGTCATAGCTGTTTC ...3'	19	55

El protocolo de reacción constó de 34 ciclos de desnaturalización (30 s a 95 °C), Alineación (30 s a 55 °C) y extensión (30 s a 72 °C), incluyendo una desnaturalización inicial y final, cada una de 5 minutos a 95 y 72 °C, respectivamente (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema del protocolo de reacción de PCR de colonia con los oligonucleótidos M13.

Por último, los plásmidos correspondientes a dos de las cuatro colonias seleccionadas se mandaron a secuenciar al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del CINVESTAV-Irapuato (LANGEBIO), mediante la técnica de Secuenciación capilar de Sanger, por un solo extremo. Por medio de un alineamiento de las secuencias recibidas con el fragmento

esperado de forma teórica, se confirmó que se llevó a cabo exitosamente la fusión de los fragmentos Cam1 y Cam2.

### 6.8 Amplificación de muestras

A partir del ADN bacteriano aislado de las muestras de sangre periférica recolectadas, se amplificó un fragmento del gen *msp1α*, por PCR, utilizando en primera instancia los oligonucleótidos diseñados para la obtención de un amplicón de 83 pb (*Fam* y *Ram*).

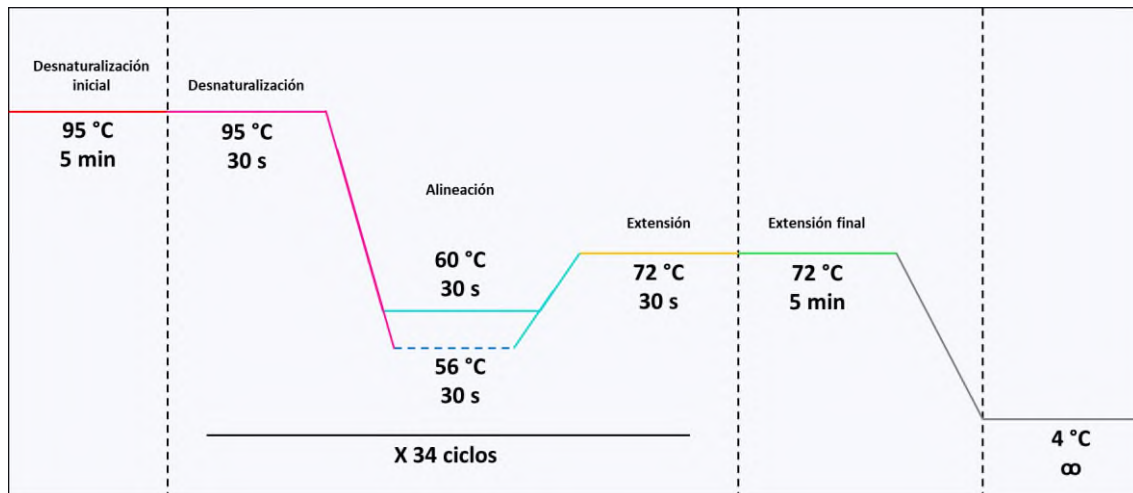
La amplificación de dicho fragmento se llevó a cabo mediante el protocolo de reacción de la ADN polimerasa DreamTaq Máster Mix 2X (Thermo Scientific™), que es una mezcla de buffers y dNTPs lista para usarse (Tabla 11). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: partiendo de una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización, alineación y extensión por 30 segundos a 95, 56 y 72 °C, respectivamente, seguidos de una extensión final a 72 °C por 3 minutos (Figura 9). Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador T100 (BIO-RAD). Para todas las amplificaciones se utilizó una concentración de oligonucleótidos (*Fam* y *Ram*) de 5 μM, el ADN bacteriano se trabajó con concentraciones entre 50 y 80 ng/μL por reacción.

**Tabla 11.** Componentes de la reacción de PCR

Reactivos	Cantidad
DreamTaq Master Mix (2x)	12.5 μL
Oligonucleótido <i>Fam</i> (5 μM)	1.3 μL
Oligonucleótido <i>Ram</i> (5 μM)	1.3 μL
ADN bacteriano	30 – 80 μg/μL
Agua libre de Nucleasas	Aforar a 25 μL
Volumen final	25 μL

Se realizó una segunda PCR para la confirmación de los fragmentos de 83 pb obtenidos anteriormente, con los oligonucleótidos propuestos por Kovalchuk *et. al* (2020), en donde se amplificó otro fragmento del gen *msp1α* de 207 pb. Las condiciones de reacción se siguieron de la siguiente manera: partiendo de una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 34 ciclos de desnaturalización, alineación y extensión por 30 segundos a 95, 60 y 72 °C,

respectivamente, seguidos de una extensión final a 72 °C por 3 minutos (Figura 9). Las condiciones de reacción se siguieron de la misma manera que en las amplificaciones anteriores, solo se cambiaron los oligonucleótidos *Fam* y *Ram* previamente utilizados por *msp1aF* y *msp1aR* al 5 µM.



**Figura 9.** Esquema del protocolo de reacción de PCR. Se incluye la programación de ambos pares de oligos *Fam* - *Ram* y *msp1aF* - *msp1aR*. Se realizaron 34 ciclos de desnaturalización (30 s a 95 °C), Alineación (30 s a 56 y 60 °C) y extensión (30 s a 72 °C), incluyendo una desnaturalización inicial y final, cada una de 5 minutos a 95 y 72 °C, respectivamente.

El programa de PCR para la amplificación de ambos fragmentos del gen *msp1α* constó de los mismos tiempos en cada paso, comenzando por un ciclo de 5 minutos a 95 °C para la desnaturalización inicial del ADN, seguido de 34 ciclos de desnaturalización (30 segundos a 95 °C), alineación (30 segundos a 60 °C en el caso de los oligos *msp1αF* y *msp1αR* y 56 °C para los oligos *Fam* y *Ram*) y extensión (30 segundos a 72 °C), por último se añadió una extensión final de 5 minutos a 72 °C, seguida de una programación a 4 °C por tiempo indefinido para la conservación de las muestras en caso de ser necesario (Figura 9).

Para confirmar que el tamaño del amplicón era el esperado, el producto de la PCR se corrió por electroforesis en un gel de agarosa al 3 % a 110 Volts por 50 minutos. Según sea el caso, se cargaron 8 µL del producto de PCR y 2 µL de marcador de peso NZYDNA Ladder VI (nzytech genes & enzymes).

### 6.8.1 PCR del gen 16S rRNA con oligonucleótidos universales

Se incluyó una muestra de *Bacillus thuringiensis* como control negativo proporcionada por el laboratorio de Cultivo de Células Animales. La cual se confirmó mediante la amplificación de la

región 16 S, con un par de oligonucleótidos 27F (5'...AGAGTTTGATCCTGGCTCAG...3') y 1492R (5'...ACGGYTACCTTGTTACGACTT...3') propuestos por Heuer *et. al* (1997), con las siguientes condiciones de reacción: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización (95 °C por 30 segundos), alineación (60 °C por 30 segundos) y extensión (72 °C por 1 minuto), seguidos de una extensión final a 72 °C por 3 minutos (Valenzuela-González *et al.*, 2015) . Los componentes de la reacción se describen en la tabla 12.

**Tabla 12.** Componentes de reacción de PCR

Reactivos	Cantidad
DreamTaq Master Mix (2x)	12.5 µL
Oligonucleótido 27F (5 µM)	1.3 µL
Oligonucleótido 1492R (5 µM)	1.3 µL
ADN bacteriano	30 – 80 µg/µL
Agua libre de Nucleasas	Aforar a 25 µL
Volumen final	25 µL

## 6.9 Secuenciación

Se seleccionaron las muestras control proporcionadas por el Laboratorio del Centro de Salud Animal de la Unión Ganadera Regional del Norte de Oaxaca la Unión Ganadera (dos equinos) y algunas muestras positivas al azar para su secuenciación.

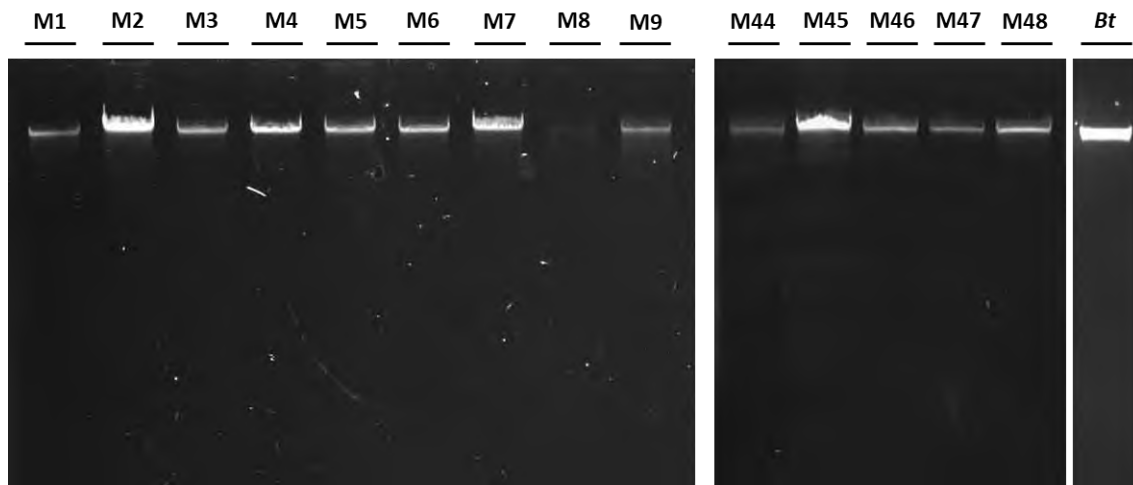
Los productos de PCR obtenidos se purificaron siguiendo las especificaciones proporcionadas por el QIAquick® Extraction Kit (QIAGEN), posteriormente se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 3 %, el corrimiento electroforético se realizó a 110 Volts por 45 minutos, el gel fue teñido con bromuro de etidio y visualizado en un sistema de foto documentación. Asimismo, se verificó su concentración en un Nanodrop 2000c (Thermo Scientific®).

Las muestras seleccionadas se mandaron a secuenciar al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del CINVESTAV - Irapuato (LANGEBIO), mediante la técnica de Secuenciación capilar de Sanger, por un solo extremo.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Integridad y pureza del ADN bacteriano extraído

Se visualizó en un gel de agarosa al 0.8 % el ADN extraído mediante un sistema de fotodocumentación, se observó en cada pozo una banda definida característica del ADN genómico íntegro (Figura 10).



**Figura 10.** ADN bacteriano. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % con Buffer TAE. Se observan algunas muestras extraídas y en el último carril Bt corresponde a la extracción de ADN de *Bacillus thuringiensis*.

Para evaluar su pureza, el ADN se cuantificó en un Nanodrop (Anexo 7), en promedio se tuvieron los siguientes valores:

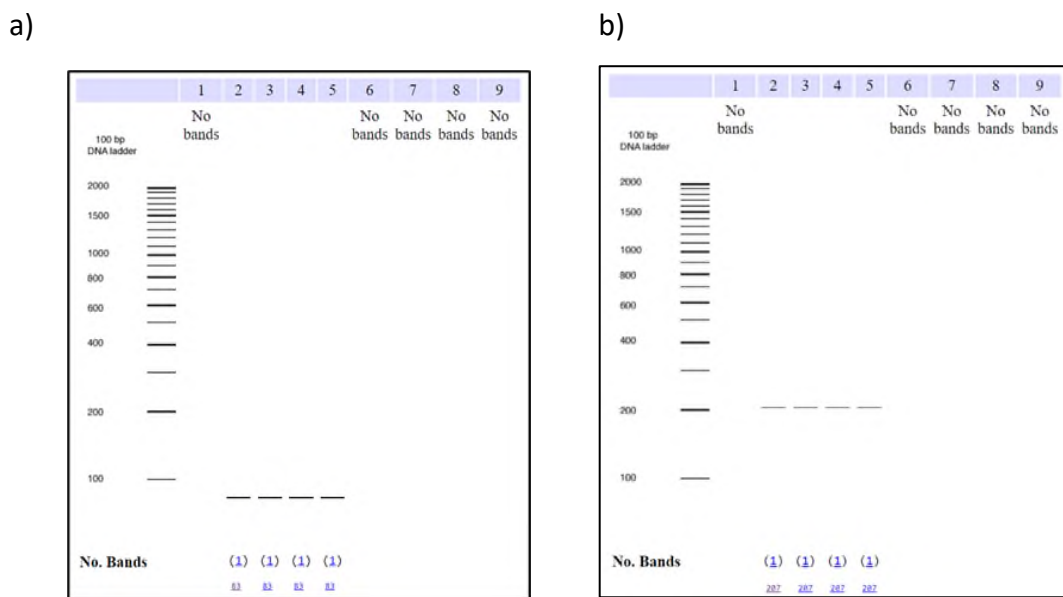
**Tabla 13.** Resumen de la pureza de las muestras de ADN

Variable	Media	EE de la media	Des. Est.	Mínimo	Mediana	Máximo
Ác. nucleicos (ng/ $\mu$ L)	33.98	2.38	18.31	10.50	27.90	98.40
A 260	0.834	0.153	1.179	0.153	0.546	8.574
A 280	0.4303	0.0743	0.5708	0.0590	0.288	4.338
260/280	1.999	0.115	0.880	0.930	1.940	8.310
260/230	2.036	0.165	1.268	0.330	1.940	8.310

Los ácidos nucleicos tuvieron una media de 33.64 ng/ $\mu$ L, la relación de la absorbancia a 260/230 fue de 1.99, mientras que la relación 260/230 en promedio fue 2.036, ambos cumplen con los valores de pureza óptima (Tabla 13).

## 7.2 PCR *in silico*

El ensayo de genomas procariotas en el servidor <http://insilico.ehu.eus/> (Bikandi *et al.*, 2004) se realizó con ambos pares de oligonucleótidos *Fam - Ram* y *msp1aF - msp1aR* y se analizaron los nueve genomas del género *Anaplasma* disponibles en la plataforma. Después del marcador de peso, los pozos corresponden a los siguientes microorganismos: *A. centrale str. Israel*, *A. Marginale Florida*, *A. marginale, str. St. Maries*, *A. Marginale str. Dawn*, *A. marginale, str. Gypsy Plains*, *A. phagocytophilum HZ*, *A. phagocytophilum str. Dog2*, *A. phagocytophilum HZ2* y *A. phagocytophilum JM*. Los resultados encontrados se muestran en la figura 11 (a y b).

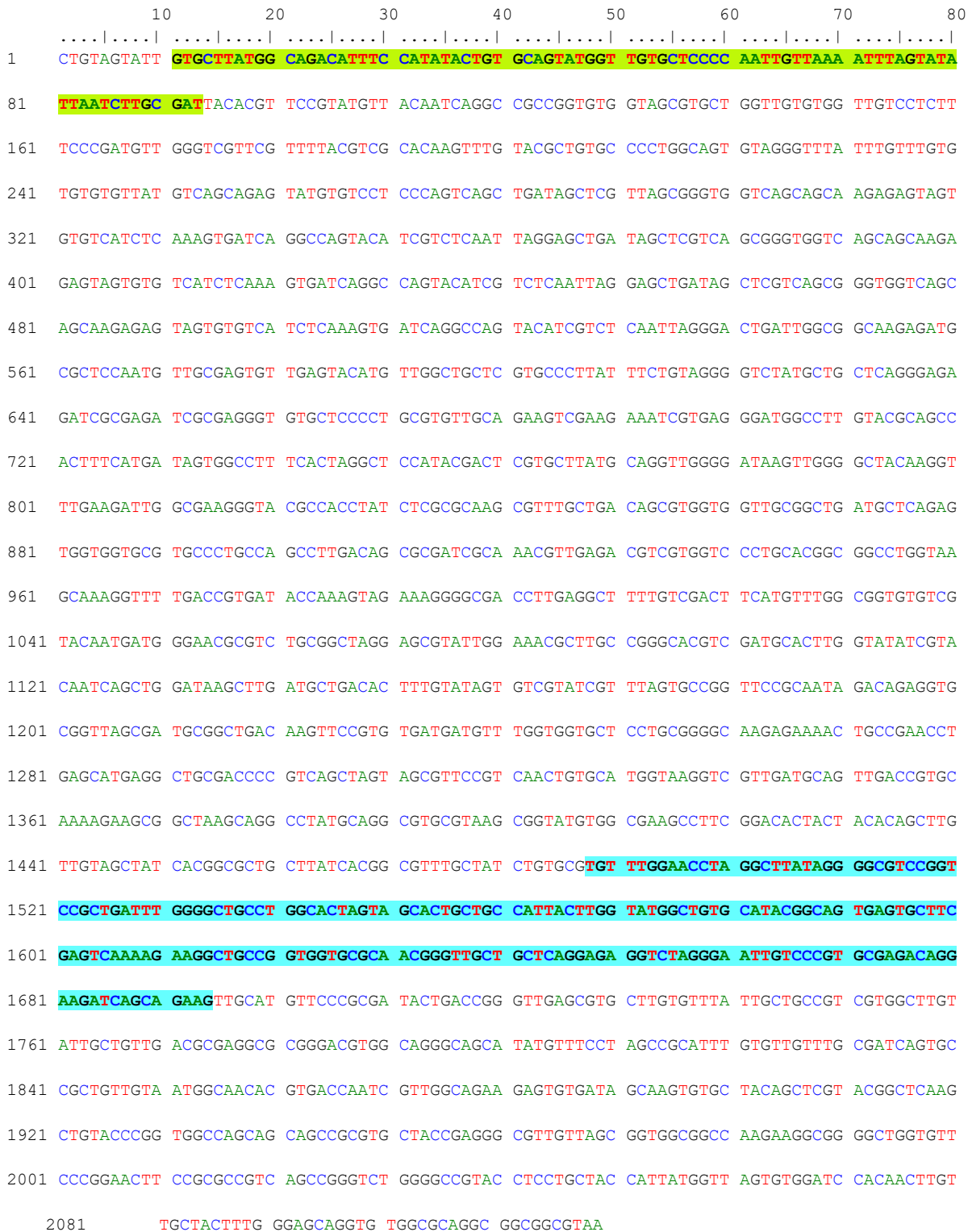


**Figura 11.** PCR *in silico*. Realizada para los nueve genomas del género *Anaplasma* en el servidor <http://insilico.ehu.eus/>. A) Fragmento de 83 pb con los oligonucleótidos *Fam* y *Ram*. B) Fragmento de 207 pb con los oligonucleótidos *msp1aF* y *msp1aR*.

Se confirmó de forma teórica que los oligonucleótidos son específicos para *A. marginale*, en la figura 11a se observó una sola banda de 83 pb solo en los genomas correspondientes a esta bacteria. Asimismo, en la figura 11b se muestra la simulación correspondiente a los oligonucleótidos diseñados por Kovalchuk *et. al* (2020), *msp1aF* y *msp1aR* donde se visualizó una banda de 207 pb, tal como lo indican Kovalchuk *et. al* (2020), pues ellos también recurrieron a un análisis *in silico*, incluyendo otras especies como *A. centrale* y *A. ovis* (Kovalchuk *et al.*, 2020).

Aunado a esto, se tomó la secuencia del gen *msp1α* correspondiente a la cepa *A. marginale St. Maries* y se ubicaron las regiones amplificadas por ambos pares de oligonucleótidos (Figura 12),

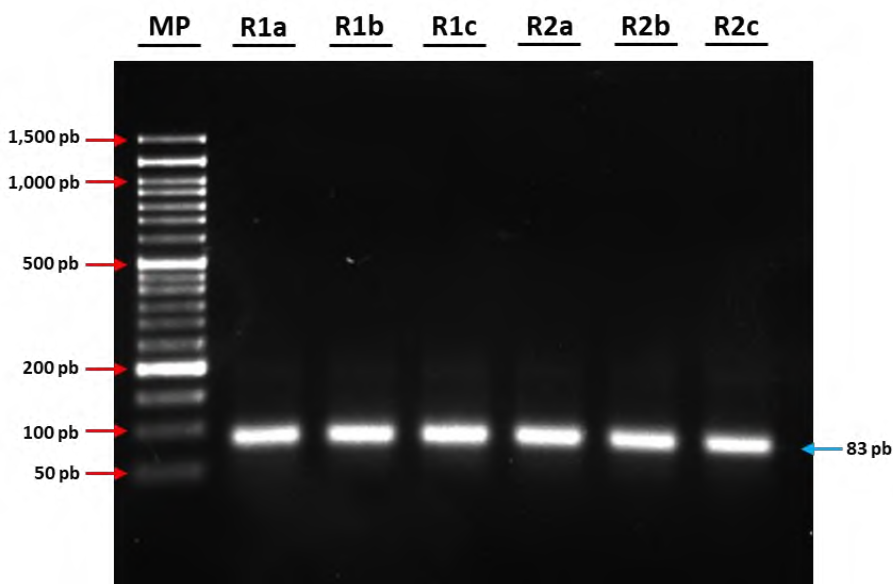
donde en azul se muestra el fragmento amplificado por los oligonucleótidos *Fam* y *Ram*, mientras que en verde se observa el fragmento amplificado por los oligonucleótidos *msp1aF* y *msp1aR*.



**Figura 12.** Secuencia del gen *msp1α* correspondiente a la cepa *A. marginale* *St. Maries*. El fragmento de 83 pb amplificado por los oligonucleótidos *Fam* y *Ram* en color verde, el fragmento de 207 pb amplificado por los oligonucleótidos *msp1aF* y *msp1aR* en color azul.

### 7.3 Diseño del control sintético

Se llevó a cabo la técnica de PCR de fusión y se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 3 % a 110 Volts por 50 minutos, al terminar el corrimiento fue teñido por 5 minutos con bromuro de etidio, para después visualizarse en un sistema de fotodocumentación.



**Figura 13.** Producto de amplificación de la fusión de los fragmentos Cam 1 – Cam 2. Se observó que en ambas repeticiones las bandas corresponden al tamaño esperado de 83 pb.

En el gel se observaron bandas de aproximadamente 83 pb en todas las repeticiones, comparadas con el marcador de peso NZY DNA Ladder VI (nyztech genes & enzymes) en el primer pozo de la figura 13.

Las muestras obtenidas se purificaron y cuantificaron en un Nanodrop 2000c, donde se obtuvieron las siguientes concentraciones (Tabla 14): Se seleccionó la muestra R1 como fragmento a insertar en el vector pGEM – T easy.

**Tabla 14.** Mediciones obtenidas en Nanodrop de los fragmentos obtenidos de la PCR de fusión

Muestra	Ac. nucleicos (ng/ $\mu$ L)	A 260	A 280	260/280	260/230
R1	52.6	1.052	0.529	1.99	0.11
R2	34.7	0.694	0.344	2.02	0.15

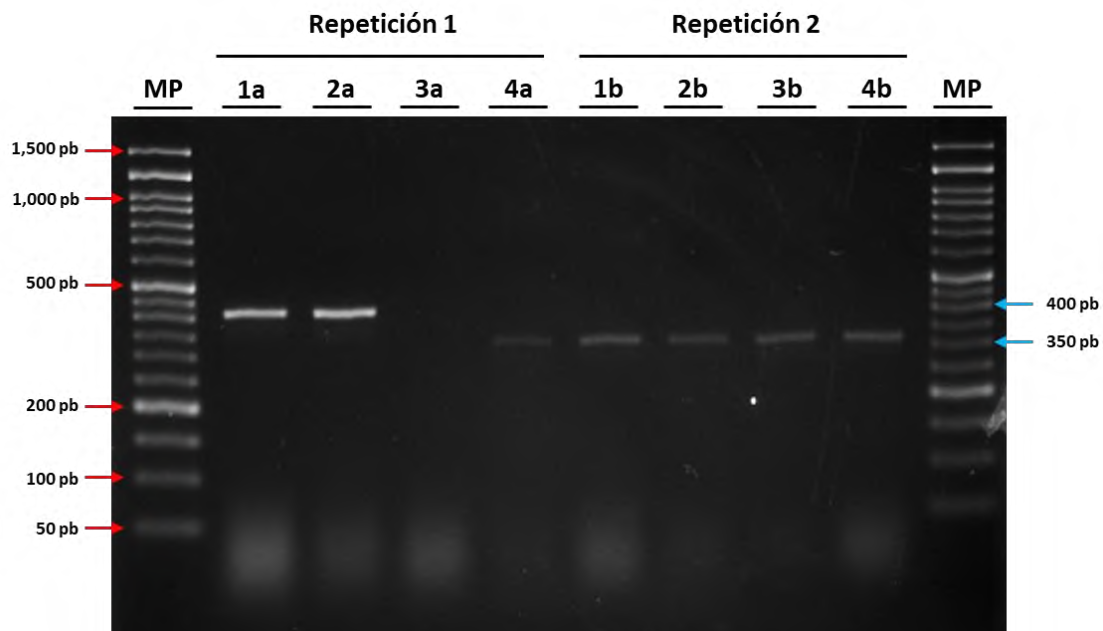
#### 7.4 Clonación en *E. coli*

El fragmento R1 purificado, se ligó en el vector pGEM – T easy y se transformaron bacterias *E. coli* químicamente competentes.

De las cajas sembradas, se seleccionaron ocho colonias blancas y se realizó con ellas una PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos M13 directo y M13 reverso para verificar que el inserto se encontrara en el plásmido de las bacterias.

Las bandas esperadas eran de 300 a 320 pb debido a que se suma la región flanqueada por los oligonucleótidos M13 sin el fragmento de interés tiene 231 pb más la del fragmento del gen *msp1 $\alpha$*  de 83 pb.

En la figura 14, siete de las ocho colonias presentaron una banda, de la primera repetición los productos 1a y 2a presentaron una banda de aproximadamente 400 pb, el producto 3a no presentó banda y el cuarto tiene una banda en aproximadamente 350 pb mientras que, las cuatro colonias seleccionadas en la segunda repetición presentan bandas en aproximadamente 350 pb.



**Figura 14.** Productos de amplificación de PCR de colonia de la clonación del fragmento *Cam T*. Realizada en células de *E. coli* (One Shot Top 10), amplificada con oligonucleótidos M13. Gel de agarosa al 3 % en TAE 1X.

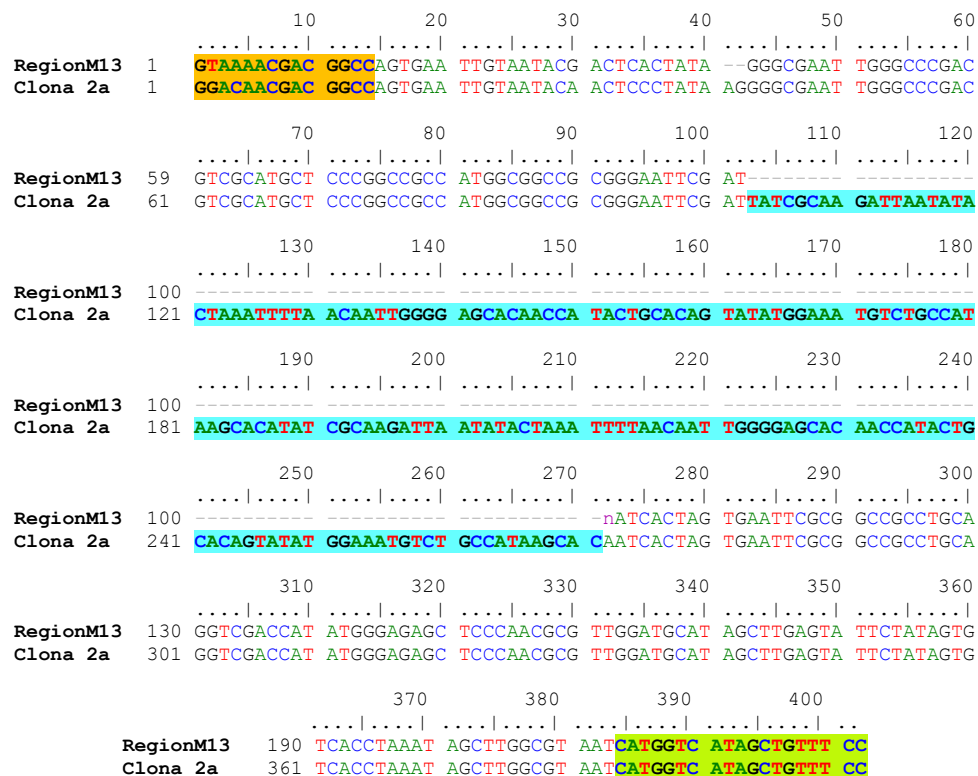
Se seleccionaron la colonia 2 de la primera repetición (2a) y la colonia 4 de la segunda (4b), y se cultivaron por 12 horas en medio LB líquido adicionado con ampicilina. Pasado ese tiempo, se

realizó la extracción del plásmido con el método de lisis alcalina. Se verificó la calidad de la extracción del plásmido con la medición de las muestras en un Nanodrop:

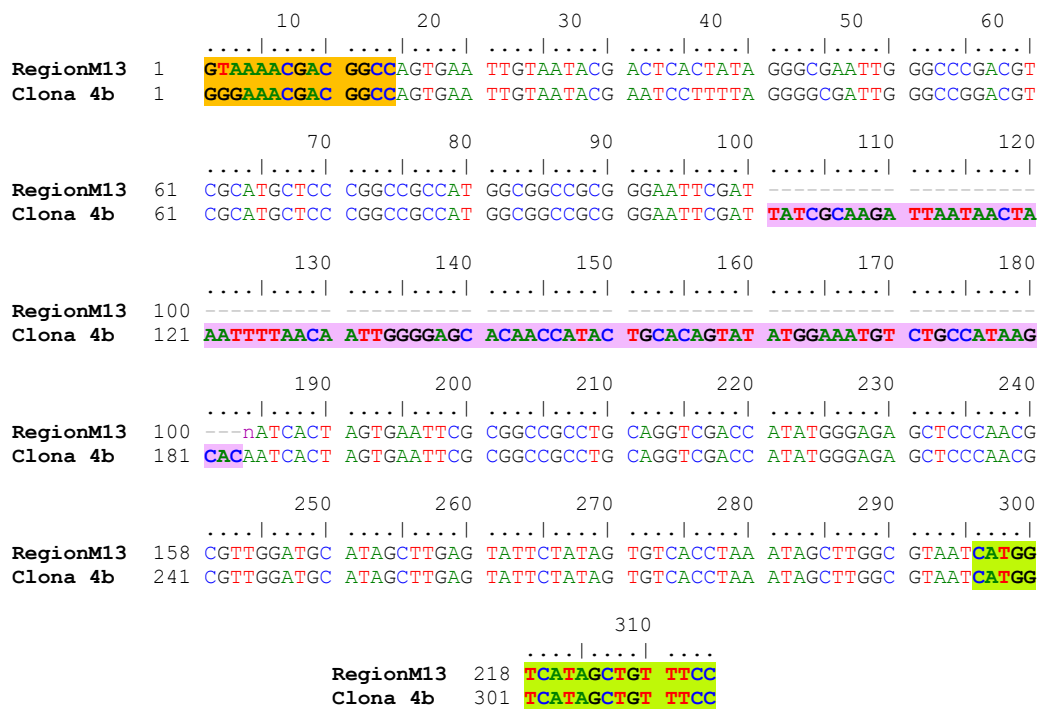
**Tabla 15.** Mediciones obtenidas en Nanodrop de la extracción del plásmido obtenido de *E. coli*

Muestra	Ac. nucleicos (ng/ $\mu$ L)	A 260	A 280	260/280	260/230
Clona 2a	9,765.8	195.316	93.404	2.09	2.23
Clona 4b	6,841.7	136.835	70.369	1.94	2.01

Ambas muestras se enviaron al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del CINVESTAV – Irapuato (LANGEBIO), para ser secuenciadas mediante la técnica de Secuenciación capilar de Sanger, por ambos extremos.



**Figura 15.** Alineamiento de la secuencia de la clona 2a con la región M13 del plásmido p GEM - T easy. En naranja y verde se resaltan los oligonucleótidos directo y reverso de la región M13, en azul el inserto.



**Figura 16.** Alineamiento de la secuencia de la clona 4b con la región M13 del plásmido p GEM - T easy. En naranja y verde se resaltan los oligonucleótidos directo y reverso de la región M13, en morado el inserto.

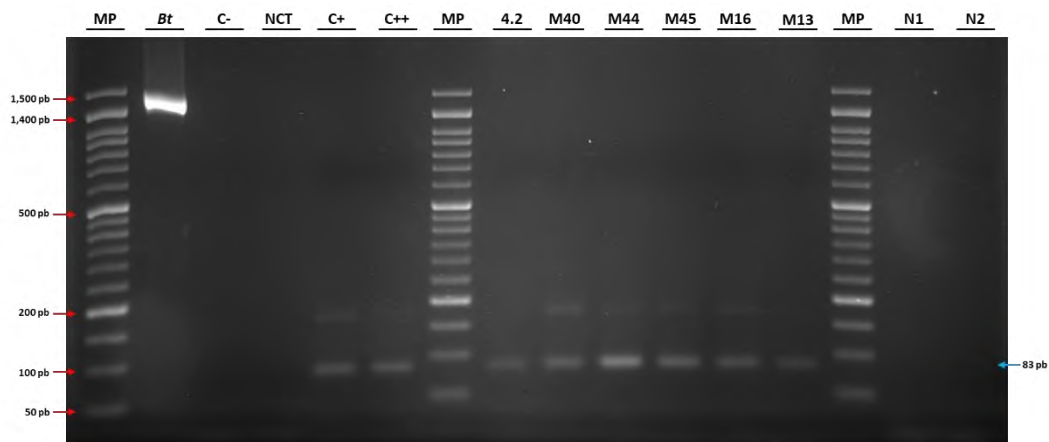
Las secuencias recibidas de la secuenciación, se alinearon en el programa Mega X y se buscó en ellas el fragmento Cam T de 83 pb que se esperaba de la PCR de fusión, se observó que la clona 2a no contenía el fragmento (Figura 15) ya que se unió en forma desordenada y sin algún patrón parecido al fragmento del gen *msp1α*, sin embargo, la clona 4b presentó el fragmento Cam T en el orden y tamaño esperado, que corresponde a la construcción realizada teóricamente de la región elegida del gen seleccionado por lo tanto, esta muestra fue escogida como control sintético positivo para el diagnóstico (Figura 16).

### 7.5 Amplificación de muestras

Con el fin de evaluar la presencia o ausencia de *A. marginale* en los bovinos muestreados, se realizó la amplificación de las muestras utilizando ambos pares de oligonucleótidos (*Fam* y *Ram*; *msp1αF* y *msp1αR*).

En la figura 17, puede observarse el gel después de la electroforesis. Los pozos 1, 7 y 14 corresponden al marcador de peso. En el segundo pozo (*Bt*), la banda de 1,450 pb corresponde a la reacción realizada con los oligonucleótidos universales 27F y 1492R propuestos por Heuer *et al.* (1997) y ADN de *Bacillus thuringiensis* como molde, a partir del tercer pozo, las reacciones de

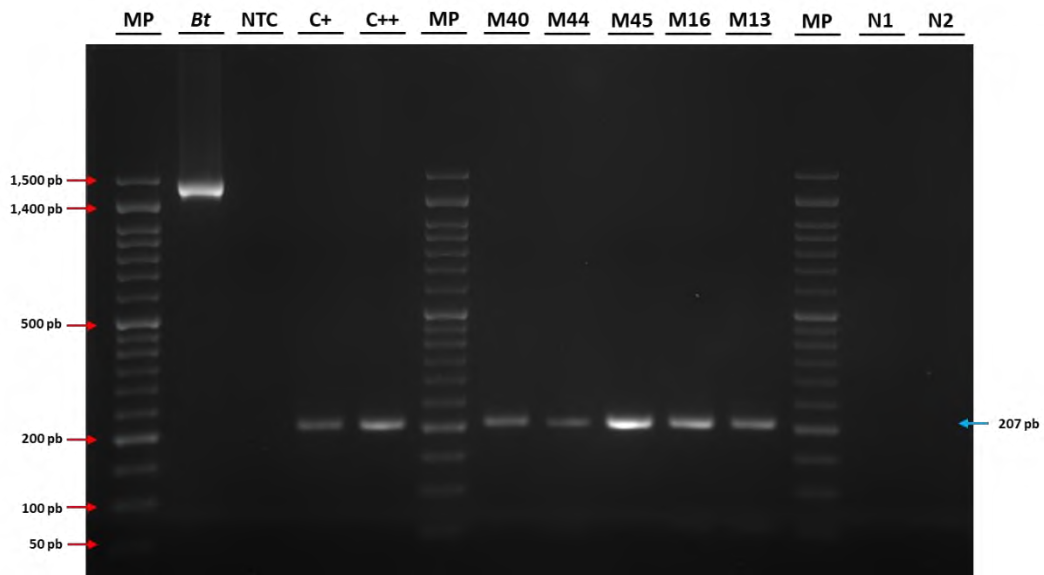
PCR se realizaron con los oligonucleótidos *Fam* y *Ram*. El pozo C- es el resultado de una reacción con ADN del control negativo, en el NTC se reemplazó el ADN molde por agua libre de nucleasas, los pozos C+ y C++ son las muestras de los equinos 3572 y 3412, respectivamente, y son controles positivos donados por el Laboratorio del Centro de Salud Animal de la Unión Ganadera Regional del Norte de Oaxaca. La banda en el pozo nombrado 4.2 es la reacción de PCR realizada con el plásmido de la clona obtenida anteriormente, la muestra M44 y M45 corresponden a un semental y una hembra de la localidad de San Juan Río Manso, M40 es una muestra otorgada por el Centro de Salud Animal correspondiente a un bovino diagnosticado por medio de un frotis sanguíneo, la muestra M16 es un semental de un hato en San Lucas Ojitlán, , por último, la muestra M13 pertenece al bovino marcado con el código de un rancho muestreado en Zacate Colorado. Los pozos N1 y N2 corresponden a animales negativos para anaplasmosis, sin embargo, en la extracción se encontró ADN bacteriano y de acuerdo con la sintomatología se puede tratar de una septicemia.



**Figura 17.** Productos de la amplificación del fragmento de 83 pb del gen *msp1α*. Se utilizaron los oligonucleótidos *Fam* y *Ram*. Electroforesis en gel de agarosa al 3 % con TAE 1X.

En la figura 18, se puede observar el gel obtenido donde se cargaron las muestras amplificadas con los oligonucleótidos *msp1αF* y *msp1αR*, realizado con las mismas condiciones de tiempo y voltaje.

Los tres pozos nombrados como MP corresponden al marcador de peso. Las muestras observadas son las mismas amplificadas con los oligonucleótidos *Fam* y *Ram*, la muestra 4b que corresponde al plásmido con la construcción de 83 pb que se clonó en *E. coli*, no fue sometida a esta PCR, ya que los oligonucleótidos no corresponden al fragmento flanqueado.



**Figura 18.** Productos de la amplificación del fragmento de 83 pb del gen *msp1α*. Se utilizaron los oligonucleótidos *msp1aF* y *msp1aR*. Electroforesis en gel de agarosa al 3 % con TAE 1X.

## 7.6 Secuenciación

De las muestras positivas obtenidas, se purificaron sus productos de PCR y enviaron a secuenciar seis muestras al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del CINVESTAV-Irapuato (LANGEBIO), se seleccionó un control positivo (Equino 3572) y cinco muestras positivas.

		10	20	30	40	50	60
		..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
<i>msp1a</i>	1	AGTTTGGAAC	CTAGGCTTAT	AGGGGCGTCC	GGTCCGCTGA	TT-TG-GGG-	CTG-CCTGGC
C+	1	-----	-----	---GAAAAC	GAAGTGCAGA	TCATGCAGG-	CTGACCTGGC
M40	1	-----	-----	---GCAGAGG	GAAGTGCAGA	CA-TGCAGG-	CTGACCTGGC
M44	1	-----	-----	---GGAAC	GGA-TGCATA	CT-TGCAGGA	CTGACCTGGC
M45	1	-----	-----	---AGGAC	TGATCGC-GA	TT---GGGG-	CTG-CCTGGC
M16	1	-----	-----	---CAAGAC	GGATCGCAGA	CT-TGCAGG-	CTGACCTGGC
M13	1	-----	-----	---CAGGTCA	GGGTCGCAGA	TC-TGCAGG-	CTGACCTGGC

		70	80	90	100	110	120
		..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
<i>msp1a</i>	57	ACTAGTAGCA	CTGCTGCCAT	TACTTGGTAT	GGCTGTGCAT	ACGGCAGTGA	GTGCTTCGAG
C+	36	ACTAGTAGCA	CTGCTGCCAT	TACTTGGTAT	GGCTGTGCAT	ACGGCAGTGA	GTGCTTCGAG
M40	36	ACTAGTAGCA	CTGCTGCCAT	TACTTGGTAT	GGCTGTGCAT	ACGGCAGTGA	GTGCTTCGAG
M44	34	ACTAGTAGCA	CTGCTGCCAT	TACTTGGTAT	GGCTGTGCAT	ACGGCAGTGA	GTGCTTCGAG
M45	30	ACTAGTAGCA	CTGCTGCCAT	TACTTGGTAT	GGCTGTGCAT	ACGGCAGTGA	GTGCTTCGAG
M16	35	ACTAGTAGCA	CTGCTGCCAT	TACTTGGTAT	GGCTGTGCAT	ACGGCAGTGA	GTGCTTCGAG
M13	36	ACTAGTAGCA	CTGCTGCCAT	TACTTGGTAT	GGCTGTGCAT	ACGGCAGTGA	GTGCTTCGAG

		130	140	150	160	170	180
		..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
<i>msp1a</i>	117	TCAAAAAGAAG	GCTGCCGGTG	GTGCGCAACG	GGTTGCTGCT	CAGGAGAGGT	CTAGGGAATT
C+	96	TCAAAAAGAAG	GCTGCCGGTG	GTGCGCAACG	GGTTGCTGCT	CAGGAGAGGT	CTAGGGAATT
M40	96	TCAAAAAGAAG	GCTGCCGGTG	GTGCGCAACG	GGTTGCTGCT	CAGGAGAGGT	CTAGGGAATT
M44	94	TCAAAAAGAAG	GCTGCCGGTG	GTGCGCAACG	GGTTGCTGCT	CAGGAGAGGT	CTAGGGAATT
M45	90	TCAAAAAGAAG	GCTGCCGGTG	GTGCGCAACG	GGTTGCTGCT	CAGGAGAGGT	CTAGGGAATT
M16	95	TCAAAAAGAAG	GCTGCCGGTG	GTGCGCAACG	GGTTGCTGCT	CAGGAGAGGT	CTAGGGAATT
M13	96	TCAAAAAGAAG	GCTGCCGGTG	GTGCGCAACG	GGTTGCTGCT	CAGGAGAGGT	CTAGGGAATT

```

                190          200          210
                .....|.....| .....|.....| .....|.....| .
msp1a  177  GTCCCGTGCG AGACAGGAAG ATCAGCAGAA G
C+      156  GTCCCGTGCG AGACAGGAAG ATCAGCAGAA G
M40     156  GTCCCGTGCG AGACAGGAAG ATCAGCAGAA A
M44     154  GTCCCGTGCG AGACAGGAAG ATCAGCAGAA G
M45     150  GTCCCGTGCG AGACAGGAAG ATCAGCAGAA G
M16     155  GTCCCGTGCG AGACAGGAAG ATCAGCAGAA G
M13     156  GTCCCGTGCG AGACAGGAAG ATCAGCAGAA G

```

**Figura 19.** Alineamiento de la secuencia del gen *msp1a* con las secuencias obtenidas de la secuenciación. En verde, se resalta el oligonucleótido *msp1aF* y en amarillo el *msp1aR*; en azul se muestra la base donde comienzan a coincidir las secuencias.

Mediante los programas Mega X y BioEdit, se realizó un alineamiento múltiple con los resultados de la secuenciación (Figura 19), se compararon las secuencias recibidas entre sí y a su vez con la secuencia del gen *msp1α* obtenida del NCBI (NC\_012026.1 de 483, 108-484, 670 pb).

Se observó que todas las muestras coinciden al 100 % con la secuencia de referencia a partir de los 55 pb, esto debido a que la secuenciación se realizó de un solo extremo y al inicio de la secuencia, donde se encontraría el oligonucleótido Directo (*msp1aF*) se obtuvo una señal inespecífica conocida como ruido.

Se realizó un BLAST a cada una de las secuencias alineadas para verificar los datos de la secuenciación y encontrar el porcentaje de identidad con el gen *msp1α* de *A. marginale*.

En la tabla 16, se resumieron los alineamientos de cada uno de los resultados del BLAST con las secuencias reportadas en el NCBI. Se realizó con todos los microorganismos posibles (Anexo 8) sin embargo, para esta tabla se tomaron en cuenta las principales cepas reportadas, *A. Marginale str. Dawn* (CP006847.1), *A. marginale str. Gypsy Plains* (CP006846.1), *A. marginale str. Florida* (CP001079.1), *A. marginale Oklahoma* (AY010247.1) y *A. marginale str. St. Maries* (CP000030.1).

**Tabla 16.** Resumen del alineamiento de los resultados obtenidos de la secuenciación con las secuencias reportadas en el NCBI.

Muestra	Max score	Total score	Query Cover	E value	Percent Identity
C+	294	294	87 %	4e-75	99.39 %
M40	292	292	87 %	1e-74	99.38 %
M44	291	291	89 %	5e-74	98.78 %
M45	307	307	95 %	5e-79	98.84 %
M16	294	294	88 %	4e-75	99.39 %
M13	294	294	95 %	4e-75	96.65 %

Todas las muestras superaron el 99.38 % de identidad con las secuencias de *A. marginale* reportadas en el NCBI, lo cual indica que la bacteria está presente en la región.

En el caso de las muestras de los equinos, donde se refirieron cuadros clínicos severos por parte del veterinario encargado del Centro de Salud Animal, se comprobó que ambos casos son positivos, sin embargo, algunos reportes de anaplasmosis en equinos solo mencionan que se han detectado *Anaplasma phagocytophylum* y *Anaplasma spp.* por el método de tinción de Giemsa (Masgo *et al.*, 2020), y diagnóstico por PCR donde no se especifica la especie detectada (Abdullah *et al.*, 2022).

En los estudios realizados con pruebas serológicas por Rodríguez *et al.* (2009), se menciona que más del 50 % de animales fueron positivos a anaplasmosis, de forma similar, en el trabajo de Kovalchuk *et al.* (2020) donde se utilizó la técnica de PCR, se encontraron el 53 % de animales con anaplasmosis, mientras que en el presente trabajo se encontró que 10 % de los bovinos muestreados en la Cuenca del Papaloapan fueron positivos.

Mediante la técnica de PCR basa en el gen *mSP5*, Bacanelli *et. al* (2014) detectaron *A. marginale* y *A. ovis* de forma cruzada. Asimismo, Primo (2019) comprobó la presencia de *A. centrale* y *A. marginale*, utilizando la técnica de c-ELISA con la proteína MSP5. Estos resultados pueden deberse a que este gen se presenta de forma conservada en distintas especies de *Anaplasma*, por lo que es un indicador de anaplasmosis (Primo *et al.*, 2019), pero no es útil para un diagnóstico específico.

El método de diagnóstico aplicado con ambos pares de oligonucleótidos *mSP1aF - mSP1aR* propuestos por Kovalchuk *et al.* (2020) y Fam – Ram, permitieron la identificación específica de *A. marginale* debido a que el gen *mSP1a*, en el que se basó el diagnóstico, solo tiene entre 31 y 36 % de similitud entre las distintas *Anaplasma spp.* (Kovalchuk *et al.*, 2020).

## 8. CONCLUSIONES

- Se amplificó el ADN de 45 muestras del total de bovinos muestreados, a pesar de que en todas se extrajo ADN bacteriano.
- La PCR de fusión fue útil para la obtención del fragmento *Cam T*, que fue clonado en *E. coli* y utilizado como control positivo.
- El diagnóstico mediante PCR fue capaz de identificar el gen *msp1α* específicamente de *A. marginale* en muestras de sangre tomadas en la Cuenca del Papaloapan.
- Nuestro método fue capaz de diagnosticar a dos equinos infectados de *A. marginale*, indicando que la bacteria también puede infectar a otros animales domésticos.
- La secuenciación confirmó que el fragmento amplificado tiene más del 99.3 % de identidad con las secuencias reportadas en la Base de datos del NCBI.

## 9. PERSPECTIVAS

- Incrementar la cantidad de muestreo, y analizar y secuenciar todas aquellas que resulten positivas, para tener una mayor validación del método.
- Amplificar el gen *msp1 $\alpha$*  completo con el fin de identificar las cepas de *A. marginale* presentes en la región.
- Utilizar una técnica que ofrezca mayor sensibilidad como la qPCR para detectar la enfermedad en estados más tempranos y verificar si las muestras negativas obtenidas mediante PCR no provienen de animales contagiados recientemente.
- Evaluar otras especies de animales de interés zootécnico que puedan compartir el sistema de crianza, así como los vectores de transmisión como *R. microplus*.

## 10. REFERENCIAS

- Abdullah, H. H. A. M., Aboelsoued, D., Farag, T. K., Abdel-Shafy, S., Abdel Megeed, K. N., Parola, P., Raoult, D., & Mediannikov, O. (2022). Molecular characterization of some equine vector-borne diseases and associated arthropods in Egypt. *Acta Tropica*, *227*, 106274. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106274>
- Almazán, C. (2018). Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. *Frontiers in Bioscience*, *23*(8), 1535–1551. <https://doi.org/10.2741/4659>
- Almazán, C., Aguilar, G., Rodríguez, S., Mosqueda, J., & Pérez De León, A. (2018). Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. *Frontiers in Bioscience*, *23*(8), 1535–1551. <https://doi.org/10.2741/4659>
- Amaro-Estrada, I., García-Ortiz, M. A., Preciado de la Torre, J. F., Rojas-Ramírez, E. E., Hernández-Ortiz, R., Alpírez-Mendoza, F., & Rodríguez-Camarillo, S. D. (2020). Transmission of *Anaplasma marginale* by unfed *Rhipicephalus microplus* tick larvae under experimental conditions. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, *11*(1), 116–131. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i1.5018>
- Arce, C., Aranda Ibáñez, E. M., Osorio Arce, M. M., González Garduño, R., Díaz Rivera, P., & Hinojosa Cuellar, J. A. (2017). Evaluación de parámetros productivos y reproductivos en un hato de doble propósito en Tabasco, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, *8*(1), 83. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i1.4347>
- Aubry, P., & Geale, D. W. (2011). A Review of Bovine Anaplasmosis: Review of Bovine Anaplasmosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, *58*(1), 1–30. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x>

- Bacanelli, G. M., Ramos, C. A. N., & Araújo, F. R. (2014). Molecular diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle: Quantitative evaluation of a real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) based on msp5 gene. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34(1), 29–33. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000100005>
- Battilani, M., De Arcangeli, S., Balboni, A., & Dondi, F. (2017). Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. *Infection, Genetics and Evolution*, 49, 195–211. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.01.021>
- Benavides, E., Romero Prada, J., & Villamil Jiménez, L. C. (2016). *Las garrapatas del ganado bovino y los agentes de enfermedad que transmiten en escenario epidemiológicos de cambio climático: Guía para el manejo de garrapatas y adaptación al cambio climático*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).
- Bikandi, J., Millán, R. S., Rementeria, A., & Garaizar, J. (2004). *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP–PCR and endonuclease restriction. *Bioinformatics*, 20(5), 798–799. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg491>
- Brayton, K. A., Kappmeyer, L. S., Herndon, D. R., Dark, M. J., Tibbals, D. L., Palmer, G. H., McGuire, T. C., & Knowles, D. P. (2005). Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(3), 844–849. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406656102>
- CABI. (2023). *Anaplasma marginale*—CABI Compendium [dataset]. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.94684>
- Corona, B. (2004). *Anaplasmosis bovina (bovine anaplasmosis)*.

- Cortés-López, N. G., Luna-Palomera, C., Meza-Herrera, C. A., & Abad-Zavaleta, J. (2012). *Allelic and genotypic frequency of kappa casein gene in double purpose cattle.*
- Curtis, A. K., Reif, K. E., Kleinhenz, M. D., Martin, M. S., Skinner, B., Kelly, S. M., Jones, D. E., Schaut, R. G., Reppert, E. J., Montgomery, S. R., Narasimhan, B., Anantatat, T., Jaber-Douraki, M., & Coetzee, J. F. (2020). Corrigendum to: Development of a subcutaneous ear implant to deliver an anaplasmosis vaccine to dairy steers. *Journal of Animal Science*, *98*(11), skaa316. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa316>
- De León, A. P., & Rubio, G. (2021). Respuesta serológica y clínica a la hemovacuna congelada de babesia y anaplasma en bovinos adultos en un predio comercial.
- Díaz, C., Molina, C., Molina, J., Macías, E., & Santander, E. (2003). *Manual de enfermedades infecciosas en el ganado bovino de la zona central del Litoral del Ecuador.* INIAP.
- Domínguez, D. I., Torres, F., & Rosario-Cruz, R. (2016). Evaluación económica del control de garrapatas *Rhipicephalus microplus* en México / Economic evaluation of tick (*Rhipicephalus microplus*) control in Mexico. *CIBA Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, *5*(9), 43. <https://doi.org/10.23913/ciba.v5i9.49>
- Dos Santos, P. N., De Almeida Valim, J. R., Matos, P. C. M., Da Silva, J. B., & Da Fonseca, A. H. (2019). Molecular characterization of the msp1  $\alpha$  AmRio1 strain of *Anaplasma marginale* in calves and experimentally infected ticks. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, *16*, 100268. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100268>
- Fernández, D. (2018). *Prevalencia de anaplasmosis bovina en los cantones Río Verde, Eloy Alfaro y Quinindé de la provincia de Esmeraldas.*

- Galliazzi, O., & Peirano, M. I. (2020). *Reconstrucción histórica del control y erradicación de la garrapata Rhipicephalus microplus y de la tristeza parasitaria en Uruguay*. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/28874>
- Gonçalves, R. C., Chiacchio, S. B., Borges, A. S., Amorim, R. M., Bandarra, Ê. P., & Takahira, R. K. (2005). *ANAPLASMOSE NEONATAL EM BEZERRO*.
- Guarnizo, T. R. M., Alvarez, D. O., Díaz-Sánchez, A. A., Cabezas-Cruz, A., Gutiérrez, L. Z., Marrero, S. M., & Corona-González, B. (2020). Epidemiology and genetic diversity of *Anaplasma marginale* in Zamora-Chinchipe, Ecuador. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *11*(3), 101380. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101380>
- Henker, L. C., Lorenzetti, M. P., Fagundes-Moreira, R., Dalto, A. G. C., Sonne, L., Driemeier, D., Soares, J. F., & Pavarini, S. P. (2020). Bovine abortion, stillbirth and neonatal death associated with *Babesia bovis* and *Anaplasma sp.* Infections in southern Brazil. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *11*(4), 101443. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101443>
- Junsiri, W., Watthanadirek, A., Poolsawat, N., Kaewmongkol, S., Jittapalapong, S., Chawengkirttikul, R., & Anuracpreeda, P. (2020). Molecular detection and genetic diversity of *Anaplasma marginale* based on the major surface protein genes in Thailand. *Acta Tropica*, *205*, 105338. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105338>
- Kocan, K. M., De La Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., & Ewing, S. A. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, *167*(2–4), 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.012>
- Kovalchuk, S. N., Babii, A. V., & Arkhipova, A. L. (2020). Real-time PCR assay with an endogenous internal amplification control for detection and quantification of *Anaplasma marginale* in

- bovine blood. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 11(2), 101334.  
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101334>
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology*, 8.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>
- Masgo, D., Hoyos S., L., Li E., O., Gómez P., L., Ramires V., L., Álvarez M., G., Cervantes S., M., & Vásquez Y., Á. (2020). Detección hematológica de *Anaplasma phagocytophilum* en caballos de la provincia de Chiclayo, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(4), 1670–1677. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i4.17166>
- Nasreldin, N., Ewida, R. M., Hamdon, H., & Elnaker, Y. F. (2020). Molecular diagnosis and biochemical studies of tick-borne diseases (anaplasmosis and babesiosis) in Aberdeen Angus Cattle in New Valley, Egypt. *Veterinary World*, 13(9), 1884–1891.  
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1884-1891>
- Ocampo, R. J., Camarillo, S. D. R., Cruz, R. R., & Vega, L. E. O. (2008). *Anaplasma marginale*: Análisis de las secuencias del fragmento variable del gen msp1 $\alpha$  y del gen msp4 de cuatro nuevas cepas mexicanas. *Téc Pecu Méx*, 69–78.
- Ozubek, S., Bastos, R. G., Alzan, H. F., Inci, A., Aktas, M., & Suarez, C. E. (2020). Bovine Babesiosis in Turkey: Impact, Current Gaps, and Opportunities for Intervention. *Pathogens*, 9(12), 1041. <https://doi.org/10.3390/pathogens9121041>
- Parvizi, O., El-Adawy, H., Melzer, F., Roesler, U., Neubauer, H., & Mertens-Scholz, K. (2020). Seroprevalence and Molecular Detection of Bovine Anaplasmosis in Egypt. *Pathogens*, 9(1), 64. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010064>

- Peña-Castro, J. M., Gregorio-Ramírez, O., & Barrera-Figueroa, B. E. (2013). Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: Historia, fundamentos y perspectivas. *Educación Química*, 24(2), 237–246. [https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(13\)72468-6](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(13)72468-6)
- Primo, M. E., Thompson, C. S., Valentini, B. S., Sarli, M., Novoa, M. B., Mangold, A. J., & De Echaide, S. T. (2019). Development of a novel fusion protein with *Anaplasma marginale* and A. centrale MSP5 improved performance of Anaplasma antibody detection by cELISA in infected and vaccinated cattle. *PLOS ONE*, 14(1), e0211149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211149>
- Rangel, J., Espinosa, J. A., de Pablos-Heredero, C., Velez, A., & Rivas, J. (2017). *Adopción de innovaciones y prácticas organizativas de manejo, alimentación y reproducción en pequeñas unidades de producción de vacunos de doble propósito en México*. XXVII(1), 44–55.
- Rangel, J., Perea, J., De-Pablos-Heredero, C., Espinosa-García, J. A., Mujica, P. T., Feijoo, M., Barba, C., & García, A. (2020). Structural and Technological Characterization of Tropical Smallholder Farms of Dual-Purpose Cattle in Mexico. *Animals*, 10(1), 86. <https://doi.org/10.3390/ani10010086>
- Rar, V., Tkachev, S., & Tikunova, N. (2021). Genetic diversity of Anaplasma bacteria: Twenty years later. *Infection, Genetics and Evolution*, 91, 104833. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104833>
- Rodríguez, S. D., García Ortiz, M. Á., Jiménez Ocampo, R., & Vega Y Murguía, C. A. (2009). Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in Mexico.

*Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1092–1101.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.09.007>

Rodríguez-Vivas, R. I., Jonsson, N. N., & Bhushan, C. (2018). Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitology Research*, 117(1), 3–29. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5677-6>

Ruíz-Guevara, C., De León-González, F., Soriano-Robles, R., Pérez-Carrera, A. L., & García-Hernández, L. A. (2018). Altitude effects on technology and productivity of small bovine farms (milk meat) in Veracruz (Gulf of Mexico). *Tropical Animal Health and Production*, 50(3), 469–476. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1451-0>

SIAP. (2022a). *Producción, precio, valor y peso de ganado en pie*. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). [nube.siap.gob.mx/cierre\\_pecuario/](http://nube.siap.gob.mx/cierre_pecuario/)

SIAP. (2022b). *Producción, precio y valor de leche de bovino*. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). [nube.siap.gob.mx/cierre\\_pecuario/](http://nube.siap.gob.mx/cierre_pecuario/)

Silva, T. F., Alves-Sobrinho, A. V., Lima, L. F. S. D., Ziemniczak, H. M., Ferraz, H. T., Lopes, D. T., Silva, V. L. D. D., Braga, Í. A., Saturnino, K. C., & Ramos, D. G. D. S. (2021). Tristeza parasitária bovina: Revisão. *Research, Society and Development*, 10(1), e15410111631. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i1.11631>

Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., & Vargas-Albores, F. (2015). The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*, 41(4), 297–313. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>

## ANEXOS

### Anexo 1. Preparación de soluciones

Las soluciones descritas son las utilizadas en la electroforesis en gel de agarosa.

Deben ser etiquetadas con: nombre de la solución, concentración y fecha de preparación.

#### 1.1 EDTA (0.5 M)

Cantidad	Reactivo
14.61 g	EDTA
No definida	NaOH (Grageas) *

#### Procedimiento:

Pesar la cantidad indicada de EDTA.

Agregar 50 mL de agua destilada al EDTA y medir el pH, la solución es ácida, por lo que es necesario agregar grageas de NaOH para aumentar el pH, esto se realiza hasta llegar a 8.0.

La solución debe mantenerse en agitación constante y puede calentarse ligeramente para facilitar la disolución. Después de tener el pH ideal se afora a 100 mL y por último se almacena en un frasco en el refrigerador.

#### 1.2 TAE 10 X

Cantidad	Reactivo
48.8 g	Tris Base
20 mL	EDTA (0.5 M)
11.42 mL	Ácido acético glacial

#### Procedimiento:

Medir y pesar los reactivos con ayuda de una probeta y una balanza.

Añadir todos los reactivos de forma lenta y aforarlos a 1 L, mezclar suavemente. Por último, almacenar la solución en un frasco, forrarlo con aluminio y etiquetar. Se debe mantener en el refrigerador.

### 1.3 Bromuro de etidio

Para preparar 10 mL de solución stock (10 mg/mL).

Colocar papel húmedo en una balanza analítica para evitar contaminaciones. Con ayuda de una espátula, pesar 100 mg de bromuro de etidio y colocarlos en un tubo Falcon de 10 mL, agregar 10 mL de agua destilada con una pipeta. Por último, forrar el tubo con dos capas de papel aluminio, etiquetar y almacenar en un lugar oscuro.

Para preparar 100 mL de bromuro de etidio para tinción se necesita una concentración de 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Tomar 10  $\mu\text{L}$  de la solución stock.

Se sugiere utilizar doble par de guantes, cubrebocas y lentes de seguridad.

Cantidad	Materiales y reactivos
1	Balanza analítica
1	Parrilla de agitación y calentamiento
1	Agitador magnético
1	Potenciómetro
1	Pipeta 10 mL
1	Jeringa
1	Micropipeta 10 $\mu\text{L}$
1	Matraz aforado 1 L
1	Matraz aforado 100 mL
2	Espátulas
1	Frasco 1 L
1	Frasco 100 mL
1	Tubo Falcon 10 mL
1	Piseta agua destilada
NA	Papel
NA	Papel aluminio
48.8 g	Tris Base
11.42 mL	Ácido acético glacial
14.61 g	EDTA 0.5 M
100 mg	Bromuro de etidio

## Anexo 2. Alineamiento de secuencias del gen *msp1α* reportadas en el NCBI.

			10	20	30	40	50	60
			.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
AY010244.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GGCTGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTATG
AF345867.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GACAGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTATG
AF345868.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GGCTGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTACG
AF345869.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GGCTGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTACG
AF345870.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GGCTGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTACG
AF428091.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GGCTGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTATG
AF428094.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GGCTGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTACG
AY191826.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----CATT	TCCATATACT	GTGCAGTACG
AY127052.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GGCTGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTATG
AY127053.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GGCTGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTATG
AY127054.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GGCTGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTATG
AY127056.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GGCTGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTATG
AY127057.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GGCTGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTATG
AY127058.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GGCTGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTACG
AY127060.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GCGTGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTATG
AY127061.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GGCTGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTATG
AY127062.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GGCTGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTATG
AY127063.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GGCTGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTATG
AY283199.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GGCTGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTACG
AY283200.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GGCTGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTACG
AY602768.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AY702926.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GGCTGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTATG
AY702927.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GGCTGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTATG
AY702928.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GGCTGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTATG
AY702929.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GGCTGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTATG
AY702930.1	Anaplasma	1	TGATGTTTAC	GGCTGTAGTA	TTGTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTATG
DQ501243.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----GTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTACG
DQ501244.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----GTGCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTACG
DQ813560.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DQ813564.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
JF957802.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
JQ839007.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----TGTCCTTAT	GGCAGACATT	TCCATATACT	GTGCAGTACG
JX844205.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
JX844207.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KC181866.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KC181879.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MF377394.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----TCG
KC181888.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KC470168.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KC470176.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KC470179.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KC470183.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KC470187.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MG570152.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MN370075.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MG983514.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----GTACG
MT498415.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MT498435.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MT498439.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----

			70	80	90	100	110	120
			.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
AY010244.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT
AF345867.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT
AF345868.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT
AF345869.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT
AF345870.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT
AF428091.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT
AF428094.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT
AY191826.1	Anaplasma	25	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT
AY127052.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT
AY127053.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT
AY127054.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT
AY127056.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT
AY127057.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT
AY127058.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT
AY127060.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT
AY127061.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT
AY127062.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT

AY127063.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT	
AY283199.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT	
AY283200.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT	
AY602768.1	Anaplasma	1	----	----	----	----	----	----	
AY702926.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT	
AY702927.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT	
AY702928.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT	
AY702929.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT	
AY702930.1	Anaplasma	61	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT	
DQ501243.1	Anaplasma	39	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT	
DQ501244.1	Anaplasma	39	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT	
DQ813560.1	Anaplasma	1	----	----	----	----	-GAGTATGG	GTC-CTCTCA	
DQ813564.1	Anaplasma	1	----	----	----	----	-GAGTATGG	GTC-CTCTCA	
JF957802.1	Anaplasma	1	----	----	----	ATGT	CAGAGTATGT	GTC-CTCTCA	
JQ839007.1	Anaplasma	40	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT	
JX844205.1	Anaplasma	1	----	----	AGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT	
JX844207.1	Anaplasma	1	-GTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT	
KC181866.1	Anaplasma	1	----	----	----	ATGT	CAGAGTATGT	GTC-CAGCCA	
KC181879.1	Anaplasma	1	----	----	----	ATGT	CAGATTATGT	GCC-CAGCCA	
MF377394.1	Anaplasma	4	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCAATTACAC	GTTTCCGTAT	
KC181888.1	Anaplasma	1	----	----	----	ATGT	CAGAGTATGT	GTC-CAGCCA	
KC470168.1	Anaplasma	1	----	----	----	ATGT	CAGAGTATGG	GTC-CTCTCA	
KC470176.1	Anaplasma	1	----	ATGT	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTTTCCGTAT	
KC470179.1	Anaplasma	1	----	----	GTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT	
KC470183.1	Anaplasma	1	-----	CAATTGTT	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTTTCCGTAT	
KC470187.1	Anaplasma	1	-----	ATTGTT	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTTTCCGTAT	
MG570152.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	C	GC-ATTACAC	GTT-CCGTAT	
MN370075.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
MG983514.1	Anaplasma	6	GTTGTGCTCC	CCAATTGTTA	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT	
MT498415.1	Anaplasma	1	-----	-----	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT	
MT498435.1	Anaplasma	1	-----	-----	AAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT	
MT498439.1	Anaplasma	1	-----	-----	GT	TAATTTAGTA	TATTAATCTT	GCGATTACAC	GTT-CCGTAT

			130	140	150	160	170	180
AY010244.1	Anaplasma	120	GTTACAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AF345867.1	Anaplasma	120	GTTACAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AF345868.1	Anaplasma	120	GTTACAATCG	GGC-TGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AF345869.1	Anaplasma	120	GTTACAATCG	GGC-TGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AF345870.1	Anaplasma	120	GTTACAATCG	GGC-TGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AF428091.1	Anaplasma	120	GTTACAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	AGTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AF428094.1	Anaplasma	120	GTTACAATCG	GGC-TGCCGG	TGTGG-TAGC	AGTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AY191826.1	Anaplasma	84	GTTACAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AY127052.1	Anaplasma	120	GTTACAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AY127053.1	Anaplasma	120	GTTACAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	AGTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AY127054.1	Anaplasma	120	GTTACAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	AGTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AY127056.1	Anaplasma	120	GTTACAATCG	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	AGTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AY127057.1	Anaplasma	120	GTTACAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	AGTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AY127058.1	Anaplasma	120	GTTACAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AY127060.1	Anaplasma	120	GTTACAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AY127061.1	Anaplasma	120	GTTACAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	AGTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AY127062.1	Anaplasma	120	GTTACAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	AGTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AY127063.1	Anaplasma	120	GTTACAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	AGTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AY283199.1	Anaplasma	120	GTTACAATCG	GGC-TGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AY283200.1	Anaplasma	120	GTTACAATCG	GGC-TGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AY602768.1	Anaplasma	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AY702926.1	Anaplasma	120	GTTACAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	AGTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AY702927.1	Anaplasma	120	GTTACAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	AGTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AY702928.1	Anaplasma	120	GTTACAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AY702929.1	Anaplasma	120	GTTACAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
AY702930.1	Anaplasma	120	GTTACAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	AGTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
DQ501243.1	Anaplasma	98	GTTACAATCG	GGC-TGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGT-	TGT	CCTCTTTCCC
DQ501244.1	Anaplasma	98	GTTACAATCG	GGC-TGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
DQ813560.1	Anaplasma	18	GCCAGCTGAT	AGCTCGTCAG	CGAG-TGTT	-CAGCAGCA	AGAGAGTAGT	GTGTATCTC
DQ813564.1	Anaplasma	18	GCCAGCTGAT	AGCTCGTCAG	CGAG-TGTT	-CAGCAGCA	AGAGAGTAGT	GTGTATCTC
JF957802.1	Anaplasma	24	GCCAAGTAT	AGCTCGTCAG	CGAG-TGTT	-CAGCAGCA	AGAGAGTAGT	GTGTATCTC
JQ839007.1	Anaplasma	99	GTTACAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
JX844205.1	Anaplasma	34	GTTACAATCG	GGC-TGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
JX844207.1	Anaplasma	57	GTTACAATCG	GGC-TGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
KC181866.1	Anaplasma	24	GCCAGCTGAT	AGCTCGTCAG	CGAG-TG	-----	-----	GTGTATCTA
KC181879.1	Anaplasma	24	GTCAGCTGAT	AGCTCGTCAG	CGAG-TGTT	-CAGCAGCA	AGGAGTAGT	GTGTATCTC
MF377394.1	Anaplasma	64	GTTACAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
KC181888.1	Anaplasma	24	GCCAGCTGAT	AGCTCGTCAG	CGGG-TGAT	-CAGCAGCA	AGAGAGTAGT	GTGTATCTC
KC470168.1	Anaplasma	24	GCCAGCTAAT	AGCTCGTCAG	CGAG-TGTT	-CAGCAGCA	AGAGAGTAGT	GTGTATCTC

KC470176.1	Anaplasma	45	GTTATAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
KC470179.1	Anaplasma	33	GTTACAATCG	GGC-TGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
KC470183.1	Anaplasma	49	GTTATAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
KC470187.1	Anaplasma	47	GTTATAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
MG570152.1	Anaplasma	20	GTTACAATCA	GGCACGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCGTTCCC
MN370075.1	Anaplasma	1	-----	-----GG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
MG983514.1	Anaplasma	65	GTTACAATCG	GGC-TGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
MT498415.1	Anaplasma	40	GTTACAATCG	GGC-TGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
MT498435.1	Anaplasma	40	GTTACAATCG	GGC-TGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC
MT498439.1	Anaplasma	42	GTTACAATCA	GGC-CGCCGG	TGTGG-TAGC	-GTGCTGGTT	GTGTGGTTGT	CCTCTTTCCC

			190	200	210	220	230	240
			.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
AY010244.1	Anaplasma	177	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AF345867.1	Anaplasma	177	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AF345868.1	Anaplasma	177	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AF345869.1	Anaplasma	178	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AF345870.1	Anaplasma	177	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AF428091.1	Anaplasma	178	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AF428094.1	Anaplasma	178	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AY191826.1	Anaplasma	141	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AY127052.1	Anaplasma	177	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AY127053.1	Anaplasma	178	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AY127054.1	Anaplasma	178	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AY127056.1	Anaplasma	178	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AY127057.1	Anaplasma	178	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AY127058.1	Anaplasma	177	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AY127060.1	Anaplasma	177	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AY127061.1	Anaplasma	178	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AY127062.1	Anaplasma	178	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AY127063.1	Anaplasma	178	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AY283199.1	Anaplasma	177	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AY283200.1	Anaplasma	177	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AY602768.1	Anaplasma	1	-----A	TGTCAGA---	-GTATGTGTC	CAGCCAGCCA	GCTGATAGCT	CGTCAGCG--
AY702926.1	Anaplasma	178	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AY702927.1	Anaplasma	178	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AY702928.1	Anaplasma	177	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AY702929.1	Anaplasma	177	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
AY702930.1	Anaplasma	178	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
DQ501243.1	Anaplasma	147	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
DQ501244.1	Anaplasma	155	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
DQ813560.1	Anaplasma	74	AAAGTGATCA	GGCCAGT---	-ACATCGTCT	CAATTAGG-A	ACTGATAGCT	CGTCAGCGAG
DQ813564.1	Anaplasma	74	AAAGTGGTCA	GGCCAGT---	-ACATCGTCT	CAATTAGG-A	GCTGATAGCT	CGTCAGCGAG
JF957802.1	Anaplasma	80	AAAGTGATCA	GGCCAGT---	-ACATCGTCT	CAATTAGG-A	GCTGGTAGCT	CGTCAGCGAG
JQ839007.1	Anaplasma	156	GATGTTGGGT	CGTTCGTTGT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
JX844205.1	Anaplasma	91	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
JX844207.1	Anaplasma	114	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
KC181866.1	Anaplasma	62	AAAGTGATCA	GGCCAGT---	-ACATCGTCT	CAATTAGG-A	ACTGATAGCT	CGTCAGCGGG
KC181879.1	Anaplasma	80	AAAGTGGTCA	GGCCAGT---	-ACATCGTCT	CAATTAGG-G	ACTGATAGCT	CGTCAGCGAG
MF377394.1	Anaplasma	120	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
KC181888.1	Anaplasma	80	AAAGTGGT--	-GCCAGT---	-ACATCGTCT	CAATTAGG-G	ACTGATAGCT	CGTCAGCGGG
KC470168.1	Anaplasma	80	AAAGTGATCA	GGCCAGT---	-ACATCGTCT	CAATTAGG-A	GCTGATAGCT	CGTCAGCGAG
KC470176.1	Anaplasma	102	GATGTTAGGT	CGTTCGTTTT	-ACGCCCTCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
KC470179.1	Anaplasma	90	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
KC470183.1	Anaplasma	106	GATGTTAGGT	CGTTCGTTTT	-ACGCCCTCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
KC470187.1	Anaplasma	104	GATGTTAGGT	CGTTCGTTTT	-ACGCCCTCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
MG570152.1	Anaplasma	78	GATGTTGGGT	CGTT-GTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
MN370075.1	Anaplasma	41	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
MG983514.1	Anaplasma	122	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
MT498415.1	Anaplasma	97	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
MT498435.1	Anaplasma	97	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	-ACGTCGCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA
MT498439.1	Anaplasma	99	GATGTTGGGT	CGTTCGTTTT	TACGTCCTCAC	AAGTTTGTAC	GCTGTGCCCC	TGGCAGTGTA

			250
			.... ....
AY010244.1	Anaplasma	236	GGGTTTAT-T
AF345867.1	Anaplasma	236	GGGTTTAT-T
AF345868.1	Anaplasma	236	GGGTTTGT-T
AF345869.1	Anaplasma	237	GGGTTTGT-T
AF345870.1	Anaplasma	236	GGGTTTGT-T
AF428091.1	Anaplasma	237	GGGTTTAT-T
AF428094.1	Anaplasma	237	GGGTTTGT-T
AY191826.1	Anaplasma	200	GGGTTTGT-T
AY127052.1	Anaplasma	236	GGGTTTAT-T

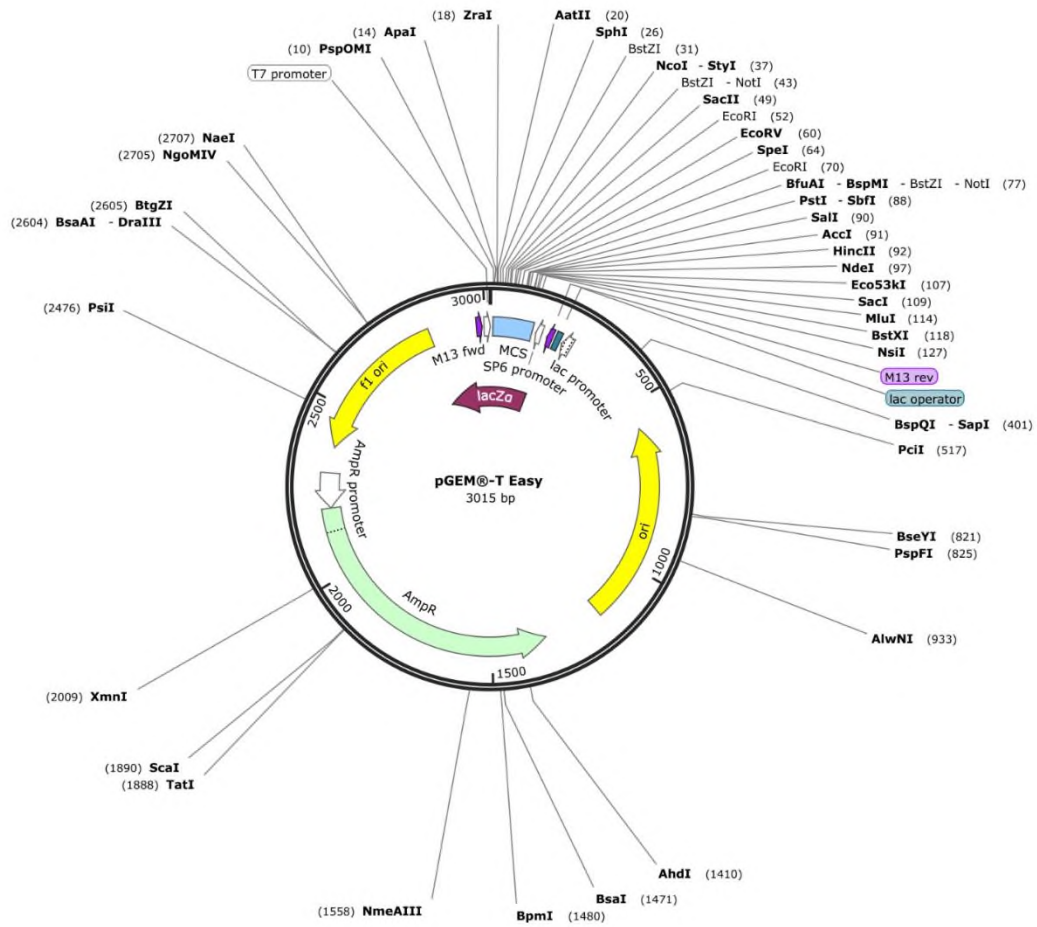
AY127053.1	Anaplasma	237	GGGTTTAT-T
AY127054.1	Anaplasma	237	GGGTTTAT-T
AY127056.1	Anaplasma	237	GGGTTTAT-T
AY127057.1	Anaplasma	237	GGGTTTAT-T
AY127058.1	Anaplasma	236	GGGTTTAT-T
AY127060.1	Anaplasma	236	GGGTTTAT-T
AY127061.1	Anaplasma	237	GGGTTTAT-T
AY127062.1	Anaplasma	237	GGGTTTAT-T
AY127063.1	Anaplasma	237	GGGTTTAT-T
AY283199.1	Anaplasma	236	GGGTTTGT-T
AY283200.1	Anaplasma	236	GGGTTTGT-T
AY602768.1	Anaplasma	45	-----
AY702926.1	Anaplasma	237	GGGTTTAT-T
AY702927.1	Anaplasma	237	GGGTTTAT-T
AY702928.1	Anaplasma	236	GGGTTT----
AY702929.1	Anaplasma	236	GGGTTT----
AY702930.1	Anaplasma	237	GGGTTTAT-T
DQ501243.1	Anaplasma	206	GGGTTTGT-T
DQ501244.1	Anaplasma	214	GGGTTTGT-T
DQ813560.1	Anaplasma	129	TGGTCAGCAG
DQ813564.1	Anaplasma	129	TGGTCAGCAG
JF957802.1	Anaplasma	135	TGGTCAGCAG
JQ839007.1	Anaplasma	215	GGGTTTGT-T
JX844205.1	Anaplasma	150	GGGTTTGT-T
JX844207.1	Anaplasma	173	GGGTTTGT-T
KC181866.1	Anaplasma	117	TGATCAGCAG
KC181879.1	Anaplasma	135	TGGTCAGCAG
MF377394.1	Anaplasma	179	GGGTTTGT-T
KC181888.1	Anaplasma	132	TGATCAGCAG
KC470168.1	Anaplasma	135	TGGTCAGCAG
KC470176.1	Anaplasma	161	GGGTTTGT-T
KC470179.1	Anaplasma	149	GGGTTTGT-T
KC470183.1	Anaplasma	165	GGGTTTGT-T
KC470187.1	Anaplasma	163	GGGTTTGT-T
MG570152.1	Anaplasma	136	GGGTTTGT-G
MN370075.1	Anaplasma	100	GGGTTTAT-T
MG983514.1	Anaplasma	181	GGGTTTGT-T
MT498415.1	Anaplasma	156	GGGTTTGT-T
MT498435.1	Anaplasma	156	GGGTTTGT-T
MT498439.1	Anaplasma	159	GGGTTTGT-T

**Anexo 3.** Protocolo de extracción de productos de PCR con el Kit de extracción QIAquick®

1. Mezclar 80 µL de producto de PCR con 240 µL de Buffer QG.
2. Incubar a 50 °C por 10 minutos (la mezcla debe ser amarilla).
3. Añadir isopropanol (80 µL) a la mezcla.
4. Colocar la columna en un tubo de recolección y añadir la mezcla, centrifugar por 1 minuto a 17,000 g. descartar el líquido y colocar la columna en el mismo tubo.
5. Si el ADN se secuenciará, añadir 500 µL de Buffer QG a la columna y centrifugar por 1 minuto. Descartar el líquido y colocar en el mismo tubo.
6. Para lavar, añadir el 750 µL de Buffer PE a la columna y centrifugar por 1 minuto. Descartar el líquido y colocar el mismo tubo.  
Si el ADN será usado en procesos sensibles a sales, dejar reposar la columna de 2 – 5 minutos más después de agregar el Buffer PE. Centrifugar 1 minuto para remover el Buffer residual.
7. Colocar la columna en un tubo de 1.5 mL limpio.
8. Para eluir el ADN añadir 40 µL de Buffer EB o agua libre de nucleasas en el centro de la membrana y centrifugar 1 minuto.  
Para incrementar la concentración del ADN, añadir en dos partes el Buffer EB.  
Se puede dejar reposar la columna hasta 4 minutos a temperatura ambiente para incrementar el rendimiento del ADN purificado.
9. Cuantificar en Nanodrop y almacenar a – 20 °C hasta su uso.

## Anexo 4. Vector de clonación pGEM-T easy

Created with SnapGene®



**Figura 20. Esquema del vector pGEM-T easy.** Se enmarcan las enzimas de restricción, el MCS (Sitio de clonación múltiple) y los sitios M13 utilizados en la PCR de colonia.

**Anexo 5. Medio de cultivo LB Sólido (100 mL)**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Extracto de levadura	0.5 g
Peptona de caseína	1 g
NaCl	1 g
Agar bacteriológico	6 g
ddH <sub>2</sub> O + DEPC cbp	100 mL

En un matraz vaciar el agua y en agitación agregar los componentes hasta disolver bien.

Esterilizar 15 minutos a 15 lb/in<sup>2</sup> a 121 °C.

Enfriar a 40 – 50 °C y agregar 100 µL ampicilina 100 mg/mL.

## Anexo 6. Método de extracción por lisis alcalina

Solución	Reactivos	Procedimiento
I (10 mL)	0.25 mL Tris-HCl 1 M 0.2 mL EDTA 0.5 M 9.55 mL ddH <sub>2</sub> O + DEPC cbp	Mezclar los componentes y guardar a 4 °C
II (200 µL)	4 µL NaOH 10 N 20 µL SDS 10 % 196 µL ddH <sub>2</sub> O + DEPC cbp	Mezclar los componentes
III (10 mL)	6 mL Acetato de potasio 5 M 1.15 mL Ácido acético glacial 10 mL ddH <sub>2</sub> O + DEPC cbp	Mezclar los componentes y almacenar a 4 °C

### Procedimiento:

Vaciar el cultivo bacteriano en tubos de 1.5 mL y centrifugar a 12,000 rpm por 2 minutos. Retirar lentamente el sobrenadante por decantación, dejando el pellet bacteriano sin líquido. Resuspender el pellet en 100 µL de Solución I y agitar por vórtex vigorosamente. Meter la mezcla en hielo.

Agregar 200 µL de la Solución II recién preparada al pellet y mezclar por inversión 10 veces, introducir nuevamente en hielo. Añadir 150 µL de Solución III, cerrar y dispersar la solución mediante inversión varias veces; poner en hielo 5 minutos.

Centrifugar el lisado bacteriano a 12,000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Transferir el sobrenadante a tubos nuevos. Agregar un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, mezclar por vórtex y centrifugar a 12,000 rpm por 2 minutos a 4 °C. Transferir la capa superior acuosa a un tubo nuevo.

Precipitar el plásmido añadiendo 2 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente. Mezclar por vórtex y dejar reposar 2 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar el plásmido a 12,000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Se obtiene un pellet blanquecino.

Remover el sobrenadante por aspiración suave. Lavar el pellet con 1 mL de etanol al 70% y mezclar por inversión. Centrifugar a 12,000 rpm por 2 minutos a 4 °C. Remover el sobrenadante por aspiración gentil. Dejar secar a temperatura ambiente.

Resuspender el pellet en 30 µL de ddH<sub>2</sub>O + DEPC, incubar con RNAsa 30 minutos a 37 °C, inactivar a 65 °C y almacenar a -20 °C.

**Anexo 7.** Cuantificación de ADN bacteriano extraído de los bovinos muestreados.

Comunidad	Número	Muestra	Ác. nucleicos (ng/μL)	A 260	A 280	260/280	260/230
<b>El Porvenir</b>	M1	2007488695	37.2	0.745	0.51	1.46	1.96
	M2	2008089083	30.6	0.612	0.296	2.07	2.05
	M3	2007487386	25.3	0.507	0.248	2.04	1.90
	M4	2008054285	59	0.499	0.246	2.03	2.03
	M5	2008006762	50.8	1.016	0.534	1.90	1.90
	M6	2007260953	37.9	0.759	0.38	2.00	1.90
	M7	61 sin año	53.4	1.068	0.564	1.89	8.31
	M8	2007480877	39.9	0.797	0.421	1.89	1.89
	M9	Semental	57.9	1.158	0.609	1.90	1.89
	M10	2006922363	22.2	0.443	0.217	2.04	1.90
	M11	2007717120	50.7	1.015	0.632	1.61	1.95
<b>San Lucas Ojitlán</b>	M12	200764781	21.9	0.438	0.221	1.98	1.94
	M13	35 sin año	17.4	0.347	0.182	1.91	2.00
<b>Zacate Colorado</b>	M14	2008054281	15.9	0.318	0.164	1.94	2.00
	M15	2007824865	25	0.501	0.256	1.96	2.25
	M16	2008047236	45.7	0.913	0.496	1.84	1.72
	M17	2007824862	27.7	0.153	0.059	2.59	1.82
	M18	2007825245	19	0.38	0.189	2.01	2.05
	M19	2007939415	39.4	0.789	0.474	1.66	1.22
	M20	2007824633	17.8	0.357	0.169	2.11	2.12
	M21	2007935189	37.9	0.758	0.39	1.94	1.96
	M22	2007935191	214	4.28	4.338	0.99	1.33
	<b>El Palmar</b>	M23	4	40.5	0.811	0.503	1.61
M24		130	63.5	1.27	1.36	0.93	0.42
M25		141	32.6	0.652	0.343	1.90	2.18
M26		145	10.5	0.211	0.108	1.95	2.27
M27		29	20.2	0.403	0.183	2.20	0.33
M28		100	23.9	0.479	0.241	1.99	1.33
M29		92	10.7	0.213	0.098	2.17	1.89
M30		8	12.3	0.247	0.141	1.75	0.64
<b>Benemérito Juárez</b>	M31	303	22.1	0.443	0.215	2.06	2.22
	M32	8981	32.6	0.652	0.343	1.90	0.58
	M33	82	10.5	0.211	0.108	1.95	0.77
	M34	9934	20.2	0.403	0.183	2.20	1.98
	M35	301	22.5	0.45	0.231	1.95	2.47
	M36	88	27.9	0.558	0.315	1.77	2.03
	M37	300	27	0.54	0.287	1.88	1.90
	M38	1121	19.4	0.387	0.318	1.22	1.90
	M39	96	29	0.58	0.296	1.96	8.31
<b>Centro de Salud Animal</b>	M40	NA	27.3	0.546	0.266	2.05	1.89
	M41	NA	57.9	1.158	0.609	1.90	1.89
	M42	Eq. 3472	59	0.499	0.246	2.03	1.90
	M43	Eq. 3412	50.8	1.016	0.534	1.90	1.95

<b>San Juan Río Manso</b>	M44	Semental	98.4	1.968	1.034	1.90	1.94
	M45	Hembra	78.9	8.574	1.032	8.31	2.00
	M46		53.4	1.068	0.564	1.89	2.00
	M47		39.9	0.797	0.421	1.89	1.46
	M48		57.9	1.158	0.609	1.90	2.07
<b>San Benito</b>	M49		28.2	0.563	0.288	1.95	2.04
	M50		37.9	0.758	0.39	1.94	2.03
	M51		23.1	0.462	0.231	2.00	1.90
	M52		19.3	0.386	0.193	2.00	2.00
<b>Loma Bonita</b>	M53		15	0.299	0.133	2.25	1.89
	M54		22.9	0.458	0.267	1.72	1.89
	M55		25	0.5	0.275	1.82	1.90
	M56		27.3	0.546	0.266	2.05	2.04
	M57		19.4	0.387	0.318	1.22	1.61
	M58		17.2	0.344	0.162	2.12	2.25
<b>CIC - LCCA</b>		<i>B. thuringiensis</i>	66.6	1.331	0.679	1.96	1.72

## Anexo 8. BLAST de las secuencias obtenidas.

C+: Equino 3572

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Dawn genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Dawn</a>	294	294	87%	4e-75	99.39%	1196760	CP006847.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Gypsy Plains genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Gypsy Plains</a>	294	294	87%	4e-75	99.39%	1198622	CP006846.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Florida_complete genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Florida</a>	294	294	87%	4e-75	99.39%	1202435	CP001079.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale isolate Oklahoma major surface protein 1a (msp1a) gene_complete</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Oklahoma</a>	294	294	87%	4e-75	99.39%	2154	AY010247.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. St. Maries_complete genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. St. Maries</a>	294	294	87%	4e-75	99.39%	1197687	CP000030.1

Muestra M40: Muestra del Centro de Salud Animal

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Dawn genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Dawn</a>	292	292	87%	1e-74	99.38%	1196760	CP006847.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Gypsy Plains genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Gypsy Plains</a>	292	292	87%	1e-74	99.38%	1198622	CP006846.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Florida_complete genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Florida</a>	292	292	87%	1e-74	99.38%	1202435	CP001079.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale isolate Oklahoma major surface protein 1a (msp1a) gene_complete</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Oklahoma</a>	292	292	87%	1e-74	99.38%	2154	AY010247.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. St. Maries_complete genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. St. Maries</a>	292	292	87%	1e-74	99.38%	1197687	CP000030.1

Muestra M44: Semental de San Juan Río Manso

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Dawn genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Dawn</a>	291	291	89%	5e-74	98.78%	1196760	CP006847.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Gypsy Plains genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Gypsy Plains</a>	291	291	89%	5e-74	98.78%	1198622	CP006846.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Florida_complete genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Florida</a>	291	291	89%	5e-74	98.78%	1202435	CP001079.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale isolate Oklahoma major surface protein 1a (msp1a) gene_complete</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Oklahoma</a>	291	291	89%	5e-74	98.78%	2154	AY010247.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. St. Maries_complete genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. St. Maries</a>	291	291	89%	5e-74	98.78%	1197687	CP000030.1

Muestra M45: Hembra de San Juan Río Manso

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Dawn genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Dawn</a>	307	307	95%	5e-79	98.84%	1196760	CP006847.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Gypsy Plains genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Gypsy Plains</a>	307	307	95%	5e-79	98.84%	1198622	CP006846.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Florida_complete genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Florida</a>	307	307	95%	5e-79	98.84%	1202435	CP001079.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale isolate Oklahoma major surface protein 1a (msp1a) gene_complete</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Oklahoma</a>	307	307	95%	5e-79	98.84%	2154	AY010247.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. St. Maries_complete genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. St. Maries</a>	307	307	95%	5e-79	98.84%	1197687	CP000030.1

Muestra M16: Bovino 2008047236 de Zacate Colorado

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Dawn genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Dawn</a>	294	294	88%	4e-75	99.39%	1196760	CP006847.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Gypsy Plains genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Gypsy Plains</a>	294	294	88%	4e-75	99.39%	1198622	CP006846.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Florida_complete genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Florida</a>	294	294	88%	4e-75	99.39%	1202435	CP001079.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale isolate Oklahoma major surface protein 1a (msp1a) gene_complete</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Oklahoma</a>	294	294	88%	4e-75	99.39%	2154	AY010247.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. St. Maries_complete genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. St. Maries</a>	294	294	88%	4e-75	99.39%	1197687	CP000030.1

Muestra M13: Bovino 35 de San Lucas Ojitlán

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Dawn genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Dawn</a>	294	294	95%	4e-75	96.65%	1196760	CP006847.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Gypsy Plains genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Gypsy Plains</a>	294	294	95%	4e-75	96.65%	1198622	CP006846.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Florida_complete genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Florida</a>	294	294	95%	4e-75	96.65%	1202435	CP001079.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale isolate Oklahoma major surface protein 1a (msp1a) gene_complete</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. Oklahoma</a>	294	294	95%	4e-75	96.65%	2154	AY010247.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Anaplasma marginale str. St. Maries_complete genome</a>	<a href="#">Anaplasma marginale str. St. Maries</a>	294	294	95%	4e-75	96.65%	1197687	CP000030.1