

***Anaplasma marginale*: análisis de las secuencias del fragmento variable del gen *msp1α* y del gen *msp4* de cuatro nuevas cepas mexicanas**

***Anaplasma marginale*: analysis of variable fragment sequences in *msp1α* and *msp4* genes in four new Mexican strains**

Rafael Jiménez Ocampo^a, Sergio D. Rodríguez Camarillo^a, Rodrigo Rosario Cruz^a,
Laura E. Orozco Vega^b, José de la Fuente^{c,d}

RESUMEN

La anaplasmosis bovina ocasiona pérdidas cuantiosas a la ganadería en países en desarrollo, y el diseño de vacunas se ve obstaculizado por la amplia diversidad genética y antigénica que este organismo presenta en cepas de diferentes regiones geográficas. El objetivo del trabajo fue comparar las secuencias de cuatro cepas mexicanas de *A. marginale* no tipificadas respecto a los genes *msp1α* y *msp4*. Se usaron las secuencias de MSP-1a y MSP4, dos de las proteínas del complejo principal de superficie, y que se han usado para estudios filogenéticos. Usando iniciadores específicos, para la región variable del gen *msp1α* y el gen *msp4*, se amplificó el ADN de las cepas Pte. de Ixtla, Mor., Aguascalientes, Ags., Pichucalco y Sta. Martha, Chis. El análisis de las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos para *msp1α* reveló una clara similitud entre los aislados Pichucalco y Sta. Martha ambas de Chiapas, al igual que contra los aislados México, Morelos y Veracruz. Los aislados Aguascalientes y Pte. de Ixtla demostraron ser diferentes entre ellos, de las otras cepas mexicanas, y de otros países, mientras que para *msp4* no se observó variación en ninguna de las cepas mexicanas hasta el momento reportadas, las cuales contienen 849 pb y coinciden altamente con diversos aislados del mundo. El estudio regional o nacional del grado de conservación de estas proteínas abriría posibilidades para el diseño de una vacuna con base en este tipo de antígenos y se podría predecir su eficacia.

PALABRAS CLAVE: *Anaplasma marginale*, MSP1a, MSP4, Complejo mayor de superficie.

ABSTRACT

Bovine anaplasmosis, due to *Anaplasma marginale*, is responsible for substantial economic losses in livestock production of developing countries. Vaccine development is hampered by wide genetic and antigenic diversity in strains of distant geographical areas. The objective of the present study was to compare sequences of four non typified Mexican *A. marginale* strains in respect of *msp1α* and *msp4* genes. Sequences of MSP-1a and MSP4 and major surface complex proteins were used, already used for phylogenetic studies. Through specific initiators, for variable areas of both the *msp1α* and *msp4* genes, DNA of the Pte. de Ixtla, Mor.; Aguascalientes, Ags; Pichucalco and Sta. Martha, Chis. strains was amplified. Analyses of nucleotide sequences and amino acids for *msp1α* showed a strong similitude between Pichucalco and Sta. Martha, both from Chiapas, same as against the isolates Mexico, Morelos and Veracruz. Isolates Pte. de Ixtla and Aguascalientes were different between them and previously identified Mexican strains and from other countries, while for *msp4* no variation was reported for Mexican strains previously reported, which contain 849 pb and coincide with different isolates the world over. Studies comprising either regions or the whole country on the conservation rank of these proteins could open possibilities for vaccines based on these antigens and its efficacy could be predicted.

KEY WORDS: *Anaplasma marginale*, MSP1a, MSP4, Major surface complex.

Recibido el 30 de octubre de 2006 y aceptado para su publicación el 10 de octubre de 2007.

^a CENID-PAVET Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria INIFAP Km. 11.5 Carretera Cuernavaca – Cuautla Col. Progreso, 62550 Jiutepec, Morelos. rodriguez.sergio@inifap.gob.mx. Correspondencia al segundo autor.

^b C. E. Huimanguillo, CIR Golfo Centro / INIFAP.

^c Department of Veterinary Pathobiology, Center for Veterinary Health Sciences, Oklahoma State University.

^d Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC (CSIC-UCLM-JCCM), Ciudad Real, España.

La anaplasmosis es una enfermedad infecciosa no contagiosa de distribución mundial, que causa considerables pérdidas económicas en los países en vías de desarrollo, especialmente en regiones tropicales y subtropicales^(1,2). *Anaplasma marginale*, es la especie más patógena y es la única presente en México⁽³⁾. La rickettsia infecta los eritrocitos de los animales susceptibles y se multiplica de forma silente durante los siguientes 15 a 45 o más días, para después mostrarse en forma aguda, pudiendo ocasionar la muerte en muchos casos. *Anaplasma marginale* es un organismo con alto grado de variación genética, lo que dificulta su control por medio de vacunas⁽⁴⁾, por lo que aún cuando la vacunación es la forma idónea de control para esta enfermedad, hasta el momento no se cuenta con vacunas inactivadas efectivas, y sólo algunos países usan cepas de *A. marginale* de baja virulencia^(5,6); en México sin embargo, no existen vacunas comerciales para el control de la enfermedad. Estudios de antígenos inmuno relevantes han caracterizado seis proteínas de la superficie de la rickettsia llamadas “Proteínas del complejo principal de superficie” (MSP) con diferentes pesos moleculares (PM); MSP-1a de 105 kDa, MSP-4 de 31 kDa y MSP-5 de 19 kDa, las cuales están codificadas por un sólo gen y MSP-1b de 105 kDa, MSP-2 de 36 kDa, MSP-3 de 86 kDa, codificadas por familias multigénicas^(7,8).

MSP1a está codificada por el gen *msp1α*, que se conforma de un dominio conservado y un dominio variable compuesto de uno o varios polipéptidos, conocidos como repeticiones, cada uno de 23 a 31 aminoácidos, muy parecidos, y de los que se pueden encontrar hasta 11 secuencias en tándem que pueden ser iguales o diferentes^(9,10). Estudios de caracterización molecular de aislados geográficos de *A. marginale* usando este gen, demuestran alta diversidad que sugieren que *msp1α* se encuentra bajo presión positiva⁽¹¹⁾. El fragmento variable de esta proteína se encuentra expuesto sobre la membrana de la rickettsia, y se sabe que tiene propiedades de ligando o adhesina hacia un receptor aún no identificado en los eritrocitos del bovino, y células de ciertas garrapatas como *Dermacentor variabilis* e *Ixodes scapularis*^(12,13), por lo que se le atribuye un papel importante en la inmunidad

Anaplasmosis is an infectious non contagious disease distributed worldwide which causes strong economic losses in livestock production in developing countries, especially those located in the tropics and subtropics^(1,2). *Anaplasma marginale* is the most virulent specie and the only one found in Mexico⁽³⁾. This rickettsia infects erythrocytes in susceptible animals and multiplies silently for the next 15 to 45 or more days, to show then an acute phase, in many cases causing death. *Anaplasma marginale* is an organism presenting great genetic variability, which difficults control through vaccines⁽⁴⁾. Even though vaccination is the most appropriate method to control this disease, no efficient inactivated vaccine is available, and only a few countries use low virulence *A. marginale* strains^(5,6). However, no commercial vaccines to control this disease are available in Mexico. Studies on immuno-relevant antigens have characterized six proteins in the surface of the rickettsia called “Major surface complex proteins” (MSP) with different molecular weight (PM): MSP-1a, 105 kDa; MSP-4, 31 kDa and MSP-5, 19 kDa, which are coded in only one gene and MSP-1b, 105 kDa; MSP-2, 36 kDa and MSP-3, 86 kDa, coded in multigenic families^(7,8).

MSP1a is coded by the *msp1α* gene, which is conformed by a reserved domain and a variable domain made up by one or several polypeptides known as replicates, each one containing 23 to 31 amino acids, very similar and that can be found in up to 11 sequences in tandem which can be equal or different^(9,10). Molecular characterization studies of *A. marginale* geographical isolates using this gene, show great diversity which suggests that *msp1α* is under positive pressure⁽¹¹⁾. The variable fragment of this protein is found exposed in the surface of the membrane of the rickettsia and it is a known fact that it has ligand or adhesin properties towards a yet non identified receptor in the erythrocytes of the bovine, and to cells of certain ticks, as *Dermacentor variabilis* and *Ixodes scapularis*^(12,13), therefore, an important role in bovine immunity is attributed to it, as well as of invasion and transmittance by ticks. Diversity seen in this protein is great, because if directly affects the design and development of immunogens which could be of wide spectrum in the protection afforded

del bovino y en la invasión y transmisibilidad por garrapatas. La diversidad que se observa en esta proteína es importante, ya que afecta de manera directa el diseño y desarrollo de inmunógenos que pudieran tener un amplio espectro en la protección ofrecida contra esta enfermedad. A la fecha se han caracterizado 131 cepas de América, Europa, Asia, África y Australia, dando como resultado más de 79 diferentes repeticiones de la región variable de *msp1α*⁽¹⁴⁾.

La proteína MSP4, codificada sólo por el gen *msp4*, no se considera como un buen candidato para la inmunización de animales, debido a que sólo un porcentaje muy bajo de los sueros de animales infectados con *A. marginale* la reconocen; sin embargo, se ha utilizado al igual que *msp1α* para fines de clasificación filogenética^(10,15,16).

Estudios filogenéticos de organismos mexicanos han encontrado sólo dos genotipos usando *msp1α* como marcador, y un solo genotipo para *msp4* en cuatro cepas de la rickettsia colectadas en diferentes estados del país⁽¹⁵⁾. Sin embargo, se estima que la diversidad para el gen *msp1α* debe ser más amplia con base en lo reportado en la literatura⁽¹⁷⁾, por lo que objetivo del presente trabajo fue comparar las secuencias del fragmento variable de *msp1α* y el gen *msp4* de cuatro cepas de recién colección de *A. marginale* con cepas mexicanas y de otros países, para deducir su relación filogenética.

El trabajo de investigación se desarrolló en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) del INIFAP. Para efectos de los trabajos que se han realizado por nuestro laboratorio, “aislado” se define como un organismo colectado en campo, mientras que “cepa” es un organismo con características definidas, como marcadores genéticos, virulencia, etc.

Las cepas Aguascalientes, Ags., Puente de Ixtla, Mor., y Pichucalco, Chis se recuperaron de casos clínicos en los municipios correspondientes, y han sido caracterizadas por su virulencia en animales susceptibles⁽¹⁸⁾; la cepa Santa Martha, se obtuvo de un bovino portador asintomático infectado en el

against this disease. To date, 131 strains have been characterized in Europe, Asia, Africa, Australia and the Americas, providing more than 79 replicates of the variable region of *msp1α*⁽¹⁴⁾.

The MSP4 protein, coded only by the *msp4* gene, is not considered a good candidate for immunization of animals, because only a very small percentage of serums of animals infected by *A. marginale* recognize it. However, it has been used, the same as *msp1α* for phylogenetic studies^(10,15,16).

Phylogenetic studies of Mexican organisms have detected only two genotypes when using *msp1α* as marker, and only one genotype for *msp4* in four strains of the rickettsia collected in different States of the country⁽¹⁵⁾. However, it is estimated that diversity for the *msp1α* gene should be greater, based on reports⁽¹⁷⁾, so the objective of the present study was to compare sequences of the variable fragment of *msp1α* and the *msp4* gene in four newly collected strains of *A. marginale* with strains of Mexico and other countries, to deduce its phylogenetic relationship.

The present study was carried out in the Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Cuernavaca, Mor., México. To all effects of work carried out in its laboratories, “isolate” is defined as an organism collected in the field, while “strain” is an organism with definite characteristics, as genetic markers, virulence, etc.

The Aguascalientes Ags., Puente de Ixtla Mor. and Pichucalco Chis. strains were recovered from clinical studies in the aforementioned municipalities and have been characterized for their virulence in susceptible animals⁽¹⁸⁾. The Santa Martha strain was obtained from an infected asymptomatic carrier individual in the municipality of Pichucalco in the State of Chiapas⁽¹⁸⁾. DNA was extracted by means of a commercial kit in blood treated with anticoagulants previously frozen at -70 °C. Amplification of the variable fragment of *msp1α* was carried out with the following initiators: sense

municipio de Pichucalco⁽¹⁸⁾. Sangre con anticoagulante y previamente congelada a -70 °C se usó para la extracción de ADN con un kit comercial. Para la amplificación del fragmento variable de *msp1α* se usaron los iniciadores: sentido 5'-GTGCTTATGGCAGACATTTC-3' y antisentido 5'-CTCAACACTCGCAACCTTGG-3', que se ubican en las regiones conservadas que flanquean la región variable del gen *msp1α*⁽¹⁹⁾; con el siguiente protocolo: desnaturalización a 95 °C por 120", alineación a 58 °C por 30" y extensión a 72 °C por 60" con 35 ciclos, y un paso de extensión final a 72 °C por 10 min. Para el gen *msp4* los iniciadores: sentido 5'-GGGAGCTCCTATGAATTA CAGAGAA TTGTTTAC-3' y antisentido 5'-CCGGATCCTTAGCTGAACAGGAATCTTGC-3'⁽²⁰⁾. Con los siguientes pasos: desnaturalización 94 °C por 120", alineación a 60 °C por 60" y 68 °C por 60" y extensión a 72 °C por 60" con 35 ciclos y un paso final de extensión a 72 °C por 10 min.

El fragmento de *msp1α* anticipadamente amplificado por PCR, fue clonado en un vector de clonación del kit comercial TOPO TA Cloning® Kit PCR® 2.1 (Invitrogen Carlsbad, CA). La reacción de clonación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Sólo se seleccionaron las clonas transformadas y se llevó a cabo la extracción de ADN plasmídico por medio del kit comercial SV minipreps DNA purification system® (Promega Madison, WI). A partir del ADN plasmídico purificado, se secuenciaron tres clonas de cada uno de los aislados en un volumen final de 32 µl (46.875 ng/µl) el fragmento de *msp4* fue amplificado por medio del PCR, separado en un gel de azarosa, y los productos de PCR fueron purificados por medio del kit comercial Wizard SV gel and PCR Clean-Up System® (Promega, Madison, WI). El ADN se cuantificó y se envió secuenciar 800 ng en un volumen final de 14 µl en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. El análisis de las secuencias se llevó a cabo utilizando la utilería disponible en el sitio del NCBI, BCM Search Launcher y el programa Clustal W⁽²¹⁾.

En este estudio se compararon las secuencias de cuatro cepas mexicanas de recién colección con

5'-GTGCTTATGGCAGACATTTC-3' and antisense 5'-CTCAACACTGCAACCTTGG-3', located in the conserved regions which flank the variable region of the *msp1α* gene⁽¹⁹⁾ with the following protocol: denaturalization at 95 °C for 120 sec, alignment at 58 °C for 30 sec, extension at 72 °C for 60 sec with 35 cycles and a final extension step at 72 °C for 10 min. The process for the *msp4* gene was for initiators: sense 5'-GGGAGCTCCTATGAATTA CAGAGAATTGTTTAC-3' and antisense 5'-CCGGATCCTTAGCTGAACAGGAATCTTGC-3'⁽²⁰⁾, with the following steps: denaturalization at 94 °C for 120 sec, alignment at 60 °C for 30 sec and 68 °C for 60 sec, extension at 72 °C for 60 sec with 35 cycles and a final extension step at 72 °C for 10 min.

The *msp1α* fragment previously amplified by PCR, was cloned in a cloning vector of the TOPO TA Cloning Kit PCR® 2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The cloning reaction was carried out following the kit's manufacturer instructions. Only transformed clones were chosen and plasmid DNA extraction was performed with the aid of the SV minipreps DNA purification system® commercial kit (Promega, Madison, WI, USA). From purified plasmid DNA, three clones of each isolate in a final volume of 32 µl (46.875 ng/µl) were sequenced, the *msp4* fragment was amplified through PCR, separated in agarose gel and PCR products were purified by means of the Wizard SV gel and PCR clean-up System® commercial kit (Promega, Madison, WI, USA). DNA was quantified and 800 ng in a final 14 µl volume sent to the sequencing unit of the Instituto de Biotecnología of the Universidad Nacional Autónoma de Mexico (UNAM), for sequencing. Sequence analysis was carried out through the available props in the NCBI site, BCM Search Launcher and Clustal W software⁽²¹⁾.

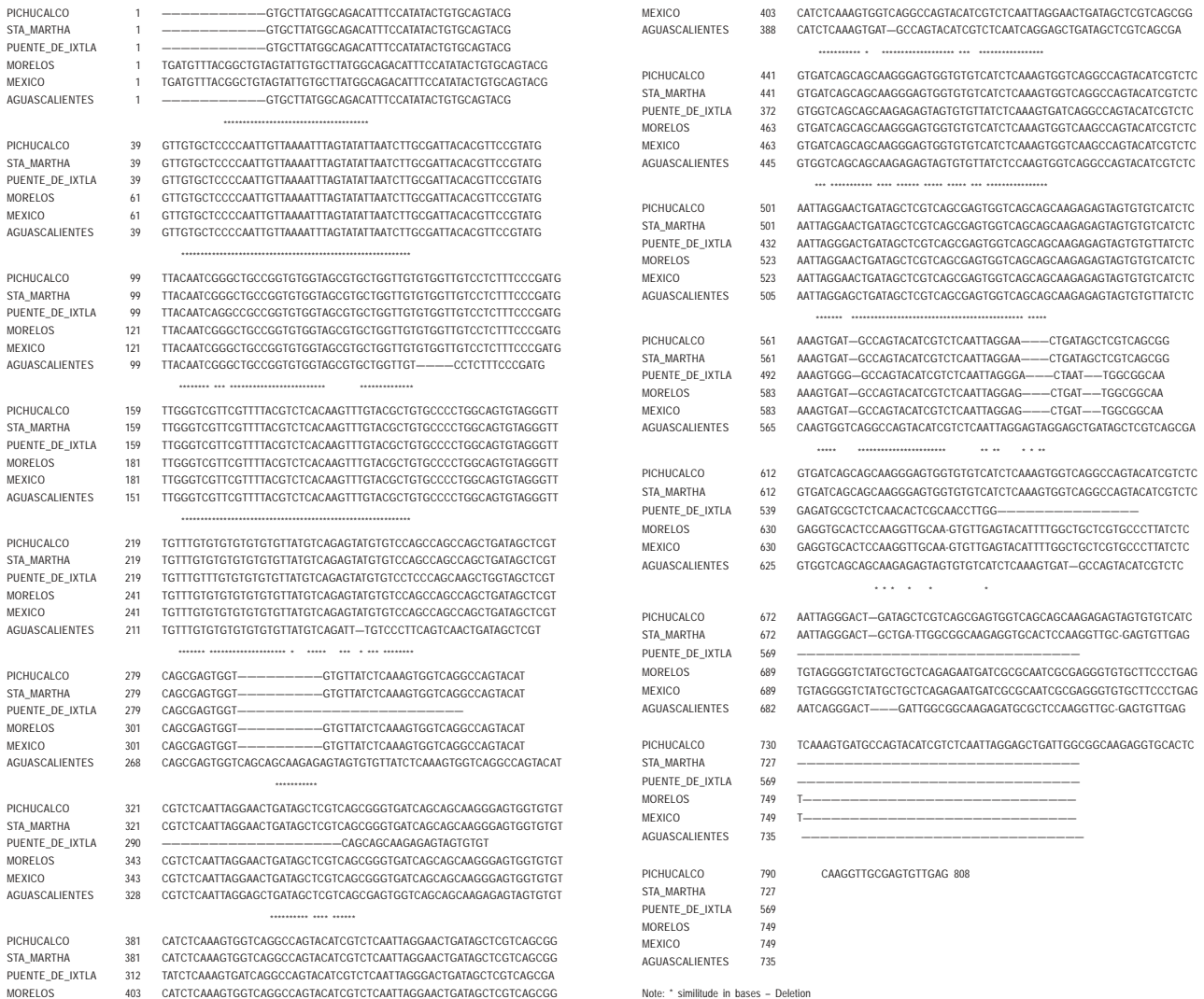
In the present study, sequences of four newly collected Mexican strains were compared for MSP1a and MSP4 variable fragments. Separation in 1% agarose gel of amplicons obtained through PCR of the variable region of the *msp1α* gene of the Puente de Ixtla (500 to 600 pb), Aguascalientes (700 to 800 pb), Pichucalco (800 to 900 pb) and Santa

respecto del fragmento variable de MSP1a y MSP4. La separación en gel de agarosa al 1 % de los amplicones obtenidos por PCR correspondientes a la región variable del gen *msp1α* de las cepas Pte. de Ixtla (500 a 600 pb), Aguascalientes (700 a 800 pb), Pichualco (800 a 900 pb) y Sta. Martha (700 a 800 pb; datos no mostrados) fueron diferentes al ser comparadas con los de las cepas Morelos, Yucatán, Veracruz y México ya reportados^(17,20).

Las secuencias obtenidas a partir de los amplicones o de la clonación (Figura 1) y las repeticiones

Martha (700 to 800 pb; data not shown) strains, were different when compared to the Morelos, Yucatán, Veracruz and Mexico strains already reported^(17,20). Sequences obtained from the amplicons or from clones (Figure 1) and replications derived from those sequences (Tables 1,2), show that the Pichualco and Santa Martha strains, recovered from the Santa Martha ranch in the State of Chiapas, share the first five replications between them, and at the same time share the first four replications with the Morelos, Mexico and Veracruz strains. Similitude between these strains allows to

Figura 1. Alineación de la secuencia de nucleótidos de *msp1α*
 Figure 1. Sequence alignment of *msp1α* nucleotides



Note: * similitude in bases - Delellon

Cuadro 1. Información de la secuencia de cada gen en las cepas de estudio

Table 1. Information on sequence of each gene in studied strains

Strain	Gene	Base pairs	Amino acids	Repetitions	GenBank No.
Aguascalientes, Ags.	<i>msp1α</i>	735	143	5	DQ501243
	<i>Msp4</i>	849	290		EF053267
Pichucalco, Chis.	<i>msp1α</i>	808	166	6	DQ501244
	<i>msp4</i>	849	290		EF053264
Puente de Ixtla, Mor.	<i>msp1α</i>	569	88	3	DQ501242
	<i>msp4</i>	849	290		EF053266
Sta. Martha Chis.	<i>msp1α</i>	727	138	5	EF053268
	<i>msp4</i>	849	290		EF053265

Cuadro 2. Secuencias repetidas de la región variable de MSP1A presentes en cepas de *A. marginale* incluidas las cepas de estudio

Table 2. Sequence replicates of MSP1a variable region found in *Anaplasma marginale* strains worldwide, including strains being studied

<i>A. marginale</i> strains	MSP1a replicate structure§							
Brasil 9	α	β	τ	M				
Brasil 12	α	β	β	N				
México	α	β	β	Γ				
Morelos	α	β	β	Γ				
Veracruz	α	β	β	Γ				
Pichucalco*	α	β	β	Γ	β	Γ		
Sta. Martha*	α	β	β	Γ	β			
Aguascalientes*	4	9	10	11	9			
Puente de Ixtla*	12	13	14					
Israel	1	4						
Florida	A	B	B	B	B	B	B	B
Yucatán	T	C	B	B	C	B	π	
St. Maries	J	B	B					
Virasoro Arg.	Σ	B	Q	B	C			
Salta Arg.	B	B	M					

§ GenBank access No, AY283199, AY283200, AF345868, AF345869, AF345870, AY355283, M32871, AF345871, AY010245, AF428094, y AF428093 for *msp1a*.

* Sequences 9, 10, 11, 12, 13 and 14 were named in accordance with De la Fuente⁽¹⁷⁾ and sent to GenBank.

suggest that being all of them from the east coast of Mexico, they may have been carried by animals from the Gulf coast to other States including Chiapas. At the same time, similitude between these strains is congruent to the hypothesis that through positive pressure these strains have suffered modifications that resulted in increment in the number of replicates in the variable fragment of MSP1a⁽²²⁾, increasing its opportunities of survival, because this segment is highly immunogenic. On the other hand, Aguascalientes and Puente de Ixtla strains are different between them and of all the other strains, as well as in the number of replicates as in MSP1a sequences, as some replicates were not published previously, which indicates a different origin from the other strains.

The phylogenetic tree (Figure 2) shows the relationship between the Morelos, Mexico, Veracruz, Pichucalco and Santa Martha strains with the Brasil, Argentina and Aguascalientes strains which are closer to the Florida strain from the US and the Azaria strain from Israel. The fact that no relationship with the sequences found for Aguascalientes and Puente de Ixtla, has been found, allows surmising that for now, the limits to diversity are greater than previously considered. Another element to be taken into account is the influence that the tick *Boophilus microplus* as trans state vector of the rickettsia can have in generating diversity^(23,24), because even though it is known

ANAPLASMA MARGINALE: ANÁLISIS DE GENES *mspLx* y *msp4*

Figura 2. Alineación de la secuencia de nucleótidos de MSP4

Figure 2. Sequence alignment of MSP4 nucleotides

<p> PTE_DE_IXTLA 1 ATGAATTACAGAGAATTTTACAGGGGGCTGTACAGCAGCCAGACTGCGCCTGTCC AGUASCALIENTES 1 ATGAATTACAGAGAATTTTACAGGGGGCTGTACAGCAGCCAGACTGCGCCTGTCC PICHUCALCO 1 ATGAATTACAGAGAATTTTACAGGGGGCTGTACAGCAGCCAGACTGCGCCTGTCC STA_MARTHA 1 ATGAATTACAGAGAATTTTACAGGGGGCTGTACAGCAGCCAGACTGCGCCTGTCC MORELOS 1 ATGAATTACAGAGAATTTTACAGGGGGCTGTACAGCAGCCAGACTGCGCCTGTCC MEXICO 1 ATGAATTACAGAGAATTTTACAGGGGGCTGTACAGCAGCCAGACTGCGCCTGTCC </p> <p> PTE_DE_IXTLA 61 CTACTTGTAGTGGGGCCGTAGTGGCATCTCCATGAGTCACGAAGTGGCTTCTGAAGGG AGUASCALIENTES 61 CTACTTGTAGTGGGGCCGTAGTGGCATCTCCATGAGTCACGAAGTGGCTTCTGAAGGG PICHUCALCO 61 CTACTTGTAGTGGGGCCGTAGTGGCATCTCCATGAGTCACGAAGTGGCTTCTGAAGGG STA_MARTHA 61 CTACTTGTAGTGGGGCCGTAGTGGCATCTCCATGAGTCACGAAGTGGCTTCTGAAGGG MORELOS 61 CTACTTGTAGTGGGGCCGTAGTGGCATCTCCATGAGTCACGAAGTGGCTTCTGAAGGG MEXICO 61 CTACTTGTAGTGGGGCCGTAGTGGCATCTCCATGAGTCACGAAGTGGCTTCTGAAGGG </p> <p> PTE_DE_IXTLA 121 GGAGTAATGGGAGTAGCTTTTACGTGGTGGCGCTACAGCCAGCATTCTCTGTGT AGUASCALIENTES 121 GGAGTAATGGGAGTAGCTTTTACGTGGTGGCGCTACAGCCAGCATTCTCTGTGT PICHUCALCO 121 GGAGTAATGGGAGTAGCTTTTACGTGGTGGCGCTACAGCCAGCATTCTCTGTGT STA_MARTHA 121 GGAGTAATGGGAGTAGCTTTTACGTGGTGGCGCTACAGCCAGCATTCTCTGTGT MORELOS 121 GGAGTAATGGGAGTAGCTTTTACGTGGTGGCGCTACAGCCAGCATTCTCTGTGT MEXICO 121 GGAGTAATGGGAGTAGCTTTTACGTGGTGGCGCTACAGCCAGCATTCTCTGTGT </p> <p> PTE_DE_IXTLA 181 ACCTGTTGCACATCGTGAGTCAAGCAAGAGACCTCATACTAGAGGCTATGGCAAG AGUASCALIENTES 181 ACCTGTTGCACATCGTGAGTCAAGCAAGAGACCTCATACTAGAGGCTATGGCAAG PICHUCALCO 181 ACCTGTTGCACATCGTGAGTCAAGCAAGAGACCTCATACTAGAGGCTATGGCAAG STA_MARTHA 181 ACCTGTTGCACATCGTGAGTCAAGCAAGAGACCTCATACTAGAGGCTATGGCAAG MORELOS 181 ACCTGTTGCACATCGTGAGTCAAGCAAGAGACCTCATACTAGAGGCTATGGCAAG MEXICO 181 ACCTGTTGCACATCGTGAGTCAAGCAAGAGACCTCATACTAGAGGCTATGGCAAG </p> <p> PTE_DE_IXTLA 241 AGCATTGCAACGATTGATGTGAGTGTGCCAGCAAACTTTTCAAATCTGGTACAATTT AGUASCALIENTES 241 AGCATTGCAACGATTGATGTGAGTGTGCCAGCAAACTTTTCAAATCTGGTACAATTT PICHUCALCO 241 AGCATTGCAACGATTGATGTGAGTGTGCCAGCAAACTTTTCAAATCTGGTACAATTT STA_MARTHA 241 AGCATTGCAACGATTGATGTGAGTGTGCCAGCAAACTTTTCAAATCTGGTACAATTT MORELOS 241 AGCATTGCAACGATTGATGTGAGTGTGCCAGCAAACTTTTCAAATCTGGTACAATTT MEXICO 241 AGCATTGCAACGATTGATGTGAGTGTGCCAGCAAACTTTTCAAATCTGGTACAATTT </p> <p> PTE_DE_IXTLA 301 GCCTTCTTAAAAAATAACACGCTTTTCGACGGCGCTGTGGATATCTCTAGGAGGA AGUASCALIENTES 301 GCCTTCTTAAAAAATAACACGCTTTTCGACGGCGCTGTGGATATCTCTAGGAGGA PICHUCALCO 301 GCCTTCTTAAAAAATAACACGCTTTTCGACGGCGCTGTGGATATCTCTAGGAGGA STA_MARTHA 301 GCCTTCTTAAAAAATAACACGCTTTTCGACGGCGCTGTGGATATCTCTAGGAGGA MORELOS 301 GCCTTCTTAAAAAATAACACGCTTTTCGACGGCGCTGTGGATATCTCTAGGAGGA MEXICO 301 GCCTTCTTAAAAAATAACACGCTTTTCGACGGCGCTGTGGATATCTCTAGGAGGA </p> <p> PTE_DE_IXTLA 361 GCCAGAGTGAATTTGAAGCGAGCTACAGAAGTTTGTACTTTGGCGGACGGGCGAGTAC AGUASCALIENTES 361 GCCAGAGTGAATTTGAAGCGAGCTACAGAAGTTTGTACTTTGGCGGACGGGCGAGTAC PICHUCALCO 361 GCCAGAGTGAATTTGAAGCGAGCTACAGAAGTTTGTACTTTGGCGGACGGGCGAGTAC STA_MARTHA 361 GCCAGAGTGAATTTGAAGCGAGCTACAGAAGTTTGTACTTTGGCGGACGGGCGAGTAC MORELOS 361 GCCAGAGTGAATTTGAAGCGAGCTACAGAAGTTTGTACTTTGGCGGACGGGCGAGTAC MEXICO 361 GCCAGAGTGAATTTGAAGCGAGCTACAGAAGTTTGTACTTTGGCGGACGGGCGAGTAC </p> <p> PTE_DE_IXTLA 421 GCAAAAAGTGGTGGGAATCTCTGGCAGCTATTACCCGCGACGCTAACATTACTGAGACC AGUASCALIENTES 421 GCAAAAAGTGGTGGGAATCTCTGGCAGCTATTACCCGCGACGCTAACATTACTGAGACC PICHUCALCO 421 GCAAAAAGTGGTGGGAATCTCTGGCAGCTATTACCCGCGACGCTAACATTACTGAGACC STA_MARTHA 421 GCAAAAAGTGGTGGGAATCTCTGGCAGCTATTACCCGCGACGCTAACATTACTGAGACC </p>	<p> MORELOS 421 GCAAAAAGTGGTGGGAATCTCTGGCAGCTATTACCCGCGACGCTAACATTACTGAGACC MEXICO 421 GCAAAAAGTGGTGGGAATCTCTGGCAGCTATTACCCGCGACGCTAACATTACTGAGACC </p> <p> PTE_DE_IXTLA 481 AATTACTTCGTAGTCAAAATGATGAATCACAACACCTCAGTCATGTTAAATGGCTGC AGUASCALIENTES 481 AATTACTTCGTAGTCAAAATGATGAATCACAACACCTCAGTCATGTTAAATGGCTGC PICHUCALCO 481 AATTACTTCGTAGTCAAAATGATGAATCACAACACCTCAGTCATGTTAAATGGCTGC STA_MARTHA 481 AATTACTTCGTAGTCAAAATGATGAATCACAACACCTCAGTCATGTTAAATGGCTGC MORELOS 481 AATTACTTCGTAGTCAAAATGATGAATCACAACACCTCAGTCATGTTAAATGGCTGC MEXICO 481 AATTACTTCGTAGTCAAAATGATGAATCACAACACCTCAGTCATGTTAAATGGCTGC </p> <p> PTE_DE_IXTLA 541 TATGACGTGCTGCACACAGATTTGCTGTGTCGCCGTATGATGTGCCGGATAGGGCGCA AGUASCALIENTES 541 TATGACGTGCTGCACACAGATTTGCTGTGTCGCCGTATGATGTGCCGGATAGGGCGCA PICHUCALCO 541 TATGACGTGCTGCACACAGATTTGCTGTGTCGCCGTATGATGTGCCGGATAGGGCGCA STA_MARTHA 541 TATGACGTGCTGCACACAGATTTGCTGTGTCGCCGTATGATGTGCCGGATAGGGCGCA MORELOS 541 TATGACGTGCTGCACACAGATTTGCTGTGTCGCCGTATGATGTGCCGGATAGGGCGCA MEXICO 541 TATGACGTGCTGCACACAGATTTGCTGTGTCGCCGTATGATGTGCCGGATAGGGCGCA </p> <p> PTE_DE_IXTLA 601 AGCTTTGTGACATCTCTAAGCAAGTAAACACAAGCTGGCCACAGGGGCAAGTTGGG AGUASCALIENTES 601 AGCTTTGTGACATCTCTAAGCAAGTAAACACAAGCTGGCCACAGGGGCAAGTTGGG PICHUCALCO 601 AGCTTTGTGACATCTCTAAGCAAGTAAACACAAGCTGGCCACAGGGGCAAGTTGGG STA_MARTHA 601 AGCTTTGTGACATCTCTAAGCAAGTAAACACAAGCTGGCCACAGGGGCAAGTTGGG MORELOS 601 AGCTTTGTGACATCTCTAAGCAAGTAAACACAAGCTGGCCACAGGGGCAAGTTGGG MEXICO 601 AGCTTTGTGACATCTCTAAGCAAGTAAACACAAGCTGGCCACAGGGGCAAGTTGGG </p> <p> PTE_DE_IXTLA 661 ATTAGCTACCAGTTTACTCCGAAATATCTTGGTGGCAGGTGGTTCTACACGGGCTA AGUASCALIENTES 661 ATTAGCTACCAGTTTACTCCGAAATATCTTGGTGGCAGGTGGTTCTACACGGGCTA PICHUCALCO 661 ATTAGCTACCAGTTTACTCCGAAATATCTTGGTGGCAGGTGGTTCTACACGGGCTA STA_MARTHA 661 ATTAGCTACCAGTTTACTCCGAAATATCTTGGTGGCAGGTGGTTCTACACGGGCTA MORELOS 661 ATTAGCTACCAGTTTACTCCGAAATATCTTGGTGGCAGGTGGTTCTACACGGGCTA MEXICO 661 ATTAGCTACCAGTTTACTCCGAAATATCTTGGTGGCAGGTGGTTCTACACGGGCTA </p> <p> PTE_DE_IXTLA 721 TTTGATGAGTCTTACAGGACATTTCCGCGACACAACAGTGTAAAGTTCTCTGGAGAAGCA AGUASCALIENTES 721 TTTGATGAGTCTTACAGGACATTTCCGCGACACAACAGTGTAAAGTTCTCTGGAGAAGCA PICHUCALCO 721 TTTGATGAGTCTTACAGGACATTTCCGCGACACAACAGTGTAAAGTTCTCTGGAGAAGCA STA_MARTHA 721 TTTGATGAGTCTTACAGGACATTTCCGCGACACAACAGTGTAAAGTTCTCTGGAGAAGCA MORELOS 721 TTTGATGAGTCTTACAGGACATTTCCGCGACACAACAGTGTAAAGTTCTCTGGAGAAGCA MEXICO 721 TTTGATGAGTCTTACAGGACATTTCCGCGACACAACAGTGTAAAGTTCTCTGGAGAAGCA </p> <p> PTE_DE_IXTLA 781 AAAGCCTCAGTCAAAGCGCATATGCTGACTACGGCTTTAACTTTGGGCAAGATTCCTG AGUASCALIENTES 781 AAAGCCTCAGTCAAAGCGCATATGCTGACTACGGCTTTAACTTTGGGCAAGATTCCTG MORELOS 781 AAAGCCTCAGTCAAAGCGCATATGCTGACTACGGCTTTAACTTTGGGCAAGATTCCTG STA_MARTHA 781 AAAGCCTCAGTCAAAGCGCATATGCTGACTACGGCTTTAACTTTGGGCAAGATTCCTG MORELOS 781 AAAGCCTCAGTCAAAGCGCATATGCTGACTACGGCTTTAACTTTGGGCAAGATTCCTG MEXICO 781 AAAGCCTCAGTCAAAGCGCATATGCTGACTACGGCTTTAACTTTGGGCAAGATTCCTG </p> <p> PTE_DE_IXTLA 841 TTCAGTAA 849 AGUASCALIENTES 841 TTCAGTAA 849 PICHUCALCO 841 TTCAGTAA 849 STA_MARTHA 841 TTCAGTAA 849 MORELOS 841 TTCAGTAA 849 MEXICO 841 TTCAGTAA 849 </p>
--	--

Note: * similitud in bases - Deletion

derivadas de dichas secuencias (Cuadros 1,2), muestran que las cepas Pichualco y Sta. Martha, recuperadas del rancho Sta. Martha en Chiapas, comparten las primeras cinco repeticiones entre ellas, al mismo tiempo también comparten las primeras cuatro repeticiones con las cepas México, Morelos y Veracruz. La similitud entre estas cepas sugiere, que siendo todas ellas originarias de la costa este de México, hayan sido transportadas con animales desde el Golfo hacia otros estados incluyendo Chiapas. Al mismo tiempo, la similitud de estas cepas es congruente con la hipótesis de que por presión positiva hayan

that MSP1a acts as ligand for cells in some ticks, it is not known the role played by this protein in transmission by ticks of the *Boophilus* genera. It has been observed that those strains transmitted by *Dermacentor*, are also by *Boophilus*⁽²⁴⁾.

In the case of the *msp4* gene, amplicons obtained through PCR from the four strains, were observed as bands of 800 to 900 pb. Sequences obtained for the four strains contain the same number of base pairs, as well as the same amino acid sequence (Table 1, Figure 3). These sequences coincide in

sufrido modificaciones que resultaron en un incremento en el número de repeticiones en el fragmento variable de MSP1a⁽²²⁾, aumentando así sus oportunidades de permanecer en la naturaleza, ya que este segmento es altamente inmunogénico. Por otro lado, las cepas Aguascalientes y Pte. de Ixtla, son diferentes entre sí, y de todas las otras ya secuenciadas, tanto en el número de repeticiones como en las secuencias mismas para MSP1a, ya que algunas de las repeticiones que presentan no se habían publicado previamente, lo cual indica un origen diferente al de las otras cepas.

El árbol filogenético (Figura 2) muestra la relación que presentan las cepas Morelos, México, Veracruz, Pichucalco y Sta. Martha con las cepas Brasil, Argentina y Puente de Ixtla y las cepas Yucatán y Aguascalientes están más relacionados con la cepa Florida de Estados Unidos y la cepa Azaria de Israel. El hecho de que no exista relación con las secuencias encontradas para Aguascalientes y Pte de Ixtla hace que por el momento y con los datos reportados, se pueda especular que los límites de esta diversidad

full with the Mexican strains already reported, which contain 849 pb, at the same time coincide 99 % with strains from Brazil, Argentina, Australia, Puerto Rico, Italy, Venezuela, Spain, Israel, Zimbabwe and the US^(14,17). In the phylogenetic tree (Figure 4) the relationship between Mexican strains and those from Argentina, Brazil and Venezuela. A more distant relationship is found with Florida and Switzerland strains, and on the other hand strains from China, Italy, Kenya, South Africa and Zimbabwe were observed.

Generated data suggest that more studies should be carried out at the national level to determine the limits of the diversity present in the used markers and therefore to set up a database able to be used for immunogen design which could include fragments of this protein. Considering that transmission capacity of *Anaplasma* by ticks rests in MSP1a variable fragment⁽²⁰⁾, a national sequence bank could of great value for analysis of transmission by ticks in accordance with existing sequences.

Figura 3. Árbol filogenético de *msp1α* de las cepas de estudio y diferentes aislados del mundo, utilizando el algoritmo Neighbor Joining (Clustal W)

Figure 3. *msp1α* phylogenetic tree for studied strains and for different isolates worldwide, using the Neighbor Joining (Clustal W) algorithm

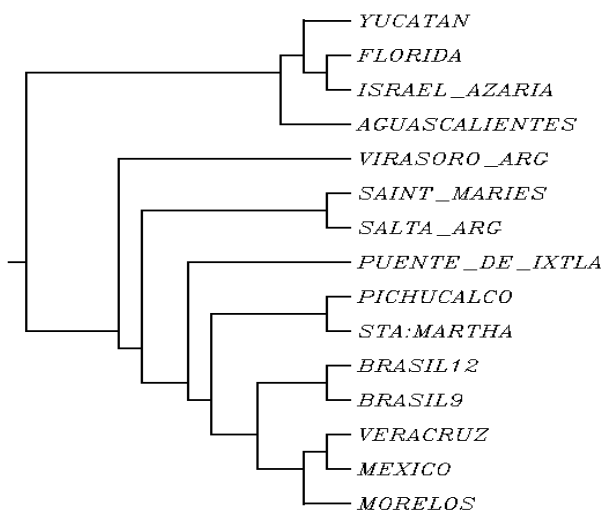
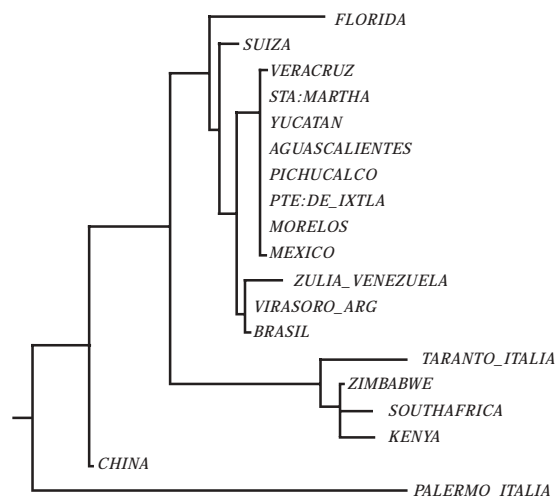


Figura 4. Árbol filogenético de *msp4* de las cepas de estudio y diferentes aislados del mundo utilizando el algoritmo Neighbor Joining (Clustal W)

Figure 4. *msp4* phylogenetic tree for studied strains and for different isolates worldwide, using the Neighbor Joining (Clustal W) algorithm



son mucho más amplios de lo que se había considerado. Otro elemento a considerar es la influencia que la garrapata *Boophilus microplus* como vector trans-estadial de la rickettsia^(23,24), pueda tener dentro de la generación de diversidad en esta rickettsia, ya que aunque se sabe que MSP1a es un ligando para células de algunas garrapatas, se desconoce que papel juega esta proteína en relación con su transmisibilidad por garrapatas del género *Boophilus*, pero se ha observado que aquellas cepas que son transmisibles por *Dermacentor*, también lo son por *Boophilus*⁽²⁴⁾.

En el caso del gen *msp4*, los amplicones obtenidos por PCR de las cuatro cepas, se observaron como bandas de 800 a 900 pb. Las secuencias obtenidas para las cuatro cepas contienen el mismo número de pares de bases, así como también la misma secuencia de aminoácidos (Cuadro 1, Figura 3), Estas secuencias coinciden en 100 % con las cepas mexicanas ya reportadas, que contienen 849 pb; al mismo tiempo coinciden en 99 % con las cepas de Brasil, Argentina, Australia, Puerto Rico, Italia, Venezuela, España, Israel, Zimbabwe y EUA^(14,17). En el árbol filogenético (Figura 4), se muestra la relación existente de las cepas mexicanas y las cepas de Venezuela, Argentina y Brasil; un poco más distantes se encuentran las cepas Florida y Suiza; por otro lado se observan cepas de China, Italia, Zimbabwe, Kenia y Sudáfrica.

Los datos generados sugieren que se deben hacer más estudios a nivel nacional para determinar la extensión de la diversidad presente en los marcadores usados, y con ello establecer una base de datos que pueda ser usada para el diseño de inmunógenos que puedan incluir fragmentos de esta proteína. Más aún, dado que se sabe que la capacidad de transmisibilidad de *Anaplasma* por garrapatas radica en el fragmento variable de MSP1a⁽²⁰⁾, un banco de secuencias nacionales podría ser muy valioso en el análisis de la transmisibilidad por garrapatas de las cepas de acuerdo a las secuencias presentes.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al personal de SENASICA, en Jiutepec, Mor, por la sangre infectada con los aislados Pte.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to express their special gratitude to the Jiutepec, Mor. SENASICA staff, for providing blood infected by the Puente de Ixtla and Aguascalientes strains and also to SEP-CONACYT for funding this study through Project No. 44565.

End of english version

de Ixtla y Aguascalientes. Este estudio fue financiado con fondos del proyecto SEP-CONACYT No. 44565.

LITERATURA CITADA

- Ristic M. Studies of anaplasmosis. I. Filtration of causative agent. *Am J Vet Res* 1960;21:890-894.
- Rodríguez SD, García Ortiz MA, Hernández Salgado G, Santos Cerda NA, Aboites Torre R, Canto Alarcón GJ. *Anaplasma marginale* inactivated vaccine: dose titration against a homologous challenge. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2000;23:239-52.
- Osorno MB, Ristic M. Anaplasmosis bovina con énfasis en control, diagnóstico, distribución de la enfermedad en México y uso de una vacuna atenuada de *Anaplasma marginale*. *Vet Méx* 1977;8:85-98.
- Palmer GH, Brown WC, Rurangirwa FR. Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Microbes Infect* 2000;2(2):167-76.
- Bock ER, Albertus JV, Kingston TG, Carter PD. Assessment of a low virulence Australian isolate of *Anaplasma marginale* for pathogenicity, immunogenicity and transmissibility by *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol* 2003 1;118(1-2):121-31.
- Maas J. Buying bulls: protecting your investment & protecting your herd [on line]. http://www.vetmed.ucdavis.edu/vetext/INF-BE_cca/INF-BE_cca05/cca050708-BullDisPrv.pdf. Accessed Jul 17, 2007.
- Palmer GH, McGuire TC. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *J Immunol* 1984;133:1010-1015.
- De la Fuente J, Golsteyn Thomas EJ, van den Bussche RA, Hamilton RG, Tanaka EE, Druhan SE, Kocan KM. Characterization of *Anaplasma marginale* isolated from North American bison. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(8):5001-5005.
- Allred DR, McGuire TC, Palmer GH, Leib SR, Harkins TM, McElwain TF, Barbet AF. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87(8):3220-4.
- De la Fuente, J, Van Den Bussche RA, Kocan KM. Molecular phylogeny and biogeography of north American isolates of

- Anaplasma marginale* (Rickettsiae: Ehrlichieae). *Vet Parasitol* 2001;97(1):65-76.
11. De la Fuente J, Passos LM, Van Den Bussche RA, Ribeiro MF, Facury-Filho EJ, Kocan KM. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol* 2004;121(3-4):307-316.
 12. McGarey DJ, Allred DR. Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. *Infect Immun* 1994;62:4587-4593.
 13. Garcia-Garcia JC, de la Fuente J, Bell-Eunice G, Blouin EF, Kocan KM. Glycosylation of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and its putative role in adhesion to tick cells. *Infect Immun* 2004;72(5):3022-30.
 14. De la Fuente J, Rubial P, Mtshali MS, Naranjo V, Shuqing L, Mangold AJ, Rodríguez SD, *et al.* Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequence. *Vet Microbiol* 2006;119:382-390.
 15. De la Fuente J, Van Den Bussche RA, Garcia-Garcia JC, Rodriguez SD, Garcia MA, Guglielmone AA, Mangold AJ, *et al.* Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. *Vet Microbiol* 2002;88(3):275-85.
 16. Lew AE, Bock RE, Minchin CM, Masaka S. A msp1a alpha polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. *Vet Microbiol* 2002;86:325-335.
 17. De la Fuente J, Lew A, Lutz H, Meli ML, Hofmann-Lehmann R, Shkap V, Molad T, *et al.* Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. *Anim Health Res Rev* 2005;6:75-89.
 18. Orozco VLE, Rodríguez SD, Canto AGJ, López FR, Jiménez OR, García OMA, Preciado JF, Rojas RE. *Anaplasma marginale* field challenge: Protection by an inactivated immunogen that shares partial sequence of *msp1a* variable region with the challenge strain. *Vaccine* 2007;25:519-525.
 19. Palmer GH, Knowles DP Jr, Rodríguez JL, Gnad DP, Hollis LC, Marston T, Brayton KA. Stochastic transmission of multiple genotypically distinct *Anaplasma marginale* strains in a herd with high prevalence of *Anaplasma* infection. *J Clin Microbiol* 2004;42:5381-5384.
 20. De la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, McEwen BR, Clawson D, Kocan KM. Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of *Anaplasma marginale*. *Int J Parasitol* 2001;31:1705-1714.
 21. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acid Res* 1994;22:4673-4680.
 22. De la Fuente J, Van Den Bussche RA, Prado TM, Kocan KM. *Anaplasma marginale msp1alpha* genotypes evolved under positive selection pressure but are not markers for geographic isolates. *J Clin Microbiol* 2003;41(4):1609-1616.
 23. Aguirre DH, Gaido AB, Vinabal AE, De Echaide ST, Guglielmone AA. Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different levels of rickettsaemia. *Parasite* 1994;1(4):405-407.
 24. Scoles GA, Ueti MW, Noh SM, Knowles DP, Palmer GH. Conservation of transmission phenotype of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) strains among Dermacentor and Rhipicephalus ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 2007;44(3):484-91.