

# Diversidad genética de la región variable de los genes *msp1a* y *msp4* en cepas de *Anaplasma marginale* de México

## Genetic diversity of the *msp1a* gene variable region and *msp4* gene of *Anaplasma marginale* strains from Mexico

Rafael Jiménez Ocampo<sup>a</sup>, Carlos Agustín Vega y Murguía<sup>b</sup>, Nayelli Oviedo Ortega<sup>b</sup>, Edmundo Enrique Rojas Ramírez<sup>b</sup>, Miguel Ángel García Ortiz<sup>b</sup>, Jesús Francisco Preciado de la Torre<sup>b</sup>, Rodrigo Rosario Cruz<sup>b</sup>, Delia Inez Domínguez García<sup>c</sup>, Sergio D. Rodríguez Camarillo<sup>b</sup>

### RESUMEN

La anaplasmosis es de difícil control debido a la diversidad genética de la rickettsia. La proteína Msp1a, compuesta de repetidos variables de entre 23 y 31 aminoácidos en su región variable y la proteína Msp4, son dos de las proteínas de superficie más estudiadas en *A. marginale* y han sido ampliamente usadas como marcadores genéticos en la caracterización de cepas de *A. marginale* de diferentes orígenes geográficos. En este trabajo se analizaron, la región variable de la proteína Msp1a y la proteína Msp4 de 10 cepas mexicanas. En el caso de Msp1a, se observó un patrón de segregación que contiene los repetidos  $\alpha\beta\beta\Gamma$  en diferentes modalidades a lo largo de aislamientos del Golfo de México, principalmente en zonas de estabilidad enzoótica, mientras que la máxima variabilidad se presentó en Tamaulipas, en aislamientos de un brote de la enfermedad, es decir en zonas de inestabilidad. La diversidad observada no es tan extensa como se esperaba y, misma que se puede explicar por la presión que el sistema inmune del hospedero ejerce contra la rickettsia y los mecanismos de esta última para evadirla. En el caso de la proteína Msp4, la secuencia fue altamente conservada tanto en nucleótidos como en aminoácidos para los aislados en estudio, aunque, se observan diferencias con lo previamente reportado en México para este marcador.

**PALABRAS CLAVE:** *Anaplasma marginale*, Proteínas de superficie, *msp1a*, *msp4*, Diversidad genética, México, Bovinos, Anaplasmosis bovina.

### ABSTRACT

Control of anaplasmosis is limited due to the rickettsia's wide genetic diversity. Major surface protein (Msp) 1a is composed of one constant region and a variable region which may contain one or more 23 – 31 amino acid repeat sequences. Msp1a variable region together with Msp4 have been used for phylogenetic purposes. We analyzed the variable region of Msp1a and Msp4 gene of ten new Mexican *A. marginale* strains and compared with previously published sequences in order to correlate the structure of these genes with geographic distribution. In the case of Msp1a, there were geographically distant strains that shared the same variable region, whereas strains from the same outbreak or the same region showed very different structures. Wide diversity in this region had been observed with previous analysis yet a pattern composed by several repeats emerged along organisms isolated from the Mexican gulf coast states. This variation can be explained in part by the immune system pressure over the organism, yet other independent transmission events have to be considered. In the case of Msp4, little variation was observed at the nucleotide level which did not affect the amino acid structures along the new strains analyzed, yet there are differences with previously published for Mexican isolates.

**KEY WORDS:** *Anaplasma marginale*, Surface proteins, Msp1a, Msp4, Genetic diversity, México, Cattle, Bovine anaplasmosis.

Recibido El 16 de agosto de 2011. Aceptado El 14 de noviembre de 2011.

<sup>a</sup> C.E. Valle del Guadiana, Durango. INIFAP. México.

<sup>b</sup> CENID-PAVET, INIFAP. Carr. Cuernavaca - Cuautla No 8534, Col. Progreso, Jiutepec, Mor. 62550, México. sergeiyevsky@yahoo.com; rodriguez.sergio@inifap.gob.mx. Correspondencia al último autor.

<sup>c</sup> Universidad Autónoma de Guerrero. Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Ambientales.

Trabajo Financiado por proyecto CONACYT-SEP P62525.

## INTRODUCCION

La anaplasmosis bovina es una enfermedad hemolítica que afecta económicamente a la producción ganadera en diferentes países, incluido México<sup>(1)</sup> y es producida por la rickettsia *A. marginale* que presenta gran diversidad genética y antigénica<sup>(2)</sup>, lo que limita su control mediante vacunas, por lo que aún cuando la vacunación es la forma idónea de control, hasta el momento no se cuenta con vacunas inactivadas efectivas. En México a pesar de que se tiene éxito con una cepa de baja virulencia y con las vacunas homólogas inactivadas a nivel experimental, no existen vacunas comerciales para el control de la enfermedad y sólo algunos países usan de manera rutinaria, cepas de *A. marginale* de baja virulencia<sup>(3)</sup>.

En el genoma de este microorganismo se han descrito ampliamente seis genes de importancia para estudios moleculares, *msh1α*, *msh1β*, *msh2*, *msh3*, *msh4* y *msh5*, en los que están codificadas las correspondientes proteínas principales de superficie de la rickettsia, algunas de las cuales constituyen blancos de la respuesta inmune del hospedero contra el patógeno<sup>(3-5)</sup>. De estas proteínas, Msh1a<sup>(6)</sup> presenta polimorfismo entre distintos aislados de *A. marginale* y otras más, sufren de variaciones dentro del propio animal evadiendo así la respuesta inmune del hospedador. Por el contrario, Msh4, es ampliamente conservada entre aislados geográficos y se usa como marcador filogenético<sup>(7)</sup>. Para la caracterización molecular de la diversidad genética de los aislados se han usado marcadores moleculares como la región variable de la proteína Msh1a y la proteína Msh4. Msh1a es una proteína de superficie codificada por el gen *msh1α*, conformada de un dominio conservado y un dominio variable compuesto de uno o varios polipéptidos muy semejantes entre sí llamados repetidos, cada uno compuesto de 23 a 31 aminoácidos y de los que se pueden encontrar hasta 11 secuencias en tándem, iguales o diferentes<sup>(6,7)</sup>. Estudios de caracterización molecular de aislados geográficos de *A. marginale* demuestran amplia diversidad genética, lo que sugiere que el gen *msh1α* se encuentra bajo presión positiva por parte

## INTRODUCTION

Bovine anaplasmosis is a haemolytic disease that economically affects cattle production in many countries, including Mexico<sup>(1)</sup>. The causative agent is *Anaplasma. marginale*, a rickettsial pathogen that shows wide genetic and antigenic diversity<sup>(2)</sup> which limits its control by the use of vaccines, thus despite vaccination being the choice measure for control, currently there are no effective inactivated vaccines. In Mexico, while the use of a low virulence strain and inactivated homologous vaccines have been successful, there are no commercial vaccines for control of the disease and only some countries use routine low virulence *A. marginale* strains<sup>(3)</sup>.

Within the genome of this microorganism, six important genes have been described for molecular studies: *msh1α*, *msh1β*, *msh2*, *msh3*, *msh4* y *msh5*, which encode correspondent main surface proteins of the rickettsia. Some of these proteins constitute immune response targets of the host against the pathogen<sup>(3-5)</sup>. Msh1a<sup>(6)</sup> for example, is polymorphic among different isolates of *A. marginale*. Other proteins suffer recombination within the animal avoiding the immune response of the host. Conversely, Msh4 is very conserved within widely different geographical isolates and is used as phylogenetic marker<sup>(7)</sup>. Molecular characterization of genetic diversity of isolates is based on markers such as the variable region of Msh1a and Msh4 proteins. Msh1a is a surface protein encoded by *msh1α* gene, constituted by a conserved domain and a variable domain composed of one or several peptides very similar among them known as repeats, 23 to 31 amino acids each, from which 11 equal or different sequences may be found in tandem<sup>(6,7)</sup>. Molecular studies of *A. marginale* geographical isolates demonstrate wide genetic diversity, which suggests that *msh1α* is under positive pressure from the host's immune system<sup>(8)</sup>. The variable fragment of this protein is exposed on the rickettsial membrane, and it is known that it has adhesion-receptor/ligand binding properties towards a non-identified receptor in bovine erythrocytes and certain *Dermacentor*

del sistema inmune del hospedero<sup>(8)</sup>. 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*<sup>(10)</sup>, se le atribuye un papel importante en la inmunidad 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<sup>(11)</sup>. Estrada-Peña *et al*<sup>(12)</sup> reportan la primera evidencia de evolución del gen *msp1α* de *A. marginale* relacionado con los rasgos ecológicos que afectan el desarrollo de la garrapatas. La proteína MSP4 de 31 kDa, codificada por el gen *msp4*, es altamente conservada entre los distintos aislados de *A. marginale*. Contiene bloques de aminoácidos relacionados con la proteína MSP2<sup>(13)</sup>. Aunque se cree que es de baja capacidad inmunoprotectora, ha sido usada en estudios filogenéticos dada su baja variabilidad, y actualmente se realizan estudios con rMSP4 para evaluar su potencial inmunogénico<sup>(14)</sup>. En México se reporta que MSP4 es altamente conservada en aislados de diferentes regiones geográficas y aislados de un mismo brote<sup>(15,16)</sup>. Para plantear estrategias de control efectivas en contra del microorganismo se requiere conocer la epidemiología molecular de aislados nacionales de *A. marginale*, por lo que el objetivo de este estudio fue caracterizar la diversidad genética de cepas mexicanas de *Anaplasma marginale* usando como marcadores las secuencias de los genes *msp1α* (región variable) y *msp4*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Colección y nomenclatura de las muestras*

Para el presente trabajo se obtuvieron muestras de sangre de bovinos infectados en campo, provenientes de diferentes regiones geográficas de México: Yucatán, Veracruz, Tamaulipas, Hidalgo, Nayarit y Chiapas, dando un total de 10 aislados

*variabilis* and *Ixodes scapularis* tick cells<sup>(9)</sup>. This region also plays an important role in bovine immunity and in tick invasion and transmissibility. The diversity observed in this protein is important since it directly affects the design and development of immunogens that could confer broad-spectrum protection against this disease<sup>(10)</sup>. Estrada-Peña *et al*<sup>(11)</sup> report the first evolutionary evidence of *A. marginale msp1α* gene associated with ecological features that affect development of the tick. The 31-kDa MSP4 protein, encoded by *msp4* gene, is highly conserved among different *A. marginale* isolates. MSP4 contains amino acid blocks associated with MSP2<sup>(12)</sup>. Although it is believed that MSP4 is not immunoprotective, it has been used in phylogenetic studies due to its low variability, and currently, studies with rMSP4 are being carried out to evaluate its immunogenic potential<sup>(13)</sup>. In Mexico, it is reported that MSP4 is highly conserved in isolates both from different geographical regions and isolates from the same outbreak<sup>(14,15)</sup>. The design of effective control strategies against the microorganism, requires a more complete knowledge of the molecular epidemiology of *A. marginale* national isolates, thus, the objective of this study was to characterize the genetic diversity of *Anaplasma marginale* Mexican strains based on the sequences of *msp1α* and *msp4* (variable region) genes as markers of diversity.

## MATERIALS AND METHODS

### *Sample collection and nomenclature*

Blood samples from field-infected bovines were obtained from different geographical regions of Mexico: Yucatan, Veracruz, Tamaulipas, Hidalgo, Nayarit and Chiapas. A total of 10 different isolates were obtained for this work (Table 1). Animals from which blood was collected showed typical clinical signs of the disease; direct diagnosis of the disease was performed by nested polymerase chain reaction (PCR), amplifying *msp5* gene<sup>(16,17)</sup>, only to provide proof of presence of *A. marginale*. In the case of the nomenclature of isolates, National Institute for Statistics and Geography (INEGI) codes were used to describe the state, municipality and number of isolate obtained for this study, as previously reported<sup>(18)</sup>.

Cuadro 1. Estructura de los repetidos en aislados mexicanos analizados para el marcador *msp1α*. Análisis de los genotipos con base a las secuencias de la región variable de *msp1α* de aislados mexicanos secuenciados en este estudio (\*) y comparados con los reportados previamente

Table 1. Structure of repeats in Mexican isolates analyzed for *msp1α* marker. Analysis of genotypes based on sequences of *msp1α* variable region of Mexican sequenced isolates of this study (\*) and compared with previously reported

Isolate	Repeats								Rep. No
Florida, E.U <sup>6</sup>	A	B	B	B	B	B	B	B	8
Mex-31-096-01 Tizimin, Yuc. <sup>10</sup>	T	C	B	B	C	B	$\pi$		7
*Mex-30-130-01 Playa Vicente, Ver.	T	C	B	B	C	B	C		7
*Mex-30-184-03 Tlapacoyan, Ver.	T	C	B	B	C	C			6
Mex-15-099-01 Texcoco, Mex. <sup>10</sup>	$\alpha$	$\beta$	$\beta$	$\Gamma$					4
Mex-17-030-01 Yautepec, Mor. <sup>10</sup>	$\alpha$	$\beta$	$\beta$	$\Gamma$					4
Mex-30-193-01 Veracruz, Ver. <sup>10</sup>	$\alpha$	$\beta$	$\beta$	$\Gamma$					4
*Mex-18-017-01 Tepic, Nay.	$\alpha$	$\beta$	$\beta$	$\Gamma$					4
Mex-07-068-01 Pichucalco, Chis. <sup>14</sup>	$\alpha$	$\beta$	$\beta$	$\Gamma$	$\beta$	$\Gamma$			6
Mex-07-068-02 Sta. Martha, Chis. <sup>14</sup>	$\alpha$	$\beta$	$\beta$	$\Gamma$	$\beta$				5
Tamaulipas 17 y 18 (G10) <sup>15</sup>	$\alpha$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\Gamma$				5
*Mex-07-065-01 Palenque, Chis.	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\Gamma$				5
*Mex-30-184-02 Tlapacoyan, Ver.	73	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\Gamma$				5
Tamaulipas 15 (G9) <sup>15</sup>	$\tau$	57	13	18					4
*Mex-14-010-01 Atitalaquia Hgo.	$\tau$	57	13	18					4
*Mex-28-037-01 Soto la Marina, Tam.	$\tau$	57	13	18					4
*Mex-28-037-02 Soto la Marina, Tam.	28	29	74	29	M	F			6
*Mex-30-184-01 Tlapacoyan, Ver.	72	C	F						3
*Mex-31-089-01 Ticul, Yuc.	F	M	M						3
Mex-17-017-01 Pte. de Ixtla, Mor. <sup>14</sup>	12	13	14						3
Mex-01-001-01 Aguascalientes, Ags. <sup>14</sup>	4	9	10	11	9				5
Tamaulipas 1 (G1) <sup>15</sup>	56	57	58	59					4
Tamaulipas 13 (G2) <sup>15</sup>	4	9	10	10	9				5
Tamaulipas 4 (G3) <sup>15</sup>	60	61	61	62	61				5
Tamaulipas 7, 9, 10 y 12 (G4) <sup>15</sup>	4	63	63	27	12				5
Tamaulipas 11 (G5) <sup>15</sup>	67	68	63	27	12				5
Tamaulipas 14 (G6) <sup>15</sup>	69	61	70	71	61				5
Tamaulipas 5 (G7) <sup>15</sup>	64	65	D	65	66				5
Tamaulipas 6 y 8 (G8) <sup>15</sup>	D	65	D	65	66				5

Three different repeats not previously reported were found in Soto la Marina 2 (72), Tlapacoyan 01 (73) and Tlapacoyan 02 (74) isolates. <sup>6</sup>Allred *et al.*, 1990; <sup>(10)</sup>de la Fuente *et al.*, 2001; <sup>(14)</sup>Jimenez *et al.*, 2008; <sup>(15)</sup>Almazan *et al.*, 2008, as cited in the literature section.

diferentes (Cuadro 1). Los animales de los que se colectó la sangre presentaban signos clínicos típicos de la enfermedad, se realizó el diagnóstico directo de la enfermedad por medio de Reacción en Cadena

*DNA extraction and amplification by PCR*

Genomic DNA extraction was done using the Ultra Clean™ Genomic DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc.). DNA was subjected to PCR in a

de la Polimerasa (PCR) anidada, amplificando el gen *msp5*<sup>(17,18)</sup>, sólo para comprobar la presencia de *A. marginale*. En el caso de la nomenclatura de los aislados se utilizaron las claves utilizadas por INEGI para describir el estado, municipio y número de aislamiento obtenido para este estudio, de acuerdo a lo reportado previamente<sup>(19)</sup>.

#### *Extracción de ADN y amplificación por PCR*

La extracción de ADN genómico se realizó mediante el kit comercial Ultra Clean™ DNA genomic, (MO BIO Laboratories Inc.). El ADN fue sometido a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando un volumen de 25 ml, empleando la mezcla de reacción PCR Master mix system (Promega, Madison, WI, USA). 0.1-1 ng de ADN y 10 pmol de los siguientes iniciadores: *msp1α* sentido 5'-GTGCTTATGGCAGACATTTCC-3' y antisentido 5'-CTCAACACTCGCAACCTTGG-3'; ubicados en las regiones conservadas que flanquean la región variable del gen *msp1α*<sup>(20)</sup>; con los siguientes pasos en el termociclador: desnaturalización a 95 °C por 120 seg, alineación a 56 °C por 60 seg y extensión a 72 °C por 60 seg, con 36 ciclos y un paso final de extensión a 72 °C por 10 min; para la amplificación del gen *msp4* se utilizaron los iniciadores sentido 5'-GGGAGCTCCTATGAATTACAGAGAATTGTTTAC-3' y antisentido 5'-CCGGATCCTTAGCTGAACAGGAATCTTGC-3'; con el siguiente programa: desnaturalización 94 °C por 120 seg, alineación a 60 °C por 60 seg y extensión a 72 °C por 60 seg con 35 ciclos y un paso final de extensión a 72 °C por 10 min<sup>(21)</sup>. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador Biometra®, (Goettingen, Germany). Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1.0 %, el tamaño de los amplicones fue comparado con un marcador de peso molecular de 1 Kb (EZ Load 100 bp PCR Molecular Ruler, Bio-Rad). Las secuencias de cada gen se verificaron por clonación en un vector pGEM Promega® (Madison WI). Por cada amplicón se seleccionaron diez clones recombinantes que tuvieran el inserto del tamaño esperado o igual al del control positivo de ADN genómico, tres clones con el inserto verificado se

25 ml volume, utilizing PCR Master Mix system (Promega, Madison, WI, USA): 0.1-1 ng of DNA and 10 pmol of the following primers: *msp1α*-forward, 5'-GTGCTTATGGCAGACATTTCC-3' and *msp1α*-reverse, 5'-CTCAACACTCGCAACCTTGG-3', located within the conserved regions that flank *msp1α* variable region<sup>(19)</sup>; with the following thermocycler steps: denaturation at 95 °C for 120 sec, alignment at 56 °C for 60 sec and extension at 72 °C for 60 sec, with 36 cycles and a final extension step at 72 °C for 10 sec; for *msp4* gene amplification, the following primers were used: forward, 5'-GGGAGCTCCTATGAATTACAGAGAATTGTTTAC-3' and reverse, 5'-CCGGATCCTTAGCTGAACAGGAATCTTGC-3'; with the following program: denaturation at 94°C for 120 sec, alignment at 60 °C for 60 sec and extension at 72 °C for 60 sec with 35 cycles and a final extension step at 72 °C for 10 min<sup>(20)</sup>. The reactions were carried out on a Biometra® thermocycler (Goettingen, Germany). PCR products were subjected to 1.0% agarose gel electrophoresis, amplicon size was compared with a 1 Kb molecular weight marker (EZ Load 100 bp PCR Molecular Ruler, Bio-Rad). Sequences for each gene were verified by cloning using Promega pGEM® Vector (Madison WI). For each amplicon, 10 recombinant clones, having the expected insert size or equal to the genomic DNA positive control were selected; three clones with the verified insert were grown in LB medium containing ampicillin for 12 h and plasmid DNA was extracted using a commercial kit (Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System); DNA was quantified through a spectrophotometer (Thermo Scientific NanoDrop, MA, USA) and three clones were sent for sequencing to the Instituto de Biotecnología of the UNAM, using forward and reverse primers at a concentration of 600 ng/16 µl. Sequences and chromatograms were obtained from three clones of each isolate using BioEdit program and three FASTA sequences of each isolate were aligned using ClustalW conglomerate program (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>), to obtain a consensus sequence in which open reading frames (ORFs) were localized by NCBI online servers (<http://www.ch.embnet.org/software/>

crecieron en medio LB con ampicilina por 12 h y se extrajo el ADN plasmídico con un kit comercial (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purifications System Promega); el ADN se cuantificó en un espectrofotómetro (NanoDrop Thermo scientific MA, USA) y se enviaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM, tres clonas en sentido y antisentido en una concentración de 600 ng/16 ml. Se obtuvieron las secuencias y cromatogramas de las tres clonas de cada aislado con el programa BioEdit y las tres secuencias FASTA de cada aislado se alinearon mediante un programa de conglomerados ClustalW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>), para obtener una secuencia consenso en la cual se localizaron los marcos de lectura abiertos (ORF) mediante la utilidad en línea del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). En las secuencias de aminoácidos fueron identificados los repetidos del gen *msp1a*. Con los dos marcadores se realizó un análisis filogenético de las secuencias obtenidas de los nuevos aislados no reportados y los aislados previamente reportados en México, con base en el algoritmo Neighbor-Joining.

Los repetidos previamente reportados que fueron utilizados para los análisis bioinformáticos fueron obtenidos del GenBank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) MSP1A: EU283847-EU283856, DQ501242-DQ501244, EF053268, ACM49259.1, ABO09627, ABF56507-ABF56509. MSP4: EU283843-EU283846, EF053264-EF053267, ACM48956.1, AAN09910.1, ABO09623-ABO09626. MSP4: EU283847-EU283856, ABO09623-ABO09625, AF428083, AF428089, YP002563212, AF428090.

## RESULTADOS

En este trabajo se colectaron diez muestras de sangre de bovinos de diferentes regiones de México que resultaron positivas en la amplificación por PCR anidado del gen *msp5*, lo que nos confirmó el diagnóstico de la presencia de *A. marginale*<sup>(15)</sup> (datos no mostrados). Estas 10 muestras fueron obtenidas de seis Estados de la República (Cuadro

ClustalW.html). The *msp1a* gene repeats were identified in amino acid sequences. With both open reading frames, a phylogenetic analysis of the sequences obtained from non-reported new isolates and previously reported Mexican isolates, based on Neighbor- Joining algorithm was performed.

The previously reported repeats used for bioinformatic analysis were obtained from NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), MSP1A: EU283847-EU283856, DQ501242-DQ501244, EF053268, ACM49259.1, ABO09627, ABF56507-ABF56509. MSP4: EU283843-EU283846, EF053264-EF053267, ACM48956.1, AAN09910.1, ABO09623-ABO09626. MSP4: EU283847-EU283856, ABO09623-ABO09625, AF428083, AF428089, YP002563212, AF428090.

## RESULTS

In this study, 10 bovine blood samples collected from different geographical regions of Mexico resulted positive at nested PCR amplification of *msp5* gene, which confirmed the diagnosis of *A. marginale* presence<sup>(15)</sup> (data not shown). These 10 samples were obtained from six Mexican states (Table 1). Three of these isolates Mex-30-184-01, Mex-30-184-02 and Mex-30-184-03, were obtained from one outbreak of the disease in a ranch in the municipality of Tlapacoyan, Veracruz; conversely, two samples Mex-28-037-01 and Mex-28-037-02, were obtained from a municipality in Soto la Marina, Tamaulipas, but from different ranches.

Table 1 shows the recovered isolates in this study (shaded), and others previously reported. Additionally, the composition of repeats in the variable fragment of *Msp1a* for all of them is also depicted. Table 2 shows sequences and NCBI access numbers of repeats 72, 73 and 74 from Tlapacoyan 01, Tlapacoyan 02 and Soto la Marina 02 isolates, respectively, and previously unreported.

Analysis of *msp1a* gene variable region showed similarities among repeats, particularly in the case of the isolates, Atitalaquia, Hidalgo and Soto la

1). Tres de estos aislados (Mex-30-184-01; Mex-30-184-02; Mex-30-184-03) se obtuvieron de un solo brote de la enfermedad en un mismo rancho en Tlapacoyan, Veracruz; por otro lado, se obtuvieron dos muestras (Mex-28-037-01 y Mex-28-037-02) del mismo municipio en Soto la Marina, Tamaulipas, pero de ranchos diferentes.

En el Cuadro 1 se observan los aislados recuperados en este estudio (asteriscos), y otros previamente reportados; asimismo, se muestra la composición de los repetidos en el fragmento variable de *MSP1a* para todos ellos. En el Cuadro 2 se presentan las secuencias y los números de acceso de tres repetidos 72, 73 y 74 para los aislados Tlapacoyan 01, Tlapacoyan 02 y Soto la Marina 02 respectivamente, no reportados previamente.

Al comparar la estructura de la región variable del gen *mSP1α*, existen similitudes entre los repetidos como en el caso particular de los aislados Atitalaquia, Hidalgo y 01 de Soto la Marina, Tamaulipas, las cuales son idénticas a pesar de ser originarios de lugares muy distantes. Asimismo, existe una alta coincidencia entre los aislados de Veracruz, Playa Vicente y Tlapacoyan 01, excepto por el repetido “B” en la 6° posición del primero, que está ausente en el segundo. Entre otros aislados que presentan alto grado de similitud se encuentran Palenque, Chis y 02 de Tlapacoyan con el mismo número de repetidos, pero el repetido  $\beta$  de la 1°

Marina 01, Tamaulipas, which are identical despite coming from distant places. Likewise, there is great coincidence among isolates from Playa Vicente and Tlapacoyan 01, both from Veracruz where, except the repeat at 6<sup>th</sup> position which in the first isolate is a “B” repeat, absent in the second.

Likewise, isolates Palenque, Chis and Tlapacoyan 02 (Ver.) with the same number of repeats, differed only at the first position where “ $\beta$ ” repeat in Palenque isolate is replaced by repeat “73” in Tlapacoyan isolate (Table 1).

At a lower degree of similarity, Palenque isolate is similar to Tlapacoyan and Tepic isolates conserving the  $\beta \beta \Gamma$  motif in their structures. In contrast, for isolates Mex-28-037-01 and Mex-28-037-02, collected at two different ranches in simultaneous outbreaks in Soto la Marina, Tamaulipas, there was no coincidence in any of their repeats. Likewise, for isolates Mex-30-184-01, Mex-30-184-02 and Mex-30-184-03 isolates of the same Tlapacoyan, Veracruz ranch, except for “C” repeat in 01 and 03 isolates there are no similarities among them.

Taking the total of analyzed isolates, it was observed that the  $\alpha \beta \beta \Gamma$  motif, besides being present in Tepic isolate of this study, it is present in isolates Texcoco, Yautepec and Veracruz<sup>(10)</sup>, further the motif it is also present in isolates in

Cuadro 2. MSP1a secuencias no reportadas de *A. marginale*

Table 2. *A. marginale* MSP1a sequences not reported

Repeat	Encoding sequence
A <sup>6</sup>	DDSSSASGQQQE SSVSSQSE - ASTSSQLG - -
72 <sup>a</sup> , Tlapacoyan Ver 1	ADSSSASGQQQGSSVLSQSGQASTSSQLG - A * * * * * G * * * * L * * * * GQ * * * * * * * * *
73 <sup>b</sup> , Tlapacoyan Ver 2	ADSSSASG - - - - - VLSQSGQASTSPQLG - A * * * * * - - - - - * L * * * * GQ * * * * * P * * * * *
74 <sup>c</sup> Soto la Marina Tamps 2	ADSSSESGQQQE SSVLSQSGQASTSSQLG - A * * * * E * * * * * * * * * L * * * * GQ * * * * * * * * *

\* Amino acid similarity; – deletions based on sequence A repeat

<sup>6</sup> Allred *et al.*, 1990; GenBank access numbers: a: JN564646; b: JN564649; c: JN564651

posición de Palenque se sustituye por el repetido 73, en el de Tlapacoyan (Cuadro 1). En un grado menor de similitud, se observa como el aislado Palenque es muy parecido a los aislados Tlapacoyan y Tepic conservando el motivo  $\beta \beta \Gamma$  en sus estructuras. En contraste, se observa el caso de Mex-28-037-01 y Mex-28-037-02 colectados en dos diferentes ranchos en brotes simultáneos en Soto la Marina, Tamaulipas, donde no existe coincidencia en ninguno de los repetidos presentes. De la misma forma los repetidos en los aislados Mex-30-184-01, Mex-30-184-02 y Mex-30-184-03, de un mismo rancho en Tlapacoyan, Ver., excepto por el repetido “C” en los aislados 01 y 03, no hay coincidencias entre ellos.

Considerando el total de los aislados analizados, se observa que el motivo  $\alpha \beta \beta \Gamma$  como tal, además de estar presente en el aislado de Tepic de este estudio, está presente en los aislados Texcoco, Yautepec y Veracruz<sup>(10)</sup> y los aislados Pichucalco y Sta Martha, de Chiapas<sup>(14)</sup>; en los dos últimos se repiten las secuencias  $\beta$  y  $\beta \Gamma$  al final respectivamente<sup>(14)</sup> y, en el aislado Palenque precedido por dos repetidos  $\beta$ . El motivo  $\beta \beta \Gamma$  también lo encontramos dentro de la estructura de otros aislados como el 02 de Tlapacoyan ya

Pichucalco and Sta Martha from Chiapas, where  $\beta$  and  $\beta \Gamma$  locate at the end of these isolates respectively<sup>(14)</sup>, and in Palenque isolate it is preceded by two  $\beta$  repeats.  $\beta \beta \Gamma$  motif is also found within the structure of other isolates as Tlapacoyan 02 already mentioned, in Tamaulipas 17 and 18 isolates with an additional  $\beta$ <sup>(15)</sup>. A high degree of similarity is also observed in Playa Vicente, Tlapacoyan 01 (Veracruz) and Tizimin (Yucatan) structural isolates with presence of T, B and C repeats, of which B, is present in Florida strain of the United States of America<sup>(6)</sup>. In the case of isolates Mex-31-089-01 of Ticul, Yucatan and Mex-30-184-01 of Tlapacoyan, Veracruz, despite presenting the same number of amino acids and pairbases, tandem repeats are completely different (Table 1, Figure 1).

The sequences of *msp4* gene in eight isolates of this study show 849 pairbases with minor variations at the nucleotide sequence. *msp4* gene codes a 282 amino acid protein, as previously reported<sup>(21)</sup>. The sequences obtained from the isolates of this study (Table 3) showed an average of six synonym variations with regard to the reported for *msp4* of Florida isolate<sup>(21)</sup>; however, nucleotide differences were not reflected in the

Cuadro 3. Diferencias de nucleótidos y aminoácidos para Msp4

Table 3. Msp4 nucleotide and amino acid differences

Msp4 genotype	Nucleotide and amino acid substitutions														
	PB 194	AA 65	PB 235	AA 79	PB 296	AA 99	PB 354	PB 423	PB 451	AA 151	PB 564	PB 643	AA 215	PB 798	PB 828
Florida EEUU	T	M	A	D	C	T	G	A	A	I	A	T	Y	G	A
Atitalaquia Hgo.	*	*	G	G	A	N	A	*	G	V	G	*	*	A	G
Tepic Nay.	*	*	G	G	A	N	A	*	*	*	G	*	*	*	*
Soto la Marina1 Tamps.	*	*	G	G	A	N	A	G	*	*	G	*	*	A	G
Soto la Marina2 Tamps.	C	T	G	G	A	N	A	*	*	*	G	*	*	*	*
Tlapacoyan1 Ver.	*	*	G	G	A	N	A	G	*	*	G	C	H	A	G
Tlapacoyan2 Ver.	*	*	G	G	A	N	A	*	*	*	G	*	*	A	G
Tlapacoyan3 Ver.	*	*	G	G	A	N	A	*	*	*	G	*	*	*	*
Ticul Yuc.	*	*	G	G	A	N	A	*	*	*	G	*	*	A	G

Se usó la secuencia reportada para el aislado Florida (Oberle y Barbet 1993) como base de la comparación. Los cambios en los nucleótidos 354, 423, 451, 564, 643, 798 y 828, no se reflejaron en cambio en el aminoácido correspondiente, por lo que no se muestran en el cuadro.



mencionado y, en los aislados Tamaulipas 17 y 18 donde tiene la inserción de un repetido  $\beta$  dando 5 repetidos<sup>(16)</sup>. Un alto grado de similitud se observa también en las estructuras de los aislados Playa Vicente, Tlapacoyan 01 (Ver.) y Tizimín (Yuc) con presencia de los repetidos T, B y C, de los cuales B, está presente en el aislado Florida de Estados Unidos<sup>(6)</sup>.

En el caso de los aislados Mex-31-089-01 de Ticul, Yuc. y Mex-30-184-01 de Tlapacoyan, Ver., a pesar que presentan el mismo número de aminoácidos y pares de bases, los repetidos en tándem son completamente diferentes (Cuadro 1, Figura 1).

Las secuencias del gen *msp4* en ocho aislamientos de este estudio, presentan 849 pares de bases con variaciones en la secuencia de nucleótidos. En dicha secuencia está codificada una proteína de 282 aminoácidos como se ha reportado previamente<sup>(22)</sup>. Las secuencias obtenidas para los aislados de este trabajo (Cuadro 3) presentaron un promedio de seis variaciones sinónimas con relación a la reportada para *msp4* del aislado de Florida<sup>(22)</sup>; sin embargo las diferencias en nucleótidos no se reflejaron en cambio en el aminoácido correspondiente. El análisis de alineación múltiple de similitud de las secuencias, calculado mediante el programa Clustal W, mostró un máximo de 100 % de similitud entre los aislados de Ticul y Tlapacoyan 02, y los aislados Tepic y Soto la Marina 03, mientras que el mínimo de similitud (99.4 %), se observó entre los aislados Tlapacoyan 01 y Soto a Marina 02, sin embargo estas diferencias no son significativas, ya que en la mayoría de los casos estas diferencias a nivel de nucleótidos no se reflejaron en las secuencias de aminoácidos.

La relación entre Msp4 de los aislados de este estudio con los ya publicados, se observa en el árbol filogenético realizado utilizando el algoritmo Neighbor Joining (Clustal W; Figura 2).

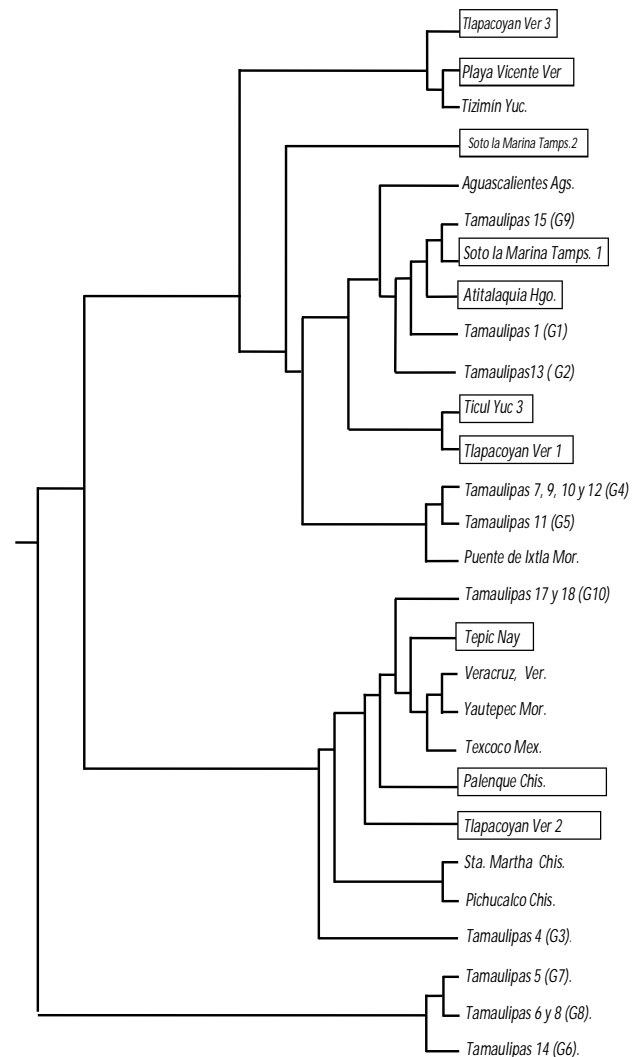
## DISCUSION

*Anaplasma marginale* es de distribución nacional en México y, en ciertas regiones se presenta con

correspondent amino acids. The analysis of multiple alignment likelihood sequences, calculated by Clustal W program, showed a maximum of 100 % similarity between Ticul and Tlapacoyan 02 isolates and, between Tepic and Soto la Marina 03 isolates; while the minimum of likelihood (99.4 %) was observed between Tlapacoyan 01 and Soto la Marina 02 isolates; however, these differences were not significant, as in the majority of the cases

Figura 1. Árbol filogenético. MSP1a cepas de estudio en recuadro y cepas mexicanas reportadas previamente (algoritmo Neighbor Joining)

Figure 1. Phylogenetic tree. MSP1a this study strains (box) and Mexican strains previously reported (neighbor-joining algorithm)



frecuencia en forma de brotes por fallas en el control de garrapatas, ocasionados por el excesivo uso de ixodicidas y la consecuente generación de resistencia<sup>(23)</sup>. Estudios previos sobre la diversidad genética de esta rickettsia en México usando aislamientos de varias zonas del país, mostraron una extensa variación tomando como marcador la región variable del gen *msp1 $\alpha$* , sin embargo, estos estudios se basaron en un número relativamente reducido de aislamientos<sup>(11,15,16)</sup>. En el presente trabajo analizamos la diversidad genética de *A. marginale* en México, usando la cepa Florida como base para una comparación usando un número de aislamientos adicionales a los previamente descritos. Para este efecto, se incluyen organismos colectados de zonas del Golfo de México, desde Tamaulipas, centro y sur de Veracruz, Chiapas, Yucatán y, dos aislados, de Nayarit e Hidalgo y se analizan en conjunto con secuencias previamente publicadas para robustecer el análisis y obtener una idea más precisa sobre la diversidad de este organismo en México.

Lo primero que resalta en el caso del marcador *msp1 $\alpha$*  es que, de manera global al comparar 28 aislados distintos, 10 de este estudio y 18 previamente publicados, se observan 38 repetidos diferentes dentro de las estructuras publicadas, mismos que tienen diferentes clasificaciones que incluyen letras griegas, letras del alfabeto y números, de acuerdo a su publicación<sup>(7,8,11,12,15,16)</sup>. De igual manera podemos observar, por lo menos tres grupos de acuerdo a los repetidos que los componen. En un primer grupo, se observan los aislamientos de Tizimín, Yuc<sup>(11)</sup>, Playa Vicente y Tlapacoyan 03, de Veracruz, con una estructura compuesta principalmente por las repetidos T C B B C, y números de 7 para los primeros 2 y de 6 repetidos para el tercero con cambios en los últimos repetidos, todos ellos muy cercanos a la cepa Florida<sup>(6)</sup>, considerada como cepa tipo, ya que en esta cepa se reportó por primera vez la presencia de los repetidos.

En segundo término encontramos el motivo  $\alpha \beta \beta \Gamma$  presente en siete aislados, sea por si solos o

these differences at nucleotide level are not reflected at amino acid sequences.

The relationship between Msp4 isolates of this study with the already published ones is observed in the phylogenetic tree built out using neighbour-joining algorithm (Clustal W; Figure 2).

## DISCUSSION

*Anaplasma marginale* is widely distributed in Mexico, and in some regions it is responsible for severe outbreaks due to tick control problems, caused by excessive use of ixodicides and consequent resistant generation<sup>(22)</sup>. Previous studies on genetic diversity of this rickettsia in Mexico using isolates from several areas of the country, showed extensive variation using *msp1 $\alpha$*  gene variable region as marker; however, these studies were based on a relatively small number of isolates<sup>(10,14,15)</sup>. In the present study, genetic diversity of *A. marginale* in Mexico was analyzed, using the Florida strain as a base for comparison using a number of additional Mexican isolates. For this purpose, organisms collected from the Gulf of Mexico region: Tamaulipas, south and central Veracruz, Chiapas, Yucatan, and two isolates from Nayarit and Hidalgo were included and analyzed together with sequences previously published to strengthen the analysis and obtain a more precise idea of the diversity of this organism in Mexico.

The first thing that stands out in the case of *msp1 $\alpha$*  marker is that, in general, by comparing 28 different isolates, 10 from this study and 18 previously published, there are 38 different repeats which have different classifications that include Greek letters, letters of the alphabet and numbers, according to their publication<sup>(11,14,15)</sup>. Likewise, it is possible to clearly observe at least three groups according to their repeats. In a first group, Tizimim, Yucatan<sup>(10)</sup>; Playa Vicente and Tlapacoyan 03, Veracruz isolates are observed with a structure mainly composed by T C B B C repeats, and numbers of 7 for the first 2 and 6 repeats for the third with changes in the last repeats, all of them very similar to Florida strain<sup>(6)</sup> considered as type

complementados por otros repetidos, comprendiendo organismos del Golfo de México, pero también del centro del país (Yautepec, Mor.) y la costa oeste (Tepic Nay.). Por su parte, la amplia distribución del repetido  $\beta$  en nueve aislados en secuencias de 2 o más dentro del mismo aislado (Cuadro 1) hace que esos aislamientos se puedan agrupar en una sola tribu dentro del árbol filogenético (Figura 1), indicando la influencia que tiene este repetido sobre un gran número de organismos a nivel nacional. Hay que notar que el motivo  $\alpha \beta \beta \Gamma$  o motivos relacionados, se encuentran también en organismos de Argentina<sup>(24)</sup> y Brasil<sup>(25)</sup>, lo que podría indicar que esta estructura pudo tener su origen en Brasil, y ser transferida de manera silente a México en pie de cría de razas productoras de carne y con buena adaptación a climas cálidos como el nuestro<sup>(11)</sup>. La presencia en México de genotipos que incluyen el motivo  $\alpha \beta \beta \Gamma$ , dan pie a la hipótesis que los aislados base u origen de estos repetidos, probablemente se mantienen en las costas del golfo de México, de donde se distribuyen al resto del país, hacia el norte en Tamaulipas y hacia el sur, en Chiapas. Su presencia en Morelos y Tepic, se puede explicar por movilizaciones ocasionales de ganado de Registro desde Veracruz a otros puntos del país.

Un tercer grupo de aislamientos compuesto por tres aislados con la misma estructura de repetidos ( $\tau$ , 57, 13, 18) son Soto la Marina 01 y Tamaulipas 15<sup>(16)</sup>, los dos de Soto la Marina y el aislado Atitalaquia, Hgo, Mex-14-010-01, este último colectado en una engorda de ganado, establecida en una zona geográfica donde este tipo de bovinos no es usual, y donde *Boophilus microplus* no se reporta, por lo que se puede pensar que sea el mismo aislado importado de Tamaulipas.

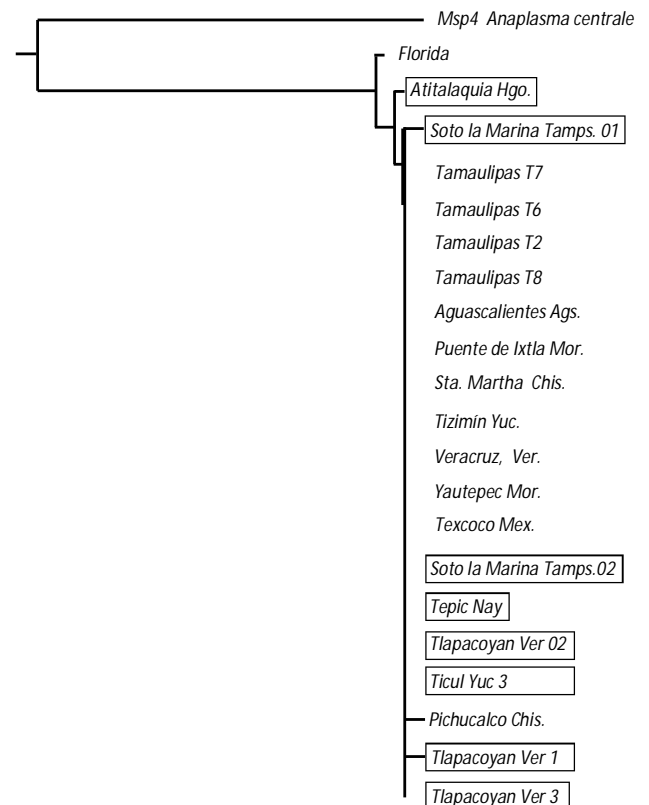
Finalmente se observa un cuarto grupo de aislamientos compuesto mayormente por organismos colectados en Soto la Marina a partir de brotes simultáneos en varios ranchos<sup>(16)</sup>; dentro de este grupo se observa que hay cuatro aislamientos que comparten el genotipo G4 de *Msp1a* (4, 63, 63, 27, 12), de igual manera los genotipos G2, G5 y

strain, since in this strain, the presence of repeats was reported for the first time.

In second place,  $\alpha \beta \beta \Gamma$  motif was found in seven isolates, alone or complemented by other repeats, in organisms from the Gulf, but also from central of Mexico (Yautepec, Morelos) and the west coast (Tepic, Nayarit). Likewise, the wide distribution of  $\beta$  repeat in nine isolates in sequences of two or more (Table 1), includes those isolates in only one tribe within a phylogenetic tree (Figure 2), showing the influence of this repeat on a great number of organisms at national level. It is important to note that  $\alpha \beta \beta \Gamma$  motif or related motifs are also found in organisms from Argentina<sup>(23)</sup> and Brazil<sup>(24)</sup>, which could indicate

Figura 2. Árbol filogenético. MSP4 cepas de estudio en recuadro y cepas mexicanas reportadas previamente (algoritmo Neighbor Joining)

Figure 2. Phylogenetic tree. MSP4 this study strains (box) and Mexican strains previously reported (neighbor-joining algorithm)



G8, fueron colectados en el mismo rancho, durante el brote. En el caso del genotipo G4, lo más probable es que los animales simplemente comparten el mismo organismo, mientras que los otros genotipos son organismos diferentes<sup>(16)</sup>. Dentro de este último grupo de organismos con genotipos no relacionados, se encuentra el nuevo aislamiento de Ticul, Yuc., que presenta los repetidos F M M, que no habían sido reportados previamente en México, pero que son comunes en aislados de Argentina (F M M M), Israel (F M) e Italia (M)<sup>(11)</sup>. Los resultados del análisis filogenético de las secuencias obtenidas con los aislados nuevos y los ya reportados, no muestran una asociación filogeográfica contundente, lo que concuerda con la teoría de que la heterogeneidad observada entre los aislados de *Anaplasma marginale* en México puede ser explicada, como en otras partes, por el movimiento del ganado a nivel nacional y por el mantenimiento de ciertos genotipos por eventos de transmisión independientes, que incluyen transmisión por garrapatas y manejo inadecuado con objetos punzocortantes como agujas, navajas de castración, aretadores, etc.<sup>(26)</sup>. Sin embargo no se puede dejar a un lado el hecho de que ciertos repetidos se observan con mayor frecuencia en algunas zonas, como se mencionó antes y como se muestra en el Cuadro 1 y la Figura 1.

En el caso del marcador *msp4* en los aislados de este estudio, las diferencias observadas en la secuencia de nucleótidos y aminoácidos es más extensa, como había sido reportado en un brote en el estado de Tamaulipas<sup>(16)</sup> (Figura 1). Para el análisis de filogenia del gen *msp4* se agregaron las secuencias del aislado Florida, EE.UU. como testigo, el cual se aprecia en una rama independiente de los aislados mexicanos; también se incluyó como testigo, la secuencia del gen *msp4* de *Anaplasma centrale*. En este análisis se observa al aislado Mex-14-010-01 de Atitalaquia Hgo., en una rama diferente de donde se encuentran la mayor parte de los aislados, con lo que aún con las diferencias observadas, los aislados mexicanos en su mayoría, agrupan en una sola tribu.

that this structure could have its origin in Brazil and was silently transferred to Mexico by importation of zebu breeding stock<sup>(10)</sup>. Presence in Mexico of genotypes that include  $\alpha \beta \beta \Gamma$  motif, give place to the hypothesis that isolates from which these repeats originate are probably maintained in the Gulf coasts of Mexico, from where they are distributed to the rest of the country, north to Tamaulipas, south to Chiapas. The presence of these repeats in Morelos and Tepic can be explained by occasional movement of registered cattle from Veracruz to other states of the country.

A third group composed of three isolates with the same repeat structure ( $\tau$ , 57, 13, 18) are Soto la Marina 01 and Tamaulipas 15<sup>(15)</sup>, both from Soto la Marina and, Atitalaquia, Hidalgo, Mex-14-010-01 isolate, this last collected from a beef production unit, established in a geographical zone where these type of bovines are unusual, and where *Boophilus microplus* is not reported,. We hypothesize that it is the same isolate imported from Tamaulipas.

Finally, a fourth group of isolates mainly composed by organisms collected in Soto la Marina from simultaneous outbreaks in several ranches are observed<sup>(15)</sup>; in this group there are four isolates sharing *Msp1a* (4, 63, 63, 27, 12) genotype G4; likewise, genotypes G2, G5 and G8 were collected in the same ranch during the outbreak. In the case of genotype G4, the most likely is that the animals simply shared the same organism, while the other genotypes are true different organisms<sup>(15)</sup>. In this same group of organisms with unrelated genotypes we find Ticul, Yucatan, a new with F M M repeats, previously unreported for Mexico, but common in isolates from Argentina (F M M M), Israel (F M) and Italy (M)<sup>(10)</sup>. The global phylogenetic analysis of the sequences obtained new and already reported, do not show a conclusive phylogeographic association, which coincides with the theory that heterogeneity observed among *Anaplasma marginale* isolates in Mexico can be explained, as in other places, by cattle movement

En este estudio se presenta una panorámica más extensa de la diversidad genética de la rickettsia *Anaplasma marginale* usando como elementos de estudio 10 nuevos aislados y su comparación con lo previamente descrito. Esta panorámica muestra la presencia del motivo  $\alpha \beta \beta \Gamma$ , a lo largo del Golfo de México y aún en otras localidades. A pesar de que los hallazgos de diversidad pueden ser explicados en parte por la presión ejercida por el sistema inmune del hospedero hacia la rickettsia, los mecanismos de ésta para evadir la respuesta inmune, y en parte por los movimientos de ganado dentro del país, existen otros elementos que debemos considerar en los patrones de distribución de la enfermedad que no se han evaluado a detalle, como la transmisión por *Boophilus microplus*, la garrapata más abundante en México y capaz de transmitir *Anaplasma* de manera biológica y su relación con la rickettsia. De tal manera, es notorio que de los 28 aislados conocidos hasta ahora en México, 7 comparten el primer repetido de *msp1 $\alpha$*  y 8 la última; de estos, 6 comparten el primero y el último repetido; también resalta que la mayor diversidad observada, se encuentra en la región de Tamaulipas, donde coinciden dos fenómenos, la presencia de brotes severos de anaplasmosis bovina, probablemente debido a que se ha convertido en una zona de inestabilidad enzoótica y, la selección positiva de cepas de garrapatas resistentes a los ixodicidas; posiblemente asociados estos dos fenómenos debido a la relación estrecha en la co-evolución de ambos organismos<sup>(12)</sup>; en contraste las secuencias que comparten la primera y la última secuencia se encuentran en zonas con estabilidad enzoótica. Posiblemente la diversidad de *A. marginale* observada en México, esté relacionada con los factores de selección ambientales y el uso indiscriminado de ixodicidas, seleccionando poblaciones de garrapatas resistentes a los mismos.

Estos nuevos aislados reportados en este estudio y en estudios previos, nos indican que a pesar que la diversidad genética para el marcador *msp1 $\alpha$*  es extensa, existen poblaciones muy relacionadas dentro en México, y que esto podría ser usado en

on national level and conservation of certain genotypes by independent transmission events, which include transmission by ticks and inadequate management of veterinary tools such as: needles, castration blades, ear marking pliers, etc.<sup>(25)</sup>. However, the fact that certain repeats are more frequently observed in some areas (Table 1 and Figure 1) cannot be put aside.

In the case of *msp4* in isolates of this study, differences observed in nucleotide and amino acid sequences are more extensive, as already reported in an outbreak in the state of Tamaulipas<sup>(15)</sup> (Figure 1). For the phylogenetic analysis of *msp4* gene the sequence of Florida, United States of America was used as control, which is shown in an independent branch of the Mexican isolates; the sequence of *Anaplasma centrale msp4* gene was also included as control. In this analysis the Mex-14-010-01 from Atitalaquia, Hidalgo was observed in a different branch from the majority of the isolates are found, even though with the observed differences, the vast majority of Mexican isolates are grouped in one tribe.

This study presents a more extensive panorama of *A. marginale* genetic diversity using as elements of study 10 new isolates and compared with the previously reported ones. This panorama shows the presence of the  $\alpha \beta \beta \Gamma$  motif along the Gulf of Mexico and other localities. Despite the fact that the diversity found can be explained in part from the pressure exerted by the immune system of the host towards the rickettsia, the rickettsia's mechanism to evade the host's immune response, and partly by cattle movement within the country. There are other elements that must be considered in distribution patterns of the disease that have not been evaluated in detail such as *Boophilus microplus* transmission, the most abundant tick in Mexico and capable to biologically transmit *Anaplasma* and its relation with the rickettsia. Therefore, it is outstanding that out of 28 isolates currently known in Mexico, seven share *msp1 $\alpha$*  first repeat and eight last; from these, six share the first and last repeat; it also points out that the

un programa de control mediante el uso de vacunas inactivadas o vacunas vivas a partir de cepas avirulentas que compartan marcadores, como los descritos en este estudio.

## LITERATURA CITADA

1. Ristic M. Anaplasmosis. *Adv Vet Sci* 1960;112-116.
2. Palmer GH, McGuire TC. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *Infect Immun* 1984;13:1010-1015.
3. Bock RE, deVos AJ, 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;118(1-2):121-31.
4. Tebele N, McGuire TC. Induction of protective immunity using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infect Immun* 1991;59:3199-3204.
5. Brayton KA, Kappmeyer LS, Herndon DR, Dark MJ, Tibbals DL, Palmer GH, McGuire TC, Knowles DP Jr. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(3):844-849.
6. 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* 1990;87:3220-3224.
7. 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.
8. de la Fuente J, García-García JC, Barbet AF, Blouin EF, Kocan KM. Adhesion of outer membrane proteins containing tandem repeats of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species (Rickettsiales: Anaplasmataceae) to tick cells. *Vet Microbiol* 2004;98(3-4):313-22.
9. García-García JC, de la Fuente J, Blouin EF, Halbur T, Onet VC, Saliki JT, Kocan KM. Differential expression of the *msslA* gene of *Anaplasma marginale* occurs in bovine erythrocytes and tick cells. *Vet Microbiol* 2004;98:261-272.
10. de la Fuente J, Ruybal 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 sequences. *Vet Microbiol* 2007;119:82-390.
11. Estrada-Peña A, Naranjo V, Acevedo-Whitehouse K, Mangold AJ, Kocan KM, de la Fuente J. Phylogeographic analysis reveals association of tick-borne pathogen, *Anaplasma marginale*, MSP1a sequences with ecological traits affecting tick vector performance. *BMC Biol* 2009;7:57.
12. Alleman AR, Barbet AF. Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein (MSP3) as a diagnostic test antigen. *J Clin Microbiol* 1996;34:270-276.
13. Kawasaki PM, Kano FS, Vidotto O, Vidotto MC. Cloning, sequencing, expression, and antigenic characterization of rMSP4 from *Anaplasma marginale* isolated from Paraná State, Brazil. *Genet Mol Res* 2007;6(1):15-22.
14. Jiménez Ocampo, R, Rodríguez Camarillo SD, Rosario Cruz, R, Orozco Vega LE, de la Fuente J, 2008. *Anaplasma marginale*: análisis de las secuencias del fragmento variable del gen *msslA* y del gen *mssl4* de cuatro nuevas cepas mexicanas. *Téc Pecu Méx* 2008;46:69-78.
15. Almazán C, Medrano C, Ortiz M, de la Fuente J. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains from an outbreak of bovine anaplasmosis in an endemic area. *Vet Parasitol* 2008;158:103-109.
16. Knowles D, Torioni de Echaide S, Palmer G, McGuire T, Stiller D, McElwain T. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *J Clin Microbiol* 1996;34(9):2225-2230.
17. Torioni de Echaide S, Knowles DP, McGuire TC, Palmer GH, Suarez CE, McElwain TF. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *J Clin Microbiol*. 1998;36(3):777-82. Erratum in: *J Clin Microbiol* 2001;39(3):1207.

*End of english version*

DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS GENES *msp1α* Y *msp4* EN CEPAS DE *Anaplasma marginale*

18. García-Ortiz MA, Angeles Ojeda LE, Hernández Salgado G, García Tapia D, Aboytes Torre R, Rodríguez SD. Caracterización de la Virulencia de un aislado Mexicano de *Anaplasma marginale*. Tec Pecu Mex 1998;36:197-202.
19. Palmer GH, Knowles DP Jr, Rodriguez 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(11):5381-5384.
20. de la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, McEwen BR, Clawson D, Tolan KM. Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of *Anaplasma marginale*. Int J Parasitol 2001;31(14):1705-14.
21. Oberle SM, Barbet AF. Derivation of the complete *msp4* gene sequence of *Anaplasma marginale* without cloning. Gene 1993;136(1-2):291-294.
22. Rodríguez SD, García Ortiz MA, Jiménez Ocampo R, Vega y Murguía CA. Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in Mexico. Infect Genet Evol 2009;9(6):1092-101.
23. Ruybal P, Moretta R, Perez A, Petrih R, Zimmer P, Alcaraz E, Echaide I, et al. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in Argentina. Vet Parasitol 2009;162(1-2):176-180.
24. Vidotto MC, Kano SF, Gregori F, Headley SA, Vidotto O. Phylogenetic analysis of *Anaplasma marginale* strains from Parana State, Brazil, using the *msp1alpha* and *msp4* genes. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2006;53(9):404-11.
25. Reinbold JB, Coetzee JF, Hollis LC, Nickell JS, Riegel CM, Christopher JA, Ganta RR. Comparison of iatrogenic transmission of *Anaplasma marginale* in Holstein steers via needle and needle-free injection techniques. Am J Vet Res 2010;71(10):1178-88.

