



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DPTO. DE BIOANÁLISIS CLÍNICO
LABORATORIO DE ANÁLISIS
BIOTECNOLÓGICO Y MOLECULAR
(ANBIOMOL)
“Prof. Guillermo López Corcuera”
TRABAJO DE GRADO II**



**ANÁLISIS *IN SILICO* DE LAS SECUENCIAS DIANAS DESCRITAS EN LA
BIBLIOGRAFÍA PARA EL DIAGNOSTICO MOLECULAR DE *Anaplasma
marginale* EN BOVINOS POR MEDIO DE PCR**

Autora: Aury Daniela Márquez Soto

Tutor: Prof. Elizabeth Pérez

Mérida, Marzo 2023



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DPTO. DE BIOANÁLISIS CLÍNICO
LABORATORIO DE ANÁLISIS
BIOTECNOLÓGICO Y MOLECULAR
(ANBIOMOL)
“Prof. Guillermo López Corcuera”
TRABAJO DE GRADO II**



**ANÁLISIS *IN SILICO* DE LAS SECUENCIAS DIANAS DESCRITAS EN LA
BIBLIOGRAFÍA PARA EL DIAGNOSTICO MOLECULAR DE *Anaplasma
marginale* EN BOVINOS POR MEDIO DE PCR**

*Proyecto de Investigación como requisito para optar al título de Licenciada en
Bioanálisis*

Autora: Aury Daniela Márquez Soto

Tutor: Prof. Elizabeth Pérez

Mérida, Marzo 2023

DEDICATORIA

Dedico con todo mi corazón el resultado de este trabajo a mi dios todo poderoso sin su amor misericordioso nada fuera posible, a mis padres y hermanos, pues sin ellos no lo habría logrado. A mi madre por que su bendición a diario a lo largo de mi vida me protege y me lleva por el camino de bien. Mi padre por enseñarme a siempre enfrentar las dificultades sin perder nunca la cabeza.

Por eso les doy mi trabajo en ofrenda por su paciencia y amor, diosito, padres y hermanos míos, los amo.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTO

Hoy, al culminar esta hermosa etapa de mi vida como estudiante, miro atrás, veo el camino recorrido y quiero dar gracias primero a Dios por permitirme este momento con las personas más especiales e importantes de mí vida, sin la bendición del Padre no se podría lograr nada.

Agradezco a mis padres, por ser pilar en mi vida, siendo el motor y la piedra angular para mi futuro, un logro que también es de ellos. Por su esfuerzo constancia, trabajo. Esto ha sido posible, los amo inmensamente.

A mis hermanos, por su amistad, alegría, apoyo por creer en mí cada momento, a pesar de las dificultades, siempre estuvieron allí para apoyarme, son mi vida. Al resto de mi familia como mis tías, mi abuela y primos por nunca perder la fe en mí y decirme palabras de aliento, por su respeto y admiración, por ser además ejemplos de constancia.

Eterno agradecimiento a los profesores que académicamente me apoyaron y enseñaron todo el proceso del proyecto de investigación, en especial a la profesora Elizabeth Pérez por su apoyo incondicional, en la parte de prueba experimental.

Con cariño inmenso a CECALCULA por brindarme los conocimientos en los programas bioinformáticos.

A esta nuestra casa de estudio, Universidad de los Andes, por acogerme en sus aulas y formarme como profesional. Pido a Dios por la permanencia eterna de personas que iluminen las aulas del alma mater con su sabiduría.

Estoy infinitamente agradecida por tanto amor, aprendizaje, amistad, compañerismo, apoyo, experiencia y felicidad que la vida me ha dado.

Aury Marquez

INDICE DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN.....	x
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA.....	3
Planteamiento del problema	3
Justificación e importancia de la Investigación	14
Objetivos de la investigación	16
<i>Objetivo general</i>	<i>16</i>
<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>16</i>
Alcances y limitaciones de la investigación	17
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	18
Trabajos Previos.....	18
Bases Teóricas.....	22
Género Anaplasma	22
Genoma y proteínas de superficie de <i>A. marginale</i>.	24
Epidemiología de <i>A. marginale</i>.....	25
Métodos de Diagnóstico de infecciones parasitarias en ganado	26
Diagnóstico molecular de parásitos.....	27
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	29
Análisis in silico.....	31
Análisis y diseño de cebadores para PCR.....	31
Primer-BLAST.....	32
Definición Operacional de Términos.....	33
Operacionalización de las Variables.....	36
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO.....	37
Tipo de Investigación	37

Diseño de investigación	38
Población y muestra	38
<i>Unidad de Investigación</i>	39
<i>Selección del Tamaño Muestral.....</i>	39
Sistema de Variables	39
Procedimiento de la investigación	40
Búsqueda en las bases de datos.....	40
Análisis de los cebadores	42
PCR in silico	45
Diseño del Análisis.....	46
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
Resultados	47
Discusión.....	67
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	114
Conclusiones.....	114
Recomendaciones.....	116
BIBLIOHEMEROGRAFÍA.....	117

LISTA DE TABLAS

Nº	Tabla	P.p
1	Operacionalización de Variables.....	36
2	Resultados de la búsqueda en la base de datos PubMed.....	48
3	Resultados de la búsqueda en la base de datos Researchgate.....	49
4	Resultados de la búsqueda en la base de datos ScienceDirect.....	50
5	Resultados de los estudios encontrados en las bases de datos para el gen <i>ADNr 16S</i>	51
6	Resultados de los estudios encontrados en las bases de datos para el gen <i>msp1β</i>	52
7	Resultados de los estudios encontrados en las bases de datos para el gen <i>msp5</i>	53
8	Resultados de los estudios encontrados en las bases de datos para el gen <i>msp4</i>	54
9	Resultados de los estudios encontrados en las bases de datos para el gen <i>msp1α</i>	55
10	Análisis por medio de Primer Blast de los Cebadores de Palmer <i>et al.</i> (2001).....	56
11	Análisis por medio de Primer Blast de los Cebadores de Lew <i>et al.</i> (2002).....	57
12	Análisis por medio de Primer Blast de los Cebadores reportados por de La Fuente <i>et al.</i> (2007).....	57
13	Análisis por medio de Primer Blast de los Cebadores de Kovalchuk <i>et al.</i> (2019).....	58
14	Análisis por medio de Primer Blast de los Cebadores de Witchuta <i>et al.</i> (2021).....	58
15	Resultados de la PCR in silico con los cebadores diseñados por Kovalchuk <i>et al.</i> (2019).....	61
16	Resultados de la PCR in silico de los cebadores diseñados por Lew <i>et al.</i> (2002).....	62
17	Resultados de la PCR in silico de los cebadores diseñados por Palmer <i>et al.</i> (2001).....	63
18	Resultados de la PCR in silico de los cebadores diseñados por de La Fuente <i>et al.</i> (2001).....	65
19	Resultados de la PCR in silico de los cebadores diseñados por de Witchuta <i>et al.</i> (2021).....	66

LISTA DE FIGURAS

N°	Figura	P.p
1	Ciclo de vida de <i>A. marginale</i>	10
2	Ciclo de desarrollo de <i>A. marginale</i>	10
3	Eritrocitos infectados con <i>A. marginale</i>	12
4	Árbol filogenético construido con las secuencias del gen <i>msp1α</i> de <i>A. marginale</i> , <i>A. centrale</i> y <i>A. ovis</i>	111
5	Alineamiento de la región central del gen <i>msp1α</i> de <i>A. marginale</i> , <i>A. centrale</i> y <i>A. ovis</i>	112
6	Alineamiento de la región 3' del gen <i>msp1α</i> de <i>A. marginale</i> , <i>A. centrale</i> y <i>A. ovis</i>	113



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
 FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
 ESCUELA DE BIOANÁLISIS
 DPTO. DE BIOANÁLISIS CLÍNICO
 LABORATORIO DE ANÁLISIS
 BIOTECNOLÓGICO Y MOLECULAR (ANBIOMOL)
 “Prof. Guillermo López Corcuera”
 TRABAJO DE GRADO II



**ANÁLISIS *IN SILICO* DE LAS SECUENCIAS DIANAS DESCRITAS EN LA
 BIBLIOGRAFÍA PARA EL DIAGNOSTICO MOLECULAR DE *Anaplasma
 marginale* EN BOVINOS POR MEDIO DE PCR**

Autora: Aury Daniela Márquez Soto

Tutor: Prof. Elizabeth Pérez

Mérida, Marzo 2023

RESUMEN

La investigación tiene por objetivo analizar de manera *in silico* las secuencias diana descritas en la bibliografía usadas para el diagnóstico molecular de *A. marginale* por medio de PCR. Para ello, se llevó a cabo la selección de la bibliografía relacionada con la secuencia diana más idónea para el diagnóstico sensible y específico de *A. marginale* por medio de la técnica de PCR. De igual manera, se buscó determinar entre los cebadores usados en la bibliografía para la secuencia diana seleccionada, los más efectivos para el diagnóstico molecular de *A. marginale* por medio de PCR, y con ello realizar PCR *in silico* con los cebadores seleccionados para la detección de *A. marginale*. La investigación se enmarca en un tipo de estudio descriptivo con diseño de campo, donde también se emplean datos secundarios, provenientes de fuentes bibliográficas, a partir de los cuales se elabora el marco teórico. La unidad de análisis se basó en la información que se recabó en las fuentes primarias y secundarias. La unidad de investigación está representada por los cebadores específicos dirigidos a la región diana más idónea para el diagnóstico molecular de *A. marginale*, tomando como población las secuencias diana competentes para el diagnóstico más sensible y específico de *A. marginale* por medio de la técnica de

PCR, mientras que la muestra está representada por el gen *m脾1α*. La región diana más idónea para *A. marginale* es el gen *m脾1α* una región conservada por su importante función, que con análisis bioinformáticos los autores han logrado diseñar cebadores en regiones conservadas del gen, que permitan la identificación de diferentes cepas geográficas y el diagnóstico específico de la especie. Los cebadores dirigidos a la región seleccionadas fueron los de Kovalchuck *et al.*, (2019) dirigidos a la región más conservada del gen que no está expuesta a variaciones por las diferentes repeticiones en tándem que puede presentar *m脾1α* en zonas endémicas. La PCR *in silico* permitió tener al tanto todos los ajustes óptimos y los productos amplificados, para que se de a futuro una PCR *in silico*.

Indicadores: Secuencias Diana, análisis *in silico*, diagnóstico molecular, cebadores, *Anaplasma marginale*, PCR.

www.bdigital.ula.ve

INTRODUCCIÓN

Es importante conocer en relación a la salud y el bienestar del ganado, sabiendo que es una de las primeras fuentes de alimento del ser humano. Por ello, determinar que la buena condición corporal y las constantes fisiológicas se encuentren dentro de los parámetros normales es tarea un tanto difícil, y varían según las condiciones climáticas y ambientales a la que el animal se exponga, por ello es más importante estudiar la presencia de los principales problemas a los que se enfrenta la industria ganadera con las diferentes enfermedades asociadas al ganado que afectan su producción, tanto de carne como de leche.

Por esta razón vale considerar la demanda y la producción mundial de productos ganaderos que están aumentando rápidamente, debido al crecimiento de la población, el aumento de los ingresos y los cambios en el estilo de vida y las dietas. Esta es la razón por la cual se considera relevante estudiar las afectaciones o enfermedades hemoparasitarias que pudieran estar afectando a los bovinos causada por bacterias que para el caso importa del género de la *Rickettsia* intramolecular como es *Anaplasma marginale*, que ocasiona anualmente cuantiosas pérdidas económicas además de las afectaciones en salud para la población.

Anaplasma marginale es una bacteria del orden Rickettsiales que parasita los eritrocitos maduros del ganado bovino, provocando grandes pérdidas económicas en las regiones tropicales y subtropicales. La enfermedad se caracteriza por marcada anemia hemolítica, disminución del peso, aborto y en ocasiones la muerte. Por esta razón en el siguiente trabajo de carácter descriptivo se desarrolló en el marco de una investigación de campo, dentro de una exhaustiva revisión con objetivo analizar de manera *in silico* las secuencias diana descritas en la bibliografía usadas para el diagnóstico molecular de *A. marginale* por medio de PCR. Para ello, se realizó la selección de la bibliografía relacionada con la secuencia diana

idónea para el diagnóstico sensible y específico de *A. marginale* por medio de la técnica de Reaccion en cadena de la polimerasa (PCR) *del ingles* Polymerase chain reaction . Para ello se organiza la investigación en:

Capitulo I: Donde lleva a cabo el planteamiento del problema, la justificación, los objetivos, alcances y limitaciones.

Capitulo II: Se muestran los trabajos previos relacionados con la investigacion, las Bases Teoricas, la defnicion operacional de términos, y operacionlizacion de las variables en estudio.

Capitulo III: Donde señala el tipo y diseño de investigación, población y muestra, asi como la uidad de investigación, la selección del tamaño muestral, el procedimiento de la investigación, y el diseño de análisis.

Capitulo IV: En esta parte se muestra los resultados y discusión de selección de la secuencia diana idónea para el diagnóstico molecular por PCR de *A. marginale*.

Capitulo V: Aca se señalan las conclusiones y recomendación a las que llegó la investigadora.

Finalmente se muestra la Biblioherografia y los Anexos correspondientes.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

La ganadería ha sido uno de los subsectores económicos de muchos países, con un rápido crecimiento en las últimas décadas debido a la extensión de la producción y a los cambios y acciones estructurales adoptados por el buen manejo de las fincas. A pesar de los esfuerzos para el desarrollo de iniciativas de intensificación que aumenten la manufactura del ganado vacuno y la disminución de pérdidas de producción, la industria ganadera sigue estando rezagada en términos productivos y con importantes retos ambientales y sociales. Y es que históricamente la ganadería se ha manejado de forma extensiva, resultando ello en bajos niveles de productividad y ocasionando efectos negativos desde el punto de vista ambiental (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO 2011).

Así mismo, uno de los principales aportes de la ganadería a la economía de un país es su contribución al producto interno bruto, tanto por las exportaciones de carne como por la comercialización de la leche. También contribuye con la generación de empleos directos e indirectos para la población beneficiada, en su mayoría en el sector rural, donde prevalece la población campesina dedicada a la producción y cría del ganado, lo que crea estabilidad en el campo.

Además, la producción de leche y sus derivados contribuye a la seguridad alimentaria en el campo, pues en las unidades de producción ganadera los productores aportan leche para consumo del hogar o para venta local (García *et al.*, 2018). La producción de leche y carne representa más de tres veces el valor de la producción cafetera, La ganadería colombiana alcanza una población de 24.8 millones de cabezas

bovinas y es la tercera mas importante en Latinoamérica, después de Brasil (172 millones) y Argentina (57 millones) (Hernandez, 2008).

Uno de los principales problemas a los que se enfrenta la industria ganadera son las diferentes enfermedades asociadas al ganado que afectan su producción, tanto de carne como de leche. Las enfermedades que más se han estudiado y diagnosticado son las de origen parasitario, viral y bacteriano, transmitidas por vectores, capaces de generar un trastorno hematológico conocido como anemia hemolítica inmunomediada, así como otros trastornos hematológicos y orgánicos, que en la mayoría, serán también visibles en su presentación clínica.

Para el diagnóstico estos agentes patógenos es necesario correlacionar los hallazgos clínicos y hematológicos con el fin de poder instaurar el tratamiento más adecuado. Uno de los vectores más comunes en el ganado vacuno es la garrapata, la cual ha sido considerada como uno de los mayores problemas sanitarios para la producción ganadera, sobre todo en regiones de clima tropical. Las parasitosis que afectan al ganado son de carácter cosmopolita, afectando tanto a ganado de carne como de leche, y provocando bajas significativas en la producción (García *et al.*, 2018).

Lo anteriormente mencionado destaca la necesidad desarrollar planes nacionales e internacionales enfocados hacia la prevención de enfermedades, sobre todo por el hecho de que la producción vacuna y sus productos derivados son consumidos por la población, y deben pasar por los diferentes lineamientos y normativas sanitarias necesarias para su consumo (Baca y Mendoza, 2021).

Uno de los factores que favorecen la aparición y permanencia de estas enfermedades es la contaminación ambiental, que beneficia la distribución de los vectores hacia regiones con altitudes superiores a 2.600 *m.s.n.m.* La Organización Mundial de la Salud (OMS) afirmó que las enfermedades transmitidas por artrópodos son las más sensibles al fenómeno del cambio climático, y que un pequeño aumento de la temperatura puede aumentar hasta diez veces la población de determinado artrópodo (Betancourt *et al.*, 2011). Esto trae como consecuencia un incremento en la

aparición de enfermedades relacionadas con las hemoparasitosis dentro de sistemas de producción del ganado bovino, ya que pueden incidir directamente en la presencia de los vectores (Hernández, 2018). En cuanto a la distribución geográfica de las mencionadas parasitosis, se encuentran principalmente en las zonas tropicales y subtropicales del mundo (Cabezas *et al*, 2013; Ferreira *et al*, 2016).

Por otro lado, la hemoparasitosis tropical se caracteriza por la aparición de un conjunto de enfermedades originadas por microorganismos que presentan tropismo por la sangre de los bovinos, y que son transmitidos de un animal enfermo a uno sano mediante vectores, entre las que se pueden mencionar anaplasmosis, babesiosis, erlichiosis, theileriosis y tripanosomiasis. Los hemoparásitos de mayor incidencia causantes de parasitosis en bovinos son *Tripanosoma vivax*, *A. marginale*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, siendo los dos últimos generos los causantes de la enfermedad conocida como “fiebre de garrapatas”. Todos estos agentes se caracterizan por producir como sintomatología general: fiebre, enflaquecimiento, anemia, baja producción de carne y leche, abortos, decaimiento, postración, incremento de la frecuencia cardiaca y respiratoria (Hernandez, 2008; Medina, 2017). Y sin valor diagnóstico de vista, por lo que la PCR es una alternativa para estos casos (Hernández, 2017).

De especial interés para este trabajo de investigación son las enfermedades relacionadas a las hemoparasitosis causadas por la bacteria *A. marginale*, la cual produce cuadros clínicos agudos en animales de edad superior a los 2 años, que incluso pueden desencadenar la muerte del animal. Entre sus efectos directos se encuentran: mortalidad, emaciación, retardo en el crecimiento, aborto, infertilidad temporal y los gastos derivados de su control, como los costos de las pruebas diagnósticas, tratamiento y profilaxis.

Los efectos indirectos se deben a la disminución en la producción ganadera, que contribuye al déficit proteico en la población humana, grandes pérdidas económicas, alto precio de producción agropecuaria, atentar contra el mejoramiento genético y

zootécnico, limitando la posibilidad de introducir reproductores de razas exóticas en áreas productivas (Suárez, 2009).

A. marginale se adscribe al género *Anaplasma*, perteneciente a la familia Anaplasmataceae, del orden Rickettsiales, clase Proteobacteria (Soto, 2010).

Es necesario destacar que *A. marginale* se presenta en la mayor parte de los países tropicales y subtropicales, y en algunas regiones más templadas. *A. centrale* se describió por vez primera en Sudáfrica, y desde ahí ha sido importado por otros países como Australia y algunos países de Sudamérica, Sudeste asiático y Oriente Medio, para ser utilizado como vacuna contra *A. marginale* (Kocan *et al.*, 2010).

La anaplasmosis bovina es una enfermedad económicamente importante, por los enormes gastos que ocasiona, En los Estados Unidos, la anaplasmosis es enzoótica en los estados del Atlántico Sur, Golfo, los estados costeros y varios estados del medio oeste y oeste, reportando entre 50.000 a 100.000 animales muertos, con un costo de hasta 300 millones de dólares. Sin embargo, la anaplasmosis ha sido reportada en casi todos los estados de los EE. UU.

Se presume que la amplia distribución resultó del transporte de bovinos portadores, con subsiguientes cambios mecánicos o biológicos de transmisión de asintomáticos persistentemente infectados. La anaplasmosis bovina también es endémica en México, Centroamérica y América del Sur, así como en las Islas del Caribe. La anaplasmosis es enzoótica en todos los países latinoamericanos, con excepción de las zonas desérticas y ciertas montañas como los Andes. Las tasas de seroprevalencia de *A. marginale* varían ampliamente entre países en las Américas, y la variabilidad de estas tasas contribuye al desarrollo de regiones geográficamente enzoóticas. Se ha descrito infecciones por *A. marginale* en países mediterráneos, en ganado comercial y una variedad de especies de vida silvestre (Corona, 2004; Kocan, 2010).

La enfermedad se reporta en muchas áreas del mundo, existiendo datos de la presencia de anaplasmosis bovina en la India y otras regiones de Asia y el Pacífico, donde es considerada una enfermedad endémica, causante de pérdidas considerables

en el ganado importado, pues las razas de ganado responden de una manera muy diferente a una misma infección. En Argentina, para el 2003, se reportó una alta incidencia para la anaplasmosis, a pesar de no ser una enfermedad de declaración obligatoria; y en Colombia es considerada como una enfermedad de gran importancia, ya que constituye una restricción para el incremento de la productividad ganadera del país. En el estado de Paraná, en Brasil, se reportaron valores de 87,6% de animales positivos en una región donde la anaplasmosis es endémica. En Cuba, durante los primeros años de la década de los 90, la anaplasmosis bovina se presentaba como una de las primeras causas de mortalidad en el ganado adulto. Solamente en el año 1993, se estimó una pérdida superior a los dos millones de dólares (Corona, 2004).

En el caso particular de Venezuela, se observó una muy alta incidencia de la enfermedad (Corona, 2004), los animales destinados al levante y al engorde son trasladados principalmente hacia los estados del oriente, occidente, norte y centro del país, siendo los Estados Zulia y Guárico zonas endémicas para la anaplasmosis (Carrique *et al.*, 2000), mientras que los Estados Monagas y Carabobo son susceptibles (Gonzales *et al.*, 2003). En lo que se refiere al Estado Mérida, se presenta una zona ganadera alta, en los Municipios Libertador, Campo Elías y Sucre, y una zona ganadera baja en los Municipios Alberto Adriani, Obispo Ramos de Lora y Caracciolo Parra Olmedo, donde se encontró una baja prevalencia detectada por pruebas de PCR para *A. marginale*, la cuales son de 45,6% y 22,9% para las zonas ganaderas alta y baja, respectivamente. A pesar de que la presencia de anaplasmosis bovina en las zonas ganaderas altas del Estado Mérida se debe a *A. marginale*, existe una segunda especie, *A. centrale*, que suele causar infecciones benignas, y que es la causante de casi todos los brotes de la enfermedad clínica (Bolívar, 2018).

Los principales síntomas de la anaplasmosis son anemia, ictericia, muerte súbita, pérdida rápida de la producción de leche y del peso, solo pudiendo ser diagnosticada mediante identificación del microorganismo. Una vez infectado, el ganado puede permanecer toda la vida como portador, y la identificación de estos animales depende

de la detección de anticuerpos específicos mediante pruebas serológicas o del ADN de las rickettsias mediante técnicas de amplificación. La enfermedad suele transmitirse por garrapatas que actúan como vector, pero también puede producirse una transmisión mecánica por picadura de insectos o por agujas. (World Organization for Animal Health, 2015).

Uno de los tratamientos profilácticos consiste en el uso de vacunas vivas para proteger el ganado vacuno contra la infección por *A. marginale*, al respecto Sir Arnold Theiler inició el uso de vacunas vivas para el control de la anaplasmosis a principios del siglo XX. Las vacunas vivas implican la exposición del ganado mediante la inoculación con eritrocitos infectados con *A. centrale* o con *A. marginale* atenuada. Otra estrategia ha sido infectar terneros con *A. marginale* y luego tratarlos con tetraciclina, al inicio de la temperatura corporal elevada o la detección de parasitemia (Benavides *et al.*, 2016)

Este método requiere una estrecha vigilancia del ganado y puede no ser aplicable para su uso en grandes rebaños. Incluso con el tratamiento oportuno con tetraciclina, el control de las reacciones posteriores a la inoculación a menudo no tuvo éxito en la prevención de la enfermedad aguda. Sin embargo, la transmisión de otros hemoparásitos transportados silenciosamente por el ganado donante siempre es un riesgo con este enfoque. El ganado vacunado desarrolla infecciones persistentes, lo que típicamente induce una protección de por vida contra la enfermedad clínica y, por lo tanto, generalmente no se requiere una revacunación. El ganado infectado de forma persistente puede no ser inmune a la exposición al desafío con genotipos genéticamente diferentes de *A. marginale*, una circunstancia que podría prevalecer si el ganado fuese reubicado en áreas donde dichas cepas fuesen endémicas (Kocan *et al.*, 2010)

Las vacunas muertas desarrolladas en los EE. UU. en la década de 1960 se comercializaron hasta 1999, cuando se retiraron del mercado. Las vacunas muertas tienen varias ventajas sobre las vacunas vivas, por ejemplo, tienen un bajo riesgo de contaminación con agentes infecciosos indeseables, pueden almacenarse a bajo costo

y generalmente causan reacciones mínimas posteriores a la inoculación. Las desventajas de las vacunas muertas incluyen la necesidad de refuerzos anuales, el alto costo de purificación de *A. marginale* de los eritrocitos, y la falta de protección cruzada entre aislamientos de áreas geográficas muy separadas. Además, la inmunidad protectora que ofrecen las vacunas muertas suele ser menor que la de las vacunas vivas (Kocan *et al.*, 2010). La vacuna recombinante Gavac permite una significativa mejora en el control de las poblaciones de garrapatas *Boophilus microplus*, en condiciones de campo, pero no tiene efecto para otras especies como *Amblioma spp*, también transmisoras de anaplasmosis (Soto, 2010).

El ciclo de vida de *A. marginale* se establece en el vector (garrapata) y en el huésped, la garrapata infectada con *A. marginale* al alimentarse de un bovino, le transmite la forma infectante de *A. marginale* al bovino y esta penetra en los glóbulos rojos del bovino por endocitosis, forma una vacuola con material de la membrana plasmática del eritrocito que engloba al microorganismo, luego se divide por varias series de fisiones binarias, se forman los corpúsculos de inclusión, que contienen colonias limitadas por una membrana y estas últimas serían los cuerpos iniciales, los cuales se liberan por exocitosis que ocurre entre la membrana del corpúsculo de inclusión y la membrana del eritrocito, los corpúsculos iniciales salen e invaden a otros eritrocitos incrementando el número de eritrocitos infectados cada 24 a 48 horas, logrando parasitar el 70% de los eritrocitos en la infección aguda. (Kocan, 2010; Soto, 2013)

En la garrapata, que es un vector biológico, para *A. marginale* el ciclo comienza desde que la forma morfológica (corpúscular) de *A. marginale* coloniza el intestino medio de la garrapata mientras esta se alimenta de la sangre de un bovino infectado, una vez dentro de la garrapata, pasan a su forma vegetativa (colonias con centenares de microorganismos que se dividen por fisión binaria) en las glándulas salivales de la garrapata y luego pasan a la forma infectante cuerpos de inclusión (contiene de 1 a 8 cuerpos iniciales), como se puede representar en las siguientes imágenes (Soto, 2013) (Figura 1 y 2).

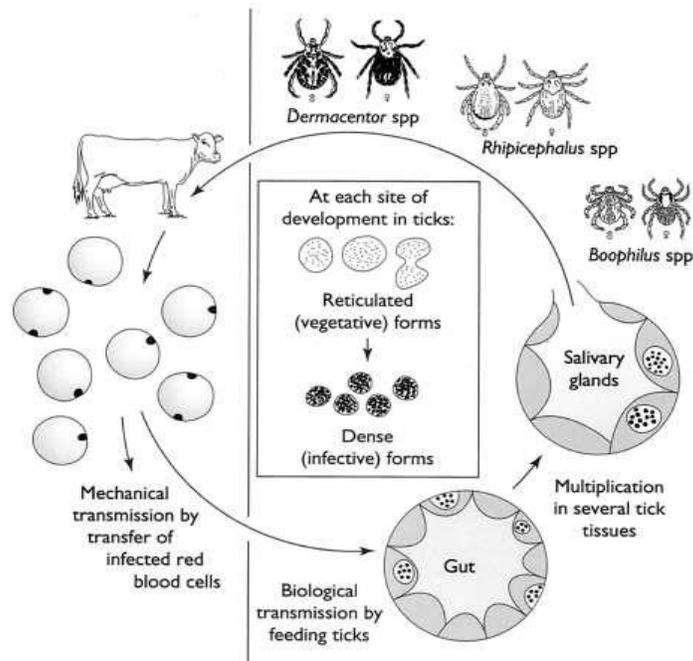


Figura 1. Ciclo de vida de *A. marginale* (Kocan et al., 2003)

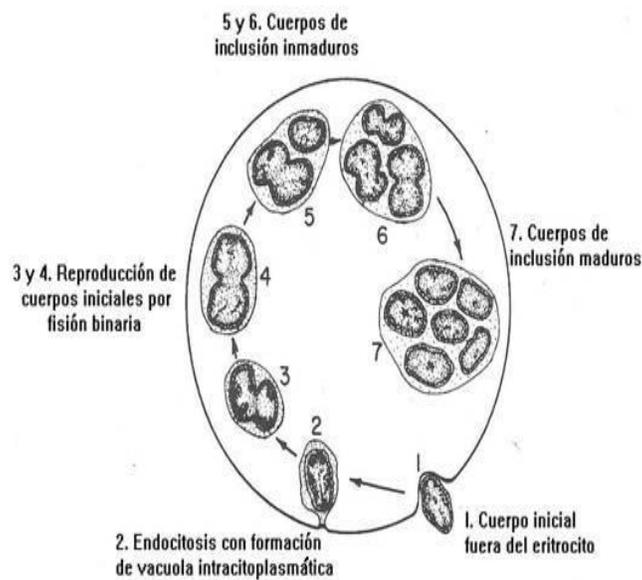


Figura 2. Ciclo de desarrollo de *A. marginale* (Ristic et al., 1997)

Mientras que el periodo de incubación dura de 20 a 45 días, la bacteria intraeritrocítica genera cambios estructurales y bioquímicos en la membrana de los glóbulos rojos, ocasionando un proceso autoinmune mediado por anticuerpos que van en contra de los eritrocitos parasitados y sanos. Estas inmunoglobulinas asociadas a los glóbulos rojos estimulan la eritrofagocitosis extra vascular, removiendo los eritrocitos que están parasitados y los que no del torrente sanguíneo, de forma masiva (Medina, *et al.*, 2017). La transmisión ocurre si durante el momento de la infección la madre está cursando el segundo o tercer tercio de la gestación, provocando el nacimiento de terneros con debilidad, anemia, ictericia o muerte a los pocos días de nacer (Sala, 2013).

Para ejecutar un correcto control de los hemoparásitos se debe conocer el género y especie de los hemoparásitos actuantes en una población específica, y así poder desarrollar estrategias de control adecuadas, como la selección de bovinos tolerantes para las zonas endémicas, y llevar un control adecuado del tratamiento con tetraciclinas para la anaplasmosis (Kocan, 2015).

Es importante diferenciar entre estas parasitosis, y conocer cuando se trata de una primo infección o una pérdida de la homeostasis por desnutrición u otros factores. Las medidas de control están relacionadas ampliamente con el sistema agrícola aplicado. Suarez (2003) considera que el manejo agrícola semi-extensivo es considerado un factor de riesgo, mientras que el sistema extensivo genera un efecto protector contra los hematozoarios. Con la finalidad de identificar el conjunto de factores ambientales que explican la distribución actual de los vectores se han utilizado modelos fenomenológicos, los cuales suponen que las condiciones climáticas representan todo el hábitat adecuado en donde los vectores pueden desarrollarse. (Andrade, *et al.*, 2016).

Es por ello, que se debe mantener a los animales encerrados en las horas de actividad máxima de los vectores y en las épocas de lluvia, donde las poblaciones de vectores para tripanosomiasis son mayores, mientras que para la garrapatas en época

de verano y otoño. En zonas que no son endémicas, se usa como mecanismo de control colocar en contacto a menos del 10% de los terneros frente al microorganismo *A. marginale* antes de los 9 meses, mecanismo que permite que el rebaño tenga menor riesgo de convertirse en susceptible, ya que la tasa de inoculación es insuficiente para infectar a los animales en su vida posterior (Tamasauska, 2010; Benavides, 2013; Fuente, 2006; Suarez, 2003).

En cuanto al diagnóstico microscópico de *A. marginale*, el mismo se realiza por medio de la observación de la bacteria Grampositiva unida a la membrana celular dentro del citoplasma del eritrocito formando cuerpos de inclusión, pudiendo diferenciar el corpúsculo formado en el extremo del eritrocito. Para llevar a cabo esta observación se fija el frotis con metanol y se colorea con Giemsa al 10% por 30 minutos, observando luego al microscopio con aumentos de 100X. Se logran ver puntos marginales dentro del eritrocito o corpúsculos puntiformes en la periferia de los glóbulos rojos, el cual se debe diferenciar del corpúsculo de howelljolly que se forman dentro del glóbulo rojo en las anemias hemolíticas (Soto, 2010) (Figura 3). Este procedimiento puede resultar difícil en el campo, por lo que es necesario llevar a cabo pruebas diagnósticas de alta especificidad y sensibilidad que detecten y evalúen grandes cantidades de muestras geográficamente aisladas, y que permitan la monitorización de estas enfermedades en campo (Tamasauska, 2010).

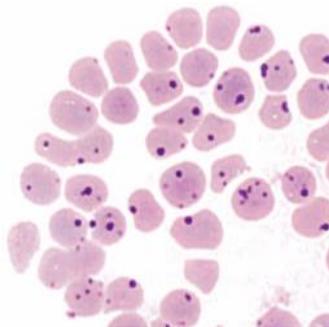


Figura 3. Eritrocitos infectados con *A. marginale* (Rodríguez, 2003).

En efecto, el uso de las técnicas moleculares para el diagnóstico de hemoparásitos en bovinos permite llevar un control y prevenir estas enfermedades, como es el caso del uso de la técnica PCR dirigida a marcadores moleculares específicos que pueden detectar los cambios genómicos en la población de los hemoparásitos en diferentes aislados, y además permite la diferenciación entre especies en la etapa crónica de la enfermedad donde las concentraciones del parásito en sangre son tan bajas que serían indetectables por otros métodos (Medina, 2017).

No obstante, esto dependerá de la especificidad y sensibilidad de los cebadores empleados en la técnica de amplificación. Se ha experimentado con el uso de pruebas moleculares basadas en ADN para el diagnóstico de hemoparásitos, siendo capaces de detectar la presencia de una infección moderada en el ganado vacuno portador y en las garrapatas que actúan como vectores. Recientemente, se han descrito el uso de PCR en tiempo real con una sensibilidad analítica equivalente a la PCR convencional anidada (World Organization for Animal Health, 2015)

Para el éxito de las pruebas de PCR es necesario evaluar la capacidad y eficiencia de los cebadores dirigidos a genes específicos para detectar por PCR las variantes de los hemoparásitos. Esto puede hacerse por medio de herramientas bioinformáticas, a través de un análisis *in silico*, los cuales son sencillos, rápidos y de bajo costo. Por medio de técnicas bioinformáticas se evalúa la especificidad que tiene la PCR para diagnosticar la especie de interés, comprobando la complementariedad específica de los cebadores empleados con la especie problema, o si por el contrario lo hace con otros grupos biológicos generando inespecificidad en el diagnóstico. Esto es posible al comparar la secuencia de los cebadores propuestos con la información disponible en las bases de datos de genes y genomas disponibles en la Web, tal como el Genbank (Castro *et al.*, 2019).

Una vez descrita la situación actual del problema de estudio, este trabajo tiene como finalidad identificar y confirmar *in silico* los cebadores más específicos

empleados en la bibliografía para el diagnóstico de *A. marginale*, para lo cual se formula el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuáles son los cebadores óptimos, según la evaluación *in silico*, para el diagnóstico de *Anaplasma marginale* por PCR?

Justificación de la Investigación

Las variables de estudio de esta investigación son los marcadores moleculares usados en el diagnóstico por PCR de *A. marginale* en bovinos. Por lo tanto, la elección de este evento de estudio se basa en la importancia de obtener un diagnóstico específico. El interés en este tema de investigación se basó en el hecho de que en Venezuela se han reportado brotes de estas enfermedades con importantes daños en la producción, que vienen mermando el sector ganadero del país.

Además, no se cuenta con pruebas diagnósticas de cribado necesarias para la movilización del ganado, ya sea para consumo o la comercialización, que evitarían la diseminación de estos organismos en nuestro país. La vigilancia epidemiológica permite combatir la diseminación de los hemoparásitos, por lo que se hace necesario el mejoramiento del diagnóstico con alta especificidad y sensibilidad de manera accesible, que permita el diagnóstico de rutina en campo (Desquesne y Dávila, 2002).

En regiones tropicales y subtropicales, continúan siendo inestimables las pérdidas económicas en el sector pecuario debido a infecciones por hemoparásitos. A pesar de esta realidad, la detección de tales infecciones se basa fundamentalmente en criterios clínicos y métodos de diagnóstico clásicos, cuyas fallas dificultan tener idea cierta de la prevalencia e incidencia reales de las dolencias ocasionadas en los rebaños. Lo anterior pareciera justificar la necesidad de llevar a cabo estudios científicos de relevancia que permitan el desarrollo de nuevas metodologías, cuyo producto coadyuve a un diagnóstico certero y efectivo de las infecciones referidas, superando la baja sensibilidad y especificidad de los métodos convencionales empleados, apuntando a la biología molecular como estrategia alternativa.

En respuesta a estos desafíos, se presenta la PCR, y su variante múltiple (PCR múltiple, PCR multiplex o mPCR), como técnica diagnóstica con alto grado de especificidad y sensibilidad, carente de interferencia diagnóstica como suele suceder cuando se aplican métodos parasitológicos y/o serológicos. En este sentido, la caracterización de especies con marcadores moleculares puede ser el primer paso hacia la construcción de mejores herramientas diagnósticas (Bolívar *et al.*, 2013).

El desarrollo del presente estudio se justifica por la importancia de conocer la prevalencia de los marcadores moleculares asociados a los distintos fenotipos, en cepas y poblaciones de diferentes áreas geográficas, donde se obtenga la información epidemiológica necesaria para el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos a gran escala, con alta especificidad y sensibilidad para *A. marginale*, con precisión y fiabilidad a diferentes niveles taxonómicos, que sean aplicables en campo (Desquesne, *et al.*, 2002).

Los estudios de los factores determinantes de los hemoparásitos y su estabilidad zoonóticas son aspectos fundamentales para promover la sanidad animal, lograr mejores tratamientos, acciones de prevención y control que disminuyan la presencia de estas enfermedades en la ganadería del país. Es importante destacar que los hemoparásitos representan un gran riesgo para la salud de los bovinos, y por consiguiente causan grandes pérdidas económicas a los ganaderos. El diagnóstico de hemoparásitos en bovinos implica grandes retos y procesos que incluyen la adecuada recolección de muestras en el campo, su posterior envío al laboratorio y la correcta interpretación diagnóstica, para así lograr una apropiada intervención en el campo (Benavides *et al.*, 2013). En definitiva, la presente investigación se enfoca en establecer la importancia del uso de técnicas moleculares en el diagnóstico de hemoparásitos, en particular *A. marginale*, comenzando con el correcto análisis de las secuencias diana y de los cebadores usados para amplificarlas.

El diagnóstico de hemoparásitos es sumamente importante para la detección y tratamiento de las enfermedades bovinas en todo el mundo, incluida Venezuela, ya que la anaplasmosis es una enfermedad que ocasiona anualmente cuantiosas pérdidas

económicas, siendo el uso de las técnicas moleculares los que ofrecen un resultado más confiable que las ya existentes, ya que puede detectar y cuantificar dos especies de *Anaplasma*, aún si están presentes en la misma muestra, por lo que puede ser usado en estudios de patogénesis en la anaplasmosis bovina aguda (Cammilli y Caballero, 2001).

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Analizar de manera *in silico* las secuencias diana descritas en la bibliografía usadas para el diagnóstico molecular de *A. marginale* por medio de PCR.

Objetivos específicos

1. Seleccionar de la bibliografía la secuencia diana idónea para el diagnóstico sensible y específico de *A. marginale* por medio de la técnica de PCR.
2. Determinar entre los cebadores reportados en la bibliografía, dirigidos para la secuencia diana seleccionada, cuales son los más idoneos para el diagnóstico molecular de *A. marginale* por medio de PCR.
3. Realizar PCR *in silico* con los cebadores seleccionados para la detección de *A. marginale*.

Alcances y limitaciones de la investigación

Alcances de la investigación

El desarrollo del presente estudio permite seleccionar entre las secuencias diana y cebadores para las mismas, los más idóneos para una identificación molecular eficiente y específica de *A. marginale* en zonas endémicas, con el objetivo de llevar un control epidemiológico confiable de estos hemoparásitos que permita disminuir la incidencia y el riesgo de desarrollar el cuadro clínico en animales de producción, y se puedan establecer zonas con estabilidad enzootica. Al mismo tiempo, el diagnóstico y caracterización de *A. marginale* permite establecer una correlación con los hallazgos clínicos y hematológicos para instaurar el tratamiento más adecuado.

El conocer los ciclos biológicos, factores medio ambientales de los vectores, así como la fisiopatología de otros patógenos y la respuesta inmunológica, tiene como consecuencia que los protocolos enfocados en la prevención y tratamiento de los animales diagnosticados sean más eficientes. En este sentido, este trabajo realiza un importante aporte para los Licenciados en Bioanálisis que realizan diagnóstico clínico en especies mayores, ya que realiza una extensa revisión bibliográfica y análisis de los genes diana y cebadores usados para el diagnóstico por PCR de *A. marginale*, dirigiendo futuras investigaciones en el perfeccionamiento de los mejores cebadores diseñados para tal fin.

Limitaciones de la investigación

No se encontraron limitaciones para cumplir con los lineamientos establecidos por la Universidad, ya que se contó con el compromiso y plena participación de la organización sometida a estudio, para dar profundidad en la búsqueda de soluciones fiables del problema. Se cuenta con una serie de investigaciones factibles relacionadas al tema en una base de datos relacionada a artículos y tesis de investigación a nivel nacional e internacional, lo cual, servirá como apoyo y aporte

para el desarrollo de los antecedentes investigativos y el marco referencial, conceptual y legal, además con el uso libre de programas bioinformáticos para el estudio *in silico*. La principal limitación es el acceso abierto a todos los trabajos científicos que pueden estar relacionados con el tema de investigación, siendo necesario el uso de terceros para tener acceso a los mismos.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Entre las investigaciones relacionadas con el tema de interés cabe mencionar el trabajo desarrollado por Aguilar (2017) titulado “*Prevalencia de Anaplasmosis Bovina en cuatro fincas del Municipio de Macuelizo, Nueva Segovia, en el periodo julio-noviembre de 2017*”, presentado ante la Universidad Nacional Agraria, Nicaragua. Este estudio, se realizó con el objetivo de determinar la prevalencia de anaplasmosis bovina en el municipio Macuelizo, que cuenta con una precipitación anual de 1.000 mm³, temperaturas que oscilan entre los 27 y 29°C, y una humedad relativa de 36°C. Se tomaron 100 animales adultos, mestizos, de entre 3 y 10 años, muestreando el 16% acumulado total de la población bovina.

La toma de muestras se realizó mediante venopunción yugular, tomando entre 5 y 7 ml de sangre, para realizar posteriormente 2 frotis sanguíneos por cada muestra, utilizando el método de tinción Giemsa y posterior identificación de mórulas de *A. marginale*. Los resultados obtenidos revelan que la prevalencia de anaplasmosis fue 31,25%; así mismo, se observaron animales sintomáticos para otro hemoparásito. De

este estudio se conoció la alta prevalencia que puede presentar la anaplasmosis en una población controlada de interés.

Además, Carrillo (2017) presenta su estudio titulado “*Detección microbiológica y molecular de Anaplasmaspp, en ganado bovino del Municipio de Ovejas, Sucre-Colombia*”, el cual fue presentado ante la Universidad de Sucre para optar al título de Bióloga. En este trabajo se realizó diagnóstico microbiológico de la infección por *Anaplasma* spp. mediante frotis sanguíneo teñido con Wright; mientras que, la detección molecular se llevó a cabo por PCR del *ADNr16S*, que codifica para el ARNr16S de la subunidad pequeña del ribosoma. Una vez obtenido el amplicón, la identificación a nivel de especie se realizó mediante el análisis de la secuencia del gen que codifica para las proteínas de choque térmico (GroEL). Se determinó que existe un grado de concordancia pobre ($K= 0,152$) entre ambos métodos diagnósticos. Se encontró una frecuencia de infección del 9,74% (n:19/194) por métodos microbiológicos; mientras que por medio de PCR-*ADNr16S* se encontró una prevalencia de infección del 76,41% (149/194).

Posteriormente, en 60 de las 149 muestras evaluadas por PCR-*groEL* se amplificó el gen de la proteína GroEL, con el que se obtuvo una prevalencia de 30,77%, con porcentaje de identidad entre 98 y 100% para *A. marginale*. La autora llega a la conclusión de que por medio del análisis filogenético de las secuencias de la proteína GroEL, se encontró que *A. marginale* es la especie infectante en los bovinos del municipio en estudio, que existe una diferencia estadística entre la raza (F (coeficiente entre dos variantes) =0,004; $p < 0,005$) y la pérdida de peso ($F=5,0734$; $p < 0,005$) al correlacionar los factores demográficos y la prevalencia de la infección.

Asimismo, Soto (2010), en su investigación titulada “*Determinación de la prevalencia de anaplasmosis de el ganado bovino faenado en la empresa metropolitana de rastro de Quito (EMRQ) mediante la aplicación de las técnicas de diagnóstico: microscopía de frotis sanguíneo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ensayo inmunoenzimático competitivo (cELISA)*”. Se realiza este estudio con la finalidad de determinar la prevalencia de *A. marginale* en los bovinos muestreados.

Para ello se evaluaron 181 muestras por medio de la técnica de microscopía de frotis sanguíneo, PCR y cELISA.

A través de la técnica de microscopía de frotis sanguíneo, se obtuvo una prevalencia de 28,18% (51/181); por la técnica de PCR de 91,71% (166/181); mientras que, por cELISA fue de 91,16% (165/181). No se encontraron diferencias significativas con relación a la presencia de *A. marginale*, genero, sexo y procedencia de los animales. Se realizaron tablas de doble entrada, donde se compararon la microscopía de frotis sanguíneo y cELISA con respecto a la PCR. La PCR fue considerada como la técnica *gold standard* en relación a los parámetros de sensibilidad, especificidad y valores predictivos, obteniéndose para la microscopía de frotis sanguíneo una sensibilidad de 28,92%, especificidad de 80%, valor predictivo positivo de 94,12% y valor predictivo negativo del 9,23% para la identificación de *A. marginale*.

Para la técnica de cELISA se determinó una sensibilidad de 96,39%, una especificidad de 66,67%, valor predictivo positivo de 96,97% y valor predictivo negativo del 62,50%, por medio de la detección de anticuerpos IgG en los bovinos muestreados. La recopilación bibliográfica permitió conocer que la técnica más usada para la determinación de la prevalencia de anaplasmosis fue la microscopia de frotis sanguíneo con tinción Giemsa. Este estudio aportó las referencias bibliográficas referentes a la anaplasmosis y a la técnica PCR como herramienta eficaz para su diagnóstico.

Por otro lado, cabe mencionar la investigación realizada por Tamasaukas *et al.* (2010) titulada “*Hemoparasitosis en ganadería de doble propósito venezolana, diagnóstico y control: una revisión*” Tesis Doctoral publicada en la Revista Agronomía Mesoamericana, en donde se exponen resultados de investigaciones realizadas en el periodo 1971 a 2009 sobre cuatro hemoparasitosis causadas por protozoarios y rickettsiales en Venezuela y otros países, con énfasis en la infección mixta, diagnóstico y control en rebaños bovinos.

Los autores llegaron a la conclusión de que en Venezuela las afecciones causadas por agentes hemotrópicos parasitarios están distribuidas en todos los estados del país con vocación ganadera, en especial en rebaños bovinos y bufalinos, entre los que se pueden encontrar los géneros *Anaplasma* (*A. marginale*), *Babesia* (*Babesia bigemina* y *B. bovis*), y *Trypanosoma* (*Trypanosoma vivax*), con una frecuencia endémica y con variaciones estacionales. El aporte que se obtiene de esta investigación es netamente documental, de aquí se obtuvo información sobre los métodos y técnicas de diagnóstico para *A. marginale*, lo que permitirá guiar el desarrollo de los objetivos del estudio.

Finalmente, cabe mencionar la investigación realizada por Tavares (2006) titulado “Estandarización de la técnica de PCR para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina y ovina”. Los investigadores resaltan que, en Venezuela, el 47,6% del ganado bovino se encuentra afectado por esta enfermedad, ocasionando grandes pérdidas en estos rebaños; sin embargo, se desconoce la incidencia de esta enfermedad en el ganado ovino, por lo que el objetivo de este trabajo fue estandarizar la técnica de PCR para la detección de *A. marginale* en muestras de sangre de bovinos y ovinos.

Para esto se utilizaron dos iniciadores Ana19A y Ana19B, específicos para amplificar el gen de la proteína MSP5 en *A. marginale*. Con la finalidad de probar el PCR estandarizado, se analizaron muestras de sangre bovina provenientes de una zona endémica, resultando positivas el 40% de las muestras. En el caso de los ovinos, un 25% de las muestras analizadas resultaron positivas. En conclusión, la técnica demostró su versatilidad en la detección de *Anaplasma* sp., constatando la presencia de esta rickettsia en ovinos de Venezuela, lo que hasta el presente no había sido determinada por métodos moleculares.

Bases Teóricas

A continuación las referencias teóricas que avalan documentalmente al presente estudio, citando a autores que han investigado sobre las diferentes enfermedades asociadas al ganado tomando como principal contexto de estudio el *A. marginale* por ser el objetivo a desarrollar. Es importante explicar que los microorganismos que más afectan al ganado son *B. bovis*, *B. bigemina*, *Theileria* sp, *A. marginale* y *T. vivax*, los cuales causan enfermedades graves a los animales de granja ocasionando la muerte, siendo los síntomas más comunes de estas enfermedades anemia leve a grave, estrés y debilidad con posibilidades de aborto cuando el animal está preñado. Cuando el ganado se recupera, se convierten en portadores de los parásitos protozoarios y contribuyentes en los agentes infecciosos dentro de las garrapatas (Tananyutthawongese, 1999).

Género *Anaplasma*

El género *Anaplasma* fue descubierto en 1910 por Sir Arnold Theiler, e incluye patógenos que afectan la salud humana y animal, generando importantes pérdidas económicas (Kocan *et al.*, 2010). Las bacterias del género *Anaplasma* se clasifican dentro del orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceae, y se definen como microorganismos Gram positivos, a menudo pleomórficos, cocoides a elipsoidales, no móviles, que residen dentro de vacuolas citoplasmáticas solos o en forma de inclusiones compactas presentes en células hematopoyéticas maduras o inmaduras, particularmente células mieloides y neutrófilos, incluyendo eritrocitos de hospederos mamíferos (Kuttler, 1984; Aubry y Geale, 2011). Estas bacterias infectan células sanguíneas de una gran variedad de mamíferos que incluyen al ganado bovino, ovino, caprino, rumiantes salvajes y humanos.

El género *Anaplasma* comprende varias especies entre ellas *A. marginale* como la especie típica, que infecta a los eritrocitos del ganado bovino con distribución en Estados Unidos, Costa Rica, Venezuela, Colombia, Brasil, Paraguay y Argentina. *A.*

phagocytophilum causa erliquiosis granulocítica humana transmitida por garrapatas, y la anaplasmosis granulocítica en ovejas, caballos y perros, su célula diana son las células granulocíticas, las inclusiones se denominan morulas y emerge como patógenos del ganado y otros rumiantes, claramente produce una enfermedad diferente a *A. marginale* y es transmitido por otros géneros de garrapatas, con distribución en América del norte, del sur, Europa, África *A. platys*, se ha considerado un patógeno que infecta las plaquetas sobre todo de la sangre de los perros, pero recientemente se ha detectado una cepa de *Anaplasma* sp. estrechamente relacionada con *A. platys* en rumiantes de Sicilia; sin embargo, el autor no informó de ningún síntoma asociado a esta infección, además presenta distribución en América. *A. marginale* subespecie *centrale* (*A. centrale*) se asocia ocasionalmente con enfermedades clínicas y se usa como vacuna viva en bovinos (Dumler *et al.*, 2001; OIE, 2015; Dhamani, 2015; Kocan, 2015; Soto, 2010). *A. ovis* un patógeno infeccioso para ovejas domésticas y salvajes, no se ha informado que puede infectar o establecer una infección persistente en el ganado. Por lo tanto, las ovejas o las cabras infectadas con *A. ovis* no deben posar un riesgo para el ganado (Kocan *et al.*, 2010). A pesar del parentesco genético de los organismos reagrupados en la nueva taxonomía del género *Anaplasma* muchos aspectos son diversos como el huésped, célula diana, proteínas principales de superficie y vectores (Kocan, 2010; Kocan, 2015). Estas dos bacterias, *A. marginale* y *A. centrale*, infectan los eritrocitos y se agrupan juntas y separadas de la granulocítica *A. phagocytophilum*, lo que respalda la interpretación de que pertenecen a géneros distintos. (Dhamani, 2015).

Los eritrocitos, son la célula hospedera de *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis*, las inclusiones dentro de los eritrocitos se denominan "cuerpos marginales" o "iniciales"; mientras que, los granulocitos son la célula hospedera de *A. phagocytophilum* y las inclusiones se denominan "mórula". Dado que *A. marginale* solo infecta a los rumiantes, el ganado bovino infectado de forma aguda o persistente no representa una amenaza para la salud humana. Sin embargo, si *A. phagocytophilum*, es un patógeno humano y emerge de los patógenos del ganado u otros rumiantes (Kocan, 2015).

Genoma y proteínas de superficie de A. marginale.

A. marginale presenta un ADN circular de entre 1200 y 1250 Kpb, cuyo contenido de G+C es de 56% en moles (Corona, *et al*, 2004). Se han identificado seis genes (*msp1 α* , *msp1 β* , *msp2*, *msp3*, *msp4* y *msp5*) que codifican para las proteínas principales de superficie, las cuales desempeñan un papel crucial en la interacción de *Anaplasma* con las células del hospedero (Nieves, 2018). Los genes *msp1 α* , *msp4* y *msp5* son genes de copia única, mientras que, *msp1 β* , *msp2* y *msp3* pertenecen a familias de multigenes y pueden variar antigénicamente dentro de las cepas de *Anaplasma* (Allemans *et al.*, 1993; Kocan *et al.*, 2003).

La secuenciación del genoma completo de la cepa St. Maries, permitió determinar que la superficie celular está dominada por la superfamilia *msp2* y la superfamilia *msp1*, que contienen proteínas inmunodominantes. Además, el genoma contiene pseudogenes funcionales inusuales (pertenecientes a la superfamilia *msp2*) que desempeñan un papel fundamental en la variación antigénica del revestimiento superficial. El genoma contiene inusuales pseudogenes funcionales que pertenecen a la superfamilia *msp2* y desempeñan un papel integral en la variación antigénica de la capa de superficie, por lo que son claramente de los pseudogenes descritos como subproductos de la evolución reductora en otras Rickettsias; estas dos familias comprenden más de la mitad de las moléculas previstas de este organismo (Brayton *et al.*, 2005). Las proteínas principales de membrana (MSPs) interactúan a nivel del sistema inmunitario de los hospedadores. Estas proteínas generan una respuesta inmune eficiente por lo que son útiles para el diagnóstico y para la prevención de la anaplasmosis bovina (Barbet *et al.*, 1991; Sala, 2013).

Epidemiología de A. marginale

Anaplasma es transmitido de forma biológica por al menos 19 especies de garrapatas, dentro de las cuales se encuentran garrapatas blandas y duras, principalmente las del género *Rhipicephalus* spp., (incluidas las ex *Boophilus*), *Dermacentorspp.*, *Ixodes* sp y *Hyalomma* spp (OIE, 2015). La distribución geográfica de las garrapatas y la variación en su población está determinada por varios factores como el clima, la configuración del paisaje y los movimientos de sus hospederos. En los últimos años se ha sugerido que *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* ha aumentado su distribución altitudinal, de acuerdo con el aumento de la temperatura de los últimos años y se espera que la distribución de la anaplasmosis continúe cambiando, como resultado del calentamiento global (Cortés-Vecino, 2011).

A. marginale es endémica en todo el mundo, en áreas tropicales y subtropicales, generando enfermedad hemolítica de leve a severa, afectando principalmente a los bovinos; sin embargo, recientemente se ha encontrado en ovejas y cabras (Yousefi *et al.*, 2017) con evidencia serológica de infección en una gama aún más amplia de especies de rumiantes (Kuttler, 1984). Esta bacteria se transmite de un animal enfermo a uno sano a través de garrapatas del género *Dermacentor* en EUA, y en Latinoamérica por *R. microplus*. Sin embargo, esto último es controversial, debido a que en Latinoamérica pareciera ser más importante la trasmisión por moscas hematófagas como el tábano (*Tabanus* spp.) (Medina *et al.*, 2017). *A. marginale* puede ser transmitido mecánicamente en las piezas bucales de insectos hematófagos (entre ellos tábanos y mosquitos del género *Psorophora*), o por inoculación directa de eritrocitos infectados a animales susceptibles a través de agujas hipodérmicas contaminadas e instrumentos quirúrgicos, fómites contaminados incluidos los dispositivos de marcaje auricular, equipos de tatuaje, sierra de desconrnes, pinzas para el hocico y, en algunos casos, por vía transplacentaria (Bolivar, 2013; Witchuta, 2021).

Métodos de Diagnóstico de infecciones parasitarias en ganado

Existen varios métodos de diagnóstico para la detección de infección parasitaria en el ganado, métodos directos (microscópicos y moleculares) e indirectos (serológicos). Estos últimos confrontan como inconveniente principal la baja sensibilidad en la medida que la infección tiende a la cronicidad, o mientras la parasitemia se mantiene en niveles bajos (De Almeida *et al.*, 1997). Algunos métodos serológicos como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), el cual se basa en la unión específica entre el antígeno y el anticuerpo, tienen un costo elevado; mientras que, los métodos basados en el ADN se limitan a la detección de un único agente infeccioso.

Los métodos serológicos como ELISA y la inmunofluorescencia indirecta (IFI) parecieran ser los métodos que han proporcionado los mejores resultados; sin embargo, las principales deficiencias son no poder discriminar entre infecciones recientes y pasadas, y no diferenciar entre reacciones cruzadas con otros patógenos (Desquesnes, 1997; Morlais *et al.*, 2001). La IFI ha sido utilizada para el diagnóstico de anaplasmosis, este consiste en detectar inmunoglobulinas del suero bovino por intermedio de dos reacciones: con la bacteria y con la globulina antibovina teñida con fluoresceína.

Frecuentemente, la IFI se ha considerado una prueba sensible, sin embargo, siendo inútil en ocasiones ya que pueden encontrarse falsos positivos que se atribuyen al largo período de incubación de esta enfermedad. Esta prueba permite la visualización de reacciones Ag-Ac por medio de marcaje de una inmunoglobulina con fluorocromos, sustancias con capacidad de absorción de energía luminosa, tornándose excitadas por un breve periodo de tiempo (10^{-9} a 10^{-7} segundos), emitiendo fluorescencia al retornar a su estado normal (Soto, 2010).

La inmunofluorescencia indirecta y los ensayos inmunoenzimáticos utilizando la MSP-5 recombinante (una de las seis proteínas mayoritarias de superficie altamente conservada e inmunogénica en todas las cepas conocidas de *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis*) son de uso rutinario en algunos laboratorios de diagnóstico dependientes de

universidades, donde pueden ser usadas en los programas de erradicación y regulación de movilización de animales además de que facilitan las investigaciones epidemiológicas. A pesar del empleo de estos métodos en la detección de *A. marginale*, el diagnóstico se dificulta por la baja sensibilidad y especificidad de 58% y 46% respectivamente, que presentan estas técnicas (Bolívar *et al.*, 2018).

Por otro lado, el ensayo de ELISA competitivo, utilizando la proteína recombinante MSP5, permitió el incremento de la sensibilidad a un 96% y la especificidad a un 95 %, pudiendo detectar las infecciones persistentes del parásito (Torioni de Echaide *et al.*, 1998). En el año 2000 se desarrolló un ELISA comercial para la detección de anticuerpos contra *A. marginale* y *A. centrale* en Australia y Zimbabwe. En Australia, la sensibilidad y especificidad fueron de 100% y 83,3 %, respectivamente; mientras que, en Zimbabwe se mostró una sensibilidad de un 100%, pero no se pudo calcular la especificidad por la poca cantidad de sueros positivos con que se contaba (Bowles *et al.*, 2000). La técnica de ELISA, no permite identificar animales portadores con baja carga parasitaria y la construcción de un antígeno recombinante específico de especie es muy costoso, lo que conlleva a diagnósticos poco específicos o reacciones cruzadas con otras especies, siendo la PCR la técnica específica para estos casos (Kocan *et al.*, 2010, Hernández *et al.*, 2017)

Diagnóstico molecular de parásitos

Los métodos moleculares aplicados para el diagnóstico de parásitos suponen un avance en la identificación de las principales enfermedades que afectan al ganado bovino, ya que permiten identificar la especie causante de la enfermedad de forma más sensible y específica que los métodos clásicos, como la histología. Su alta sensibilidad favorece una detección temprana de estos patógenos, evitando su transferencia a zonas y hospedadores libres de la enfermedad. Son herramientas recomendadas para realizar programas de vigilancia que minimicen brotes epidémicos, que den lugar a elevadas mortalidades y grandes pérdidas económicas. El uso integrado de herramientas moleculares y bioinformáticas avanzadas puede ser

crucial para apuntalar la investigación de la biología de las enfermedades, y proporcionar perspectivas sin precedentes para el diseño de métodos de intervención que frenen el desarrollo de las enfermedades (Abollo y Villalba, 2015).

En otras palabras, los métodos moleculares permiten la identificación de la especie con una pequeña cantidad del ADN del parásito, identificando a la especie independientemente de su morfología, patogenicidad, hospedero y distribución geográfica, permiten evaluar relaciones genéticas, discriminar relaciones entre especies y subespecies, sirven como marcadores taxonómicos, y son la base de nuevos e importantes métodos para la epidemiología y la filogenia.

La PCR permite la detección de parásitos por debajo del límite de detección comúnmente utilizado en técnicas parasitológicas microscópicas. Para la prueba de PCR se han ensayado una serie de iniciadores, la mayoría con resultados satisfactorios. Por ejemplo, ensayos de PCR simple empleando los primers BAP-2 y AL34S, que amplifican un fragmento de 409 pb del gen *msp1β* de un aislado de *A. marginale* de Florida, han servido para determinar la presencia de este microorganismo en la hemolinfa y en la saliva de *Dermacentor andersoni*, demostrando así, tanto la participación de la garrapata como vector y la vía de transmisión (Bolívar *et al.*, 2018).

A lo largo del tiempo las técnicas de biología molecular, en la lucha contra las enfermedades infecciosas, se ha hecho necesaria la optimización de la especificidad, sensibilidad y rapidez de técnicas de diagnóstico tradicional (Bolívar, 2014). El método más efectivo para diagnóstico molecular de bacterias es la técnica de PCR multiplex, ya que permite la detección simultánea de diferentes agentes patógenos mediante la amplificación de genes de su ADN genómico. La PCR multiplex ha sido capaz de detectar la presencia de hasta cinco parásitos diferentes en una sola reacción. La rapidez y sensibilidad de esta técnica la hacen adecuada para encuestas epidemiológicas a gran escala, para determinar la frecuencia de infecciones parasitarias en ciertas regiones de transmisión, y para la evaluación de tratamientos farmacológicos para tales infecciones (Tananyutthawongese *et al.*, 1999).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR fue creada por el científico Kary Mullis a mediados de los 80, y desde entonces se han incrementado exponencialmente sus aplicaciones, debido a que permite obtener *in vitro* un gran número de copias de fragmentos específicos de ADN, basándose en un principio muy sencillo: la utilización de mecanismos similares a los empleados por la propia célula en la replicación del ADN durante la división celular (Rodríguez, 2004). La reacción en cadena de la polimerasa consiste en la repetición cíclica de tres etapas (Watson *et al.*, 1992):

- **Desnaturalización del ADN bicatenario** presente en la muestra para separar las dos cadenas, mediante la aplicación de temperaturas superiores a 90°C.
- **Unión específica de los cebadores** (oligonucleótidos sintéticos) a las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases. La temperatura a la que se realiza esta unión (T_a , *annealing temperature*) es muy importante para controlar la especificidad de la reacción. La T_a depende de la composición de bases y del tamaño de los cebadores. Se suelen emplear dos cebadores que se unen cada uno a una cadena diferente, delimitando la secuencia diana que se pretende amplificar. La selección de dichos cebadores constituye uno de los puntos más críticos del ensayo de PCR.
- **Extensión de la cadena de ADN a copiar** a partir de los cebadores, utilizando los nucleótidos presentes en la solución. Dicha extensión la lleva a cabo la enzima ADN polimerasa, que inicia su actividad tras reconocer la unión de los cebadores a las cadenas de ADN de la muestra.

La polimerasa empleada inicialmente, procedente de *Escherichia coli*, se desnaturalizaba cuando se sometía a temperaturas superiores a 90°C durante la primera etapa de cada ciclo, y por lo tanto, había que reponerla al inicio de cada fase de extensión. En la actualidad, se utilizan enzimas termoestables como la Taq polimerasa, procedente del microorganismo termófilo *Thermus aquaticus*. Después

de cada ciclo se obtiene como resultado la duplicación de la secuencia de ADN diana delimitada por la pareja de cebadores específicos. Dado que las nuevas copias también sirven como patrones en los subsiguientes ciclos, la cantidad de ADN generado se incrementa exponencialmente. De este modo, al final de n ciclos, el número de copias de ADN por cada molécula será de 2^n . (Rodríguez, 2004).

El diseño de cebadores es un paso inicial crucial en cualquier experimento que utilice PCR para apuntar y amplificar una secuencia de nucleótidos conocida de interés. Los cebadores diseñados correctamente aumentarán la eficiencia de la amplificación por PCR y aislarán la secuencia de interés objetivo con mayor especificidad. Muchos factores que pueden limitar el éxito de un par de cebadores se pueden detectar a priori con métodos computacionales. Por ejemplo, la detección de dímeros de cebadores, la amplificación de productos alternativos, la interferencia del bucle de tallo, las temperaturas de fusión extremas y las variaciones específicas del genotipo en la secuencia objetivo pueden considerarse computacionalmente para minimizar las fallas posteriores de la PCR.

El uso de herramientas de análisis de secuencia computacional para seleccionar el mejor par de cebadores de los candidatos disponibles no solo reducirá las tasas de falla experimental, sino que también evitará la generación de resultados engañosos derivados de la amplificación de productos alternativos (Li y Brownley 2010).

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): programa utilizado para buscar similitudes entre dos secuencias. En el diseño de cebadores, BLAST puede configurarse para buscar sitios de unión de cebadores en un conjunto de secuencias para predecir la amplificación de productos alternativos. BLAST está disponible en el sitio web del NCBI (Li y Brownley, 2010).

Si los pares de cebadores seleccionados también se hibridan y flanquean la secuencia que no fue el objetivo, la reacción de RT-PCR también amplificará regiones no deseadas de ARN, lo que dará lugar a una población heterogénea de productos. Es posible predecir cuándo ocurrirán estas situaciones, a priori, para evitarlas (Li y Brownley, 2010).

Análisis in silico

El análisis *in silico* es parte de la bioinformática, una ciencia inter disciplinar que vincula varios campos de estudio. La base de esta área de las ciencias biológicas se centra en la utilización de herramientas computacionales para la simulación y análisis de problemas sobre escalas de tal magnitud que sobrepasan los métodos tradicionales de análisis y experimentación. Una constante en proyectos de bioinformática, es el uso de herramientas matemáticas para extraer información útil de datos producidos por técnicas biológicas de alta productividad, como la secuenciación del genoma (Raies *et al.*, 2016).

La Biología de Sistemas analiza el funcionamiento de las células desde un punto de vista global, centrándose en el sistema en su conjunto más que en las partes (Wolstencroft *et al.*, 2017). Este enfoque permite comprender íntegramente el funcionamiento de los sistemas biológicos y profundizar en el entendimiento de cómo sus interacciones internas y con otros sistemas conllevan a la aparición de nuevas propiedades, llamadas "propiedades emergentes". Al igual que la biología computacional, el análisis *in silico* se apoya en el uso de métodos matemáticos-computacionales (Rodríguez, 2018).

Todo lo anterior hace de esta incipiente rama de la ciencia un área eminentemente multidisciplinar que requiere la colaboración de científicos de diferentes campos del conocimiento como la biología, la química, la informática, y la ingeniería, con el objetivo (Baltes *et al.*, 2015).

Análisis y diseño de cebadores para PCR

Los primers o cebadores son secuencias cortas de moléculas de ácidos nucleicos (entre 18 a 24 pares de bases) que son utilizados para la amplificación de un gen o un fragmento de ADN de interés, mediante la PCR. De tal forma que los cebadores o primers, son uno de los principales ingredientes para una reacción de PCR, y de ellos

depende la especificidad, porque al unirse complementariamente a las dos cadenas de ADN de la secuencia molde, fijan por así decirlo las coordenadas donde se llevará la reacción. Para poder obtener un par de primers eficientes, se necesita un análisis cuidadoso de la región de interés, ya que existen muchos factores que pueden influir, tales como hibridación entre los primers o formación de estructuras secundarias, lo que podría resultar en obtener amplificaciones de fragmentos no deseados fuera del blanco de la región de interés. Sin embargo, gracias al diseño asistido por computadora, es relativamente fácil obtener un par de cebadores óptimos (Riveroll, 2022).

Primer-BLAST

Primer-BLAST es una herramienta que ofrece la capacidad de especificar el número de desajustes que debe tener un par de cebadores específico con objetivos no deseados, y una región final personalizada de 3' donde debe estar presente cierto número de discrepancias. El programa combina BLAST con un algoritmo de alineación global para garantizar una alineación completa entre el cebador y el objetivo, siendo lo suficientemente sensible como para detectar objetivos que tienen un número significativo de discrepancias con los cebadores. Primer-BLAST permite a los usuarios diseñar nuevos cebadores específicos de objetivos en un solo paso, así como verificar la especificidad de los cebadores preexistentes.

Primer-BLAST también admite la colocación de cebadores en función de las ubicaciones de exón/intrón y la exclusión de sitios de polimorfismo de nucleótido único (SNP) en los cebadores, una herramienta de diseño de cebadores de propósito general robusta y totalmente implementada que diseña cebadores de PCR específicos de objetivos. Primer-BLAST ofrece opciones flexibles para ajustar el umbral de especificidad y otras propiedades del primer (Ye *et al.*, 2012).

El programa Primer-BLAST consta de un módulo para generar pares de cebadores candidatos, y un módulo para comprobar la especificidad de la diana de los pares de cebadores generados. El módulo de comprobación de especificidad utiliza BLAST, junto con el algoritmo de alineación global de Needleman-Wunsch (NW) para buscar

coincidencias entre los cebadores y los objetivos (Ye *et al.*, 2012). El programa Primer-BLAST se ejecuta en una granja de máquinas en el NCBI (del inglés *National Center for Biotechnology Information*) para brindar un servicio más rápido y confiable a usuarios.

Definición Operacional de Términos

Análisis *in silico*: es el área de las ciencias biológicas que se apoya en el uso de métodos matemáticos-computacionales. Dentro del análisis en sistemas biológicos es de interés poder comparar la estructura de diferentes organismos.

Anaplasmosis: Son enfermedades similares transmitidas por garrapatas que causan síntomas parecidos a los de la gripe, como fiebre, dolores musculares y dolor de cabeza.

Anaplasmosis bovina: es una enfermedad transmitida por la picadura de las garrapatas y otros agentes hematófagos como moscas y tábanos. La piroplamosis o anaplasmosis bovina es una enfermedad bacteriana de curso agudo, causada por la rickettsia *A. marginale*, la cual se presenta en zonas tropicales, subtropicales y en algunas regiones templadas.

Anaplasma marginale: Es una especie de bacteria que causa la anaplasmosis bovina. Es una bacteria Grampositiva y la más patogénica de las especies de su género. Se encuentra distribuido por las regiones tropicales y subtropicales.

Garrapatas: Las garrapatas son ácaros cosmopolitas, ectoparásitos temporales obligados de reptiles, aves o mamíferos. Por su gran tamaño (al menos en el estado adulto), resultan observables a simple vista. Han sido reconocidas desde la antigüedad como ectoparásitos obligados, ya que se alimentan exclusivamente de sangre. Los daños que causan pueden ser directos, al ejercer una acción traumática, tóxica, infecciosa y expoliatriz; e indirectos, representados por el deterioro de la piel, disminución de la producción de carne y leche, crecimiento retardado en los

animales, dificultad en la aclimatación de razas seleccionadas y predisposición a contraer enfermedades.

Métodos de diagnóstico molecular: Se aplica para la identificación de las principales enfermedades que afectan al ganado bovino y la especie causante de la enfermedad de forma sensible y específica su alta sensibilidad favorece una detección temprana de estos patógenos, evitando su transferencia a zonas y hospedadores libres de la enfermedad

MSP2: Proteína principal de superficie que presenta epitopes en la membrana de *A. marginale*

MSP-1: Es una proteína de membrana de superficie de *A. marginale*, que interactúa con el receptor de membrana del eritrocito, y por lo tanto está implicada en el reconocimiento de la bacteria por glóbulo rojo.

PCR: La técnica de PCR es un proceso basado en el uso de la enzima Taq ADN polimerasa para amplificar regiones de ADN. De esta manera se aumenta la cantidad de dichas regiones en la muestra para su consecuente estudio o uso en otros ensayos.

Primers o cebadores: Son secuencias cortas de moléculas de ácidos nucleicos (entre 18 a 24 pares de bases) que son utilizados para la amplificación de un gen o un fragmento de ADN de interés, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Primer-BLAST: Es la única herramienta que ofrece la capacidad de especificar el número de desajustes que debe tener un par de cebadores específico con objetivos no deseados y una región final personalizada de 3' donde debe estar presente cierto número de discrepancias.

Rickettsiales: Es un género de bacterias (colectivamente denominadas rickettsias) que pertenece a la familia Rickettsiaceae (junto con los géneros *Orientia* y *Wolbachia*). Las rickettsias son bacterias muy pequeñas, gram-negativas, que no forman esporas. Son altamente polimórficas pues se pueden presentar como cocos (0,1 μm de diámetro), bacilos (1-4 μm de longitud) o hilos (10 μm de largo). Se tiñen mal con la tinción de Gram y al examinar cultivos debe haber especial cuidado por

esta característica. En el pasado eran considerados microorganismos intermedios entre los virus y las bacterias. Las rickettsias son causantes de enfermedades infecciosas transmitidas por aerosoles, mordeduras, picaduras, rasguños, aguas y alimentos contaminados. Ejemplos son el tifus clásico (transmitido por piojos), el tifus murino (por pulgas) y la fiebre de las Montañas Rocosas (por garrapatas). Así mismo, han sido asociadas a una gran variedad de enfermedades de las plantas.

www.bdigital.ula.ve

Operacionalización de las Variables

Objetivo General: Analizar las secuencias diana descritas en la bibliografía usadas para el diagnóstico molecular de *A. marginales* por medio de PCR.

Tabla 1. Operacionalización de las Variables

Objetivos Específicos	Variables	Dimensiones	Indicadores
Seleccionar de la bibliografía la secuencia diana idónea para el diagnóstico sensible y específico de <i>A. marginale</i> por medio de la técnica de PCR.	Secuencia diana idónea para el diagnóstico sensible y específico de <i>A. marginales</i> por medio de la técnica de PCR.	Diagnóstico de <i>A. marginale</i>	Seleccionar la secuencia diana idónea
Determinar entre los cebadores usados en la bibliografía para la secuencia diana seleccionada, los más efectivos para el diagnóstico molecular de <i>A. marginale</i> por medio de PCR	Cebadores usados para el diagnóstico por PCR de <i>A. marginale</i>	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	- Ana19A - Ana19B
Realizar PCR <i>in silico</i> con los cebadores seleccionados para la detección de <i>A. marginale</i> .	Especificad <i>in silico</i> de los cebadores	Etapas del ciclo de reacción del PCR	Desnaturalización - Hibridación o annealing - Extensión o polimerización

Nota: La Autora

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

La determinación del tipo de investigación se basa en los métodos, técnicas y estrategias que tienen relación con el problema, en la cual se establece el objetivo de estudio. En este caso la investigación que se estudia es de tipo documental. El cual busca mostrar soluciones a una situación determinada a partir de un proceso que consiste en recopilar, analizar e integrar la información. Arias (2012) define que este enfoque se utiliza cuando se requiere una mejor comprensión del problema de investigación, que no se podría adquirir con cada uno de los métodos por separado.

Es importante recalcar que además de la división en fuentes primarias y secundarias, en la actualidad, gracias al creciente avance tecnológico, los documentos o fuentes documentales pueden ubicarse en tres grandes clases: impresas, audiovisuales y electrónicas (APA, 2010). Esto implica que, frecuentemente cuando se lleva a cabo una investigación de tipo documental su nivel ubica al investigador en una situación que le permite describir situaciones y eventos, esto es, decir cómo es y se manifiesta determinado fenómeno. De allí que, los estudios descriptivos buscan especificar las propiedades importantes de personas, grupos, comunidades o cualquier otro fenómeno que sea sometido a análisis. Pallela y Martins (2006) señalan en cuanto al nivel descriptivo que:

“El propósito de este nivel es el de interpretar realidades de hecho. Incluye descripción, registro, análisis en una interpretación de la naturaleza actual, composición o procesos de los fenómenos. El nivel descriptivo hace énfasis sobre conclusiones dominantes o sobre cómo una persona, grupo o cosa se conduce o funciona en el presente” (p. 102).

Lo anterior, quiere decir que estudios descriptivos miden de manera independiente los conceptos o variables con los que tienen que ver. Aunque, desde luego, pueden

integrar las mediciones de cada una de dichas variables para decir cómo es y como se manifiesta el fenómeno de interés, su objetivo no es indicar cómo se relacionan las variables medidas.

Diseño de investigación

El diseño de investigación hace explícitos los aspectos operativos de la misma. El mismo se define con base al procedimiento, que se debe determinar mediante la estrategia que se implementan para recolectar la información. De acuerdo a lo anterior, la presente investigación es de campo, porque la información fue tomada directamente de las fuentes bibliográficas. Arias (2012) define la investigación de campo de la siguiente manera:

“La investigación de campo es aquella que consiste en la recolección de datos directamente de los sujetos investigados, o de la realidad donde ocurren los hechos (datos primarios), sin manipular o controlar variable alguna, es decir, el investigador obtiene la información pero no altera las condiciones existentes. De allí su carácter de investigación no experimental”.
(p.31)

Claro está, en una investigación de campo también se emplean datos secundarios, sobre todo los provenientes de fuentes bibliográficas, a partir de los cuales se elabora el marco teórico. No obstante, son los datos primarios obtenidos a través del diseño de campo, los esenciales para el logro de los objetivos y la solución del problema planteado.

Población y muestra

Según Arias (2006) la población se define como “un conjunto finito o infinito de elementos con características comunes para los cuales serán extensivas las conclusiones de la investigación. Esta queda delimitada por el problema y por los objetivos del estudio” (p. 81). En este sentido, la unidad de análisis está representada por la información que se recaba en las fuentes primarias y secundarias. Para ello, se considera como población las secuencias diana idóneas para el diagnóstico sensible y

especifico de *A. marginale* por medio de la técnica de PCR, mientras que la muestra está representada por el gen *msp1α*.

Unidad de Investigación

La población es el conjunto de elementos de los que se quiere conocer o investigar algunas de sus características. La muestra es un subconjunto representativo de un universo o población (Arias, 2006). La unidad de investigación estará representada por los cebadores específicos dirigidos a la región diana idónea para el diagnóstico molecular de *A. marginale*.

Selección del Tamaño Muestral

La muestra es un subgrupo de la población (Hernández, *et al.*, 2005). Al respecto, la muestra dependerá de los cebadores disponibles en la revisión bibliográfica, para el gen *msp1α* con mayor especificidad para la amplificación región diana idónea para el diagnóstico molecular por PCR.

Sistema de Variables

En el desarrollo del trabajo investigativo, el científico indaga sobre ciertas propiedades que se modifican a las que se les denomina variables; en este sentido, una variable es una característica o cualidad, magnitud o cantidad que puede sufrir cambios y que es objeto de análisis, medición, manipulación o control en una investigación. Según su función las variables se clasifican en: independientes, dependientes e intervinientes (Arias, 2006).

De acuerdo a lo descrito, la variable independiente de la investigación corresponde a la secuencia diana más idónea para el diagnóstico específico de *A. marginale*, ya que es la que genera y explica los cambios en la variable dependiente. Por su parte, la variable dependiente de la investigación está representada por los cebadores dirigidos a la amplificación de la secuencia diana en la mayoría de cepas de *A. marginale*.

Procedimiento de la investigación

Búsqueda en las bases de datos

Se realizaron 20 búsquedas entre el 2019 y diciembre de 2021, con los términos de búsqueda o descriptores en minúsculas y entre paréntesis, y los operadores lógicos o booleanos en mayúsculas. Consultando bases de datos científicas disponibles en línea como Pubmed, Science direct y Researchgate. Pubmed es un recurso libre y gratuito con más de 34 millones de citas y resúmenes especializados de la literatura biomédica; se compone por MEDLINE, principal base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica NCBI, perteneciente a la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos (NLM, *National Library of Medicine*, por sus siglas en inglés).

Por su parte, Scencedirect es una base de datos que ofrece textos completos de la editorial Elsevier, además los perfiles de investigadores con repositorio de publicaciones en Researchgate que es una red social de investigación gratuita, creada en 2008 por dos médicos y un informático alemanes, y con sede en Berlín y Boston. Su idioma oficial es el inglés, y está dirigida a toda la comunidad científica e investigadora, de todo el mundo y de todas las materias.

Las palabras claves ingresadas en cada base de datos y la red social Researchgate, debían estar en inglés y fueron: *A. marginale*, *genety diversity*, *family multigene*, *bovine hemoparasite*, *detection* y *PCR*. Se realizaron combinaciones del termino *A. marginale* con cada uno de los otros descriptores de búsqueda y el operador Boleano (AND), permitiendo obtener artículos de investigación cuyo título incluyeran estos descriptores. La búsqueda se realizó empleando la terminología médica en los encabezados (Mesh) que indexa artículos con encabezamientos de material médico de la NLM. En la red social Researchgate, se realizó la búsqueda desde el perfil "No soy un investigador", donde las personas que no tienen un correo como investigador

formal de una institución pueden buscar contenido científico. En la base de datos Sciece direct, se realizó primeramente una búsqueda con las palabras claves y también se realizó una búsqueda de los autores que fueron citados en otras bibliografías y cuya cita bibliográfica indicaba que fueron publicados en la revista científica Elservier.

Criterios de inclusión.

Los criterios de inclusión de los artículos a ser analizados fueron:

- Artículos que incluyeran el género de interés *Anaplasma* sp
- De diagnóstico, prevalencia e identificación molecular
- Estudios de comparación de técnicas diagnósticas.
- Que involucraran regiones del genoma de *A. marginale*
- Con técnicas de PCR que no incluyeran muchos procedimientos
- En regiones de campo y experimental dirigidos a eritrocitos de ganado vacuno y vectores de transmisión
 - Acceso al texto completo o que tuvieran el DOI (código de búsqueda del artículo)
 - Artículos con antigüedad que involucraran regiones dianas para el diagnóstico de *A. marginale*
 - De diferentes regiones geográficas

Criterios de exclusión.

Se excluyeron los artículos que presentaron los siguientes criterios:

- Resúmenes o textos incompletos
- Artículos duplicados
- Artículos que incluyeran otros hemopatógenos diferentes a los que infectan al ganado vacuno.
 - Artículos que incluyeran hemopatógenos en ganado vacuno menos *Anaplasma* sp

- Métodos de diagnóstico que no incluyeran PCR
- Estudios que no representaran prevalencia global de Asia o África, si no se dirigían a países únicos como Pakistán, India, Tailandia,
- Estudios dirigidos a garrapatas que fueran de un género distinto a *Boophilus* sp o *Dermacentor* sp

Selección de los artículos.

El proceso de selección de los artículos se hizo por medio de criterios y filtros metodológicos; mientras que, el cribado de los mismos se hizo de acuerdo al siguiente orden:

- Lectura del título con la estrategia de búsqueda seleccionada.
- Lectura del *abstract*, para acceder al resumen de la información contenida en el artículo.
- Análisis del texto completo, que necesariamente debía incluir información relevante sobre el diagnóstico de *A. marginale*.

Debido a la extensa cantidad de artículos disponibles relacionados con el diagnóstico, diversidad genética y PCR de *A. marginale*, la selección de los artículos de investigación se realizó desde la fecha más antigua, comenzando con estudios desde el año 1990, que involucraran en sus títulos técnicas de PCR simple dirigidas a la detección de *A. marginale*, y títulos que incluyeran una región diana específica. De esta manera, se fueron descargando y citando autores que diseñaban cebadores nuevos para el diagnóstico por medio de PCR, y artículos que incluyeran las regiones dianas más empleada para detección por PCR.

Análisis de los cebadores

Una vez seleccionada la secuencia idónea para la identificación de *A. marginale*, y los cebadores usados en la bibliografía para amplificar dicha secuencia, los cebadores se analizaron usando herramienta Blast, en su aplicación de *Primer-Blast*. Este algoritmo permite hacer una búsqueda del alineamiento local de los cebadores, tanto

sentido y antisentido o *forward* y *reverse*, con secuencias disponibles en la base de datos del GenBank, definiendo los siguientes parámetros:

- Verificación de la especificidad: Con esta opción activada, el programa busca los primers contra la base de datos seleccionada y determina si un par de primers puede generar un producto de PCR en cualquier secuencia de la base de datos basándose en sus coincidencias con las secuencias y sus orientaciones. El programa devuelve, si es posible, sólo los pares de imprimaciones que no generen un producto PCR válido en secuencias no deseadas y que, por lo tanto, sean específicos para la plantilla prevista. Es necesario considerar que la especificidad se comprueba no sólo para el par de cebadores de avance/retroceso, sino también para los pares de cebadores de retroceso/retroceso. (Ye, *et al.*, 2012).
- Base de datos: se escogió la base de datos *nr* que contiene secuencias redundantes que no se encuentran en la base de datos RefSeq o en otras bases de datos, abarca información de todos los organismos que contengan al menos unas secuencias en Genbank (no está curada) (Ye *et al.*, 2012).
- Organismos: se especificó el organismo que contiene el templado objetivo, para delimitar la comprobación de la especificidad y hacerla más rápida, debido a que buscar en todos los organismos es irrelevante.
- Parámetros de comprobación de la especificidad del par de cebadores: los parámetros de comprobación de especificidad se dejaron de manera estándar, como vienen programados en el portal.
- Presentación y resultados: los resultados mostrados contenían información detallada de los cebadores, tamaño del producto de PCR o amplicón, temperatura de templado, proporción de CG, acceso a la cepa usada como templado, descripción de la secuencia blanco, alineaciones detalladas entre los cebadores y los blancos. Para estas alineaciones se aceptaron las tres posibles:
 - **Resultados con alta especificidad**: la alineación óptima se representa con puntos. Entre la secuencia diana y el cebador.

- **Resultado con especificidad media:** la inespecificidad de las bases se observa con la posición de letra correcta, con estos resultados se puede hacer una nueva propuesta, según la base nitrogenada que más varía en las secuencias del número de acceso de un marcador conservado, donde el algoritmo usado por *primer-Blast* utiliza una esperanza estadística lo más cercano a 0 dando como resultados específicos en los cambios de bases que no coinciden, lo que permite que a partir de estos resultados se puedan hacer cambios para mejorar los resultados (Ye *et al.*, 2012).
- **Resultado negativo para la amplificación:** no hay templado para la amplificación con estos cebadores, en ningunas de las secuencias encontradas en la base de datos *nr*. Estos cebadores se procederán a descartar para su uso en el diagnóstico.

El resultado de esto indicó cual es la especificidad de estos cebadores *in silico* y cual es la región del genoma a la que se unen, lo que corresponde con marcadores moleculares para los que fueron diseñados. Una vez determinada la especificidad de estos cebadores, se procedió a descartar los que hayan tenido poca identidad. Para los cebadores que presenten una mediana o alta especificidad se pueden hacer las modificaciones pertinentes para mejorar su especificidad, y de esta forma mejorar su uso en el diagnóstico de estos hemoparásitos en campo, por lo tanto se debe buscar el nucleótido que no tenga correspondencia y que sea común en varias cepas, a partir de esto se realiza la propuesta para aumentar la especificidad, el diseño de cebadores mejorado se realizara usando el módulo de diseño de *Primer-BLAST*.

PCR in silico

La continuidad de la evaluación *in silico* de manera completa se llevó a cabo a través de la simulación computacional de la técnica de PCR, a través del programa bioinformático Sequence Manipulation Suite, el cual es una colección de programas de JavaScript para generar, formatear y analizar secuencias cortas de ADN y proteínas. Es comúnmente utilizado por biólogos moleculares, para la enseñanza y para pruebas de programas y algoritmos. Se utilizaron dos programas de Sequence Manipulation Suite para la realización de la PCR, los cuales fueron:

1. Estadísticas de cebadores de PCR (en inglés, *PCR primers stats*): el cual acepta una lista de secuencias de cebadores de PCR, y devuelve un informe que describe las propiedades de cada cebador, incluida la temperatura de fusión, el porcentaje de contenido de GC y la idoneidad de la PCR. Se utilizó PCR Primer Stats para evaluar los posibles cebadores de PCR, anexando la secuencia del par de cebadores, sin procesar en formato FASTA (>) en el área de texto. El límite de entrada es de 5.000.000 de caracteres. La longitud máxima de cebador aceptada es de 50 pb (Stothard, 2000).

2. Productos de PCR (en inglés *PCR products*): que acepta una o más plantillas de secuencias de ADN, y dos secuencias de cebadores. El programa busca sitios de reconocimiento de cebadores que coincidan perfectamente y que puedan generar un producto de PCR. Todos los productos resultantes se ordenan por tamaño, y se les da un título que especifica su longitud, posición en la secuencia original y los cebadores que los produjeron. Puede usar moléculas lineales o circulares como plantilla. Se utilizaron los productos de PCR para determinar los tamaños de productos que se pueden esperar cuando se realiza la PCR en el laboratorio (Stothard, 2000). Se ingresaron en el área de texto las secuencias de los templados de genes completos para el gen *msp1 α* , y de genomas completos de *A. marginale* descargadas en formato FASTA desde la base de datos. El límite de entrada en el área de texto es de

200.000.000 caracteres. Los números de acceso de los templados descargados fueron los siguientes (CP001079.1, AY253141.1, AY010247.1, CP000030.1, M32869.1, CP023730.1, FJ195757.1, KY888159.1, VTSO01000001.1, CP023731.1). En los siguientes cuadros de texto se introdujeron el nombre del cebador, seguido de su secuencia en la dirección de 5' a 3'. Los sitios degenerados se pueden representar usando caracteres de ADN IUPAC (Stothard, 2000).

Diseño del Análisis

Acercas del diseño de análisis los autores manifiestan que existen tres tipos de enfoques: cualitativos, cuantitativos y mixtos. El enfoque cuantitativo muestra características que se encargan de medir un fenómeno considerándolo como un proceso secuencial permitiendo el control de ciertos fenómenos; el enfoque cualitativo generalmente se conduce a ambientes más naturales que por medio de un proceso analiza múltiples realidades subjetivas con grandes profundidades de significado y por último el enfoque mixto que es una combinación de ambos enfoques (Hernández, Fernández y Baptista, 2014).

Considerando lo antes expuesto esta investigación presenta un enfoque cualitativo debido a las técnicas de análisis, como lo son el análisis de los cebadores usados en la bibliografía, posterior análisis de la especificidad de los mismo de manera *in silico*, se ocupan de relacionar, interpretar y buscar significado a la información expresada en códigos verbales e iconos. De manera que los autores buscan categorizar la información en la bibliografía de los marcadores moleculares utilizados en el diagnóstico, precisando la importancia de su especificidad, la forma de mejorar su especificidad en un lenguaje comprensivo.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Selección de la secuencia diana idónea para el diagnóstico molecular por PCR de *A. marginale*

La búsqueda de artículos relacionados con el análisis *in silico* para la detección y diagnóstico molecular de *A. marginale* se realizó en 3 bases de datos de importancia mundial. A continuación, se presentarán los resultados obtenidos de cada una de las búsquedas.

En la primera base de datos, los resultados de la búsqueda en PubMed se resumen en la Tablas 2. La base de datos Pubmed fue la que ofreció una mayor cantidad de resultados, empleando la combinación de dos de los descriptores mencionados y el operador booleano (AND), ya que al emplear tres descriptores las condiciones de restricción en la búsqueda eran mayores y no generaban resultados. Se observa en la Tabla 2, que de 298 artículos reportados con las diferentes combinaciones de los descriptores de búsqueda y el operador booleano AND, solo fueron validados 27 artículos relacionados con el diagnóstico por medio de PCR de *Anaplasma marginale*, de diferentes orígenes geográficos y usando diferentes secuencias diana.

La siguiente base de datos de búsqueda fue Researchgate, en el perfil “No soy un investigador”, donde las personas que no trabajan en ciencia pueden buscar contenido

científico, con más de 135 millones de páginas de publicación, más de 20 millones de investigadores y más de 1 millón de preguntas, aquí es donde todos pueden acceder a la ciencia. Los resultados de la búsqueda en Researchgate se presentan en la Tabla 3, en la que se puede observar la validación de 5 artículos que correspondían a los descriptores de búsqueda. Es importante destacar que empleando las palabras clave detección, *A. marginale* y PCR, se encontró un artículo de investigación realizado en Mérida – Venezuela, al cual se accedió por medio de Google.

Tabla 2. Resultados de la búsqueda en la base de datos PubMed.

Cajón de búsqueda	(<i>Anaplasma marginale</i>) AND (family multigene) (<i>Anaplasma marginale</i>) AND (genetic diversity) (<i>Anaplasma marginale</i>) AND (molecular diagnosis) (<i>Anaplasma marginale</i>) AND (detection) AND (PCR)
Filtros	Rango de cualquier fecha de publicación, bovinos, títulos con terminología médica (MeshTerms) Rango de 2010 – 2023 de fecha de publicación, bovinos, títulos con terminología médica (MeshTerms)
Artículos obtenidos	298
Criterios de exclusión	Número de artículos excluidos
Título no relacionado con el término de búsqueda	190
Lectura de abstract	161
Lectura del artículo completo	206
Duplicado	12
Artículos validados	27

Tabla 3. Resultados de la búsqueda en la base de datos Researchgate.

Cajón de búsqueda	Detección (and) <i>Anaplasma marginale</i> (and) pcr
Filtros	Desde el perfil no soy un investigador, no se pueden ingresar filtros a la búsqueda
Artículos obtenidos	100
Criterios de exclusión	Número de artículos excluidos
Título no relacionado con el término de búsqueda	35
Lectura de abstract	50
Lectura del artículo completo	50
Duplicado	6
Artículos validados	5

La última base de datos utilizada fue ScienceDirect, la que combina publicaciones científicas, técnicas y de salud autorizadas y de texto completo con una funcionalidad inteligente e intuitiva para que los usuarios puedan mantenerse informados en sus campos y puedan trabajar de manera más efectiva y eficiente. Con revistas, libros y contenido de referencia de alta calidad, la plataforma ScienceDirect admite de manera única un flujo de trabajo ininterrumpido, esto se debe a la gran capacidad de filtros que presenta, desde los tipos de estudios (Review, artículos de investigación, comunicaciones cortas, libros, resumen de conferencias, entre otros), el nombre de la revista (Veterinary, Parasitology, ticks and ticks borne diseases, entre otras), el año, el área (agricultura y biología, inmunología y microbiología), y el tipo de acceso. En la tabla 4 se indican los resultados de la búsqueda en ScienceDirect. A pesar de obtenerse 70 resultados con los descriptores de búsqueda establecidos, solo dos de los artículos pudieron ser incluidos para el análisis

Tabla 4. Resultados de la búsqueda en la base de datos ScienceDirect.

Cajón de búsqueda	<i>Anaplasma marginale</i> AND diagnosis for PCR.
Filtros	Revistas: Veterinary Parasitology y Ticks and Tick-borne Diseases
Artículos obtenidos	70
Criterios de exclusión	Número de artículos excluidos
Título no relacionado con el término de búsqueda	57
Lectura de abstract	28
Lectura del artículo completo	29
Duplicado	2
Artículos validados	2

De las búsquedas realizadas en las bases de datos, se encontraron cuatro secuencias diana que se han utilizado para el diagnóstico molecular por medio de PCR de *A. marginale*, siendo éstas el gen *ADNr16S*, que codifica para ARN ribosomal 16S, y los genes de la super familia *msp*, específicamente *msp5*, *msp4*, *msp1β* y *msp1α*. En las Tablas 5-9 se especifican los artículos de investigación seleccionados, organizados para cada una de las secuencias diana, encontrando 3 artículos para el gen *ADNr16S*, 5 para el gen *msp5*, 4 para el gen *msp4*, 7 para el gen *msp1β* y 11 para el gen *msp1α*.

**Tabla 5. Resultados de los estudios encontrados en las bases de datos para el gen
*ADNr 16S***

Título	Autor y año
Pubmed	
PCR-diagnóstico de <i>Anaplasma marginale</i> en poblaciones bovinas del Ecuador y su identificación molecular mediante secuenciación de fragmentos ribosomales 16S	Tana <i>et al.</i> (2017)
Desarrollo de un nuevo ensayo basado en PCR para detectar <i>Anaplasmataceae</i> y el primer reporte de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> y <i>Anaplasma platys</i> en bovinos de Argelia	Mustapha <i>et al.</i> (2015)
Comparison of Microscopy and PCR-RFLP for detection of <i>Anaplasma marginale</i> in carrier cattle	Noaman <i>et al.</i> (2010)

www.bdigital.ula.ve

Tabla 6. Resultados de los estudios encontrados en las bases de datos para el gen *msp1β*.

Título	
PubMed	Autor y año
<i>The msp1 Multigene Family of Anaplasma marginale: Nucleotide Sequence Analysis of an Expressed Copy</i>	Barbet <i>et al.</i> (1991)
Detection of <i>Anaplasma marginale</i> (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Hemolymph of <i>Dermacentor Andersoni</i> (Acari: Ixodidae) with the Polymerase Chain Reaction	Stich <i>et al.</i> (1991)
Molecular characterization of <i>Anaplasma marginale</i> based on the <i>msp1a</i> and <i>msp1b</i> genes	Witchuta <i>et al.</i> (2021)
Duplex Real-Time Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Detection and Quantification of <i>Anaplasma Marginale</i> and <i>Anaplasma Centrale</i>	Decaro <i>et al.</i> (2008)
ScienceDirect	
Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of <i>Babesia bigemina</i> , <i>Babesia bovis</i> and <i>Anaplasma marginale</i> DNA in bovine blood	Figuroa <i>et al.</i> (1993)
ResearchGate	
Detection of Bovine Hemoparasite Infection Using Multiplex Polymerase Chain Reaction	Sukhumsirichart <i>et al.</i> (1999)

Tabla 7. Resultados de los estudios encontrados en las bases de datos para el gen *msp5*.

Título	
PubMed	Autor y año
PCR-diagnóstico de <i>Anaplasma marginale</i> en poblaciones bovinas del Ecuador y su identificación molecular mediante secuenciación de fragmentos ribosomales 16S	Tana <i>et al.</i> (2017)
Detección de ganado naturalmente infectado con <i>Anaplasma marginale</i> en una región de endemicidad por PCR anidada y una competencia Ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas utilizando Proteína de superficie principal recombinante 5	Torioni <i>et al.</i> (1998)
Validation of a multiplex PCR assay to detect <i>Babesia</i> spp. and <i>Anaplasma marginale</i> in cattle in Uruguay in the absence of a gold standard test	Parodi <i>et al.</i> (2020) Emplean los primers de Torioni <i>et al.</i> (1998)
Molecular detection of <i>Anaplasma marginale</i> infection in carrier cattle	Sing <i>et al.</i> (2012) Emplean los primers de Torioni <i>et al.</i> (1998)
ResearchGate	
Epidemiología y diversidad genética de <i>Anaplasma marginale</i> en Zamora Chinchipé, Ecuador	Ramiro <i>et al.</i> (2021) Emplean los primers de Torioni <i>et al.</i> (1998)

Tabla 8. Resultados de los estudios encontrados en las bases de datos para el gen *msp4*.

Título	
PubMed	
Diversidad genética y filogenia molecular de Aislados de <i>Anaplasma marginale</i> de Minas Gerais, Brasil	de la Fuente <i>et al.</i> (2004)
Prevalencia y Diversidad Genética de <i>Anaplasma marginale</i> Cepas en el ganado bovino en Sudáfrica	de la Fuente <i>et al.</i> (2006)
A PCR for Differentiate between <i>Anaplasma marginale</i> and <i>A. centrale</i>	Selxas <i>et al.</i> (2015)
ScienceDirect	
Development and validation of two PCR tests for the detection of and differentiation between <i>Anaplasma ovis</i> and <i>Anaplasma marginale</i>	Torina <i>et al.</i> (2012)

www.bdigital.ula.ve

Tabla 9. Resultados de los estudios encontrados en las bases de datos para el gen *msp1a*.

Título	
PubMed	Autor y año
Diversidad genética y filogenia molecular de Aislados de <i>Anaplasma marginale</i> de Minas Gerais, Brasil	Fuente <i>et al.</i> (2004)
Prevalencia y Diversidad Genética de <i>Anaplasma marginale</i> Cepas en el ganado bovino en Sudáfrica	Fuente <i>et al.</i> (2006) Emplea los cebadores de Fuente (2004)
Análisis de cepas mundiales de <i>Anaplasma marginale</i> utilizando secuencias repetidas de proteína de superficie principal 1a	Fuente <i>et al.</i> (2007)
A <i>msp1a</i> polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of <i>Anaplasma marginale</i> isolates	Lew <i>et al.</i> (2002)
Composición de cepas de <i>Ehrlichia Anaplasma marginale</i> dentro del ganado persistentemente infectado, un reservorio de mamíferos para transmisión de garrapatas	Palmer <i>et al.</i> (2001)
Anaplasmosis bovina y patógenos transmitidos por garrapatas en bovinos de las Islas Galápagos (Santa cruz, San Cristóbal e Isabela)	Gioia <i>et al.</i> (2018)
Genetic diversity of major surface protein 1a of <i>Anaplasma marginale</i> in dairy cattle	Aktas <i>et al.</i> (2020)
Caracterización molecular de <i>Anaplasma marginale</i> basada en los genes <i>msp1a</i> y <i>msp1b</i>	Witchuta <i>et al.</i> (2021)
Detection of genetic diversity of <i>Anaplasma marginale</i> isolates in Minas Gerais, Brazil	Pohl <i>et al.</i> (2013)
Real-time PCR assay with an endogenous internal amplification control for detection and quantification of <i>Anaplasma marginale</i> in bovine blood	Kovalchuk <i>et al.</i> (2019)
ResearchGate	
Epidemiología y diversidad genética de <i>Anaplasma marginale</i> en Zamora Chinchipé, Ecuador	Ramiro <i>et al.</i> (2021) Emplean los cebadore de Lew (2002)

Posteriormente, los artículos encontrados para cada una de las secuencias diana para el diagnóstico molecular por PCR de *A. marginale* fueron analizados a profundidad en cuanto a la especificidad para *A. marginale*, y la capacidad de amplificación del mismo en otras especies de *Anaplasma*.

Análisis de los cebadores diseñados para el gen msp1 α de A. marginale

Una vez establecido que el gen *msp1 α* es que resulta más específico para el diagnóstico molecular de *A. marginale* por medio de PCR, se procedió a realizar el análisis de los cebadores utilizados en la bibliografía para tal fin por medio de la herramienta Primer BLAST del NCBI. Se encontraron un total de 5 pares de cebadores que amplifican específicamente el gen *msp1 α* de *A. marginale*, y los análisis de Primer Blast de cada uno se presentan en las Tablas 10-14.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 10. Análisis por medio de Primer Blast de los cebadores de Palmer *et al.* (2001)

Cebadores	F: 5'-ATTTCATATACTGTGCAG-3' R: 5'-CTTGGAGCGCATCTCTCTTGCC-3'			
Especificidad	No tiene			Auto complementariedad
Inespecificidad	<i>Ehrlichia, Wolbachia, A. platys</i>			F: 4.00 R: 4.00
N° de cepas: 3	Amplicon (pb) Aprox. 2800	Tm (°C) F: 49.75 R: 63.04	%CG F: 36.84 R: 57.14	3' F: 4.00 R: 1.00
Regiones	Panamá, Japón			

Tabla 11. Análisis por medio de Primer Blast de los cebadores de Lew *et al.* (2002)

Cebadores	1733F:5'-TGTGCTTATGGCAGACATTTCC-3' 2957R:5'-AAACCTTGTAGCCCCAACTTATCC-3'			
Especificidad	<i>Anaplasma marginale</i>			Auto complementariedad
Inespecificidad	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>			F: 5.00 R: 4.00
Nº de cepas: 3	Amplicon (pb) Aprox. 800	Tm (°C) F:59.25 R:60.81	%CG F: 45.45 R: 45.83	3' F: 2.00 R: 0.00
Regiones	Australia, Israel, Argentina, Zimbabwe, South África, Uruguay, Israel, Kenya, USA, Brasil, India, México, Egipto, Cuba, Florida)			

Tabla 12. Análisis por medio de Primer Blast de los cebadores reportados por de La Fuente *et al.* (2007).

Cebadores	MSP1aP 5'-GCATTACAACGCAACGCTTGAG-3' MSP1a3 5'-GCTTTACGCCGCCGCTGCGCC-3'			
Especificidad	<i>Anaplasma marginale</i>			Auto complementariedad
Inespecificidad	Con ninguna especie			F:4.00 R: 6.00
Nº de cepas: 10	Amplicon (pb) Aprox. 2600	Tm (°C) F: 61.53 R: 73.78	%CG F: 50.00 R: 77.27	3' F: 4.00 R; 5.00
Regiones	Brasil, Washington, Sout Idaho. Florida, Oklahoma, St Maries			

Tabla 13. Análisis por medio de Primer Blast de los cebadores de Kovalchuk *et al.* (2019).

Cebadores	<i>m脾1α</i> -F: 5'-TGTTTGGAACCTAGGCTTATAG-3' <i>m脾1α</i> -R: 5'-CTTCTGCTGATCTTCCTGTCTC-3'				
Especificidad	<i>Anaplasma marginale</i>			Auto complementariedad	
Inespecificidad	Con ninguna especie			F: 2.00	3'
N° de cepas:	Amplicon (pb)	Tm (°C)	%CG	R: 0.00	F: 2.00
58	207	F: 55.25 R: 58.22	F: 40.91 R: 50.00		R: 0.00
Regiones	Florida, Washington, St Maries, Dakota, Rassmusen, Oklahoma, Israel, Brasil, América del Norte, Canadá, Israelí, Habana, Taiwán Florida, Gypsy, Colombia, Tailandia				

www.bdigital.ula.ve

Tabla 14. Análisis por medio de Primer Blast de los cebadores de Witchuta *et al.* (2021).

Cebadores	AMF: 5'-CACCGGGTACGCCACCTATCTCGC-3' AMR: 5'-AACAAGCTGTGTAGTAGTGTCCGAAGG-3'				
Especificidad	<i>Anaplasma marginale</i>			Auto complementariedad	
Inespecificidad	En tres nucleótidos			F: 5.00	3'
N° de cepas:	Amplicón (pb)	Tm (°C)	%CG	R: 6.00	F: 2.00
56	630	F: 68.84 R: 64.61	F: 66.67 R: 48.15		R: 1.00
Regiones	Australia, Florida, Israelí, Habana, Canadá, Oklahoma, Israel, Colombia, Brasil, Rassmusen, Saint Maries, Washington, Tailandia, Taiwán,				

Los cebadores diseñados por Palmer *et al.* (2001) no reportaron ningún alineamiento con *A. marginale*, a pesar de que los autores reportan que fueron diseñados para esta especie, sin embargo, el análisis de Primer Blast arrojó alineamiento con *Ehrlichia*, *Wolbachia*, y *A. platys*; la diferencia entre las temperaturas de alineamiento de los cebadores es de 14°C, y la diferencia del %GC es de 21% (Tabla 10). En el caso de los cebadores diseñados por Lew *et al.* (2002), utilizados en diversos estudios en la literatura, presentaron inespecificidad con *A. phagocytophilum*, siendo similares las temperaturas de alineamiento y los %GC (Tabla 11). En la Tabla 12 se presenta el análisis de los cebadores diseñados por de La Fuente *et al.* (2007), resultaron específicos para *A. marginale*, sin embargo, las diferencias en temperatura de alineamiento y %GC son superiores a 10 unidades. Los cebadores de Kovalchuk *et al.* (2019) resultaron específicos para *A. marginale*, sin alineamiento con otra especie de *Anaplasma*, y las temperaturas de alineamiento y %GC difieren en menos de la unidad (Tabla 13). Por último, los cebadores diseñados por Witchuta *et al.* (2021) alinearon exclusivamente con *A. marginale*, presentando alineamientos inespecíficos con los 3 primeros nucleótidos de ambos primers, las temperaturas de alineamiento son superiores a 60°C, y la diferencia en el %GC es superior a 20 unidades (Tabla 14). Tomando en cuenta lo anterior, son los cebadores diseñados por Kovalchuk *et al.* (2019) los que podrían ser usados en el diagnóstico molecular por medio de PCR de *A. marginale*, lo que se comprobará por medio del análisis de PCR *in silico* de los cebadores.

PCR in silico.

Los resultados de la PCR *in silico* con los cebadores encontrados para la amplificación del gen *msp1 α* de *A. marginale* se presentan en las Tablas 15-19, PCR realizada con cada par de cebadores usando como templado secuencias completas del gen *msp1 α* de *A. marginale* de diferentes orígenes geográficos, así como, secuencias parciales del mismo gen de aislados venezolanos, de los cuales no existen secuencias completas en las bases de datos; además, se añadieron secuencias completas del gen

msp1α de *A. centrale* y *A. phagocytophylum* como controles negativos. En la Tabla 15 se observan los resultados obtenidos para los cebadores diseñados por Kovalchuck *et al.* (2019), los que de acuerdo al análisis por Primer Blast se adaptaban de mejor manera a los criterios de diseño de primers (Tabla 13). Se observa que estos primers aprueban los criterios de diseño, salvo el autoalineamiento del cebador Forward; además dan como resultado un amplicón de 207 pb usando como templado secuencias del gen *msp1α* originarias de Canadá, EE. UU., Brasil y México, pero no con el mismo gen en *A. centrale* y *A. phagocytophylum*, ni con secuencias parciales del gen *msp1α* de *A. marginale* reportadas para Venezuela. Es negativa la PCR con secuencias de *A. centrale* (CP001759.1) y *A. phagocytophylum* (NZ_CP046639.1).

www.bdigital.ula.ve

Tabla 15. Resultados de la PCR *in silico* con los cebadores diseñados por Kovalchuck *et al.* (2019).

Cebadores	<i>m</i> sp1 α -F: 5'TGTTTGG AACCTAGGCTTATAG3' <i>m</i> sp1 α -R: 5'CTTCTGCTGATCTTCCTGTCTC-3
Pruebas de idoneidad PCR (Pasa/Advertencia)	
Longitud	Pasa
Porcentaje GC	Pasa
horquilla para GC	Pasa
Tm (vecino más cercano)	Pasa
Abrazadera GC:	Pasa
Auto-recocido	Advertencia: Hay más de 3 bases de auto-recocido seguidas; en el cebador Forward TGTTTGG AACCTAGGCTTATAG GATATTCGGATCCAAGGTTTGT
Templado <i>Proteína mayor de superficie msp1α</i>	Producto de PCR 207 pb
AY253141.1 Canadá	product from linear, base 1529 to base 1735
AY010247.1 Oklahoma	product from linear, base 1522 to base 1728
M32869.1 Washington AmW86	product from linear, base 1616 to base 1822
CP001079.1 str. Florida genoma completo	product from linear base 484038 to base 484244
FJ195757.1 TWN6 Taiwan	product from linear template base 1699 to base 1905
AY010247.1 Oklahoma	product from linear template, base 1522 to base 1728
CP023731.1 Brasil chromosome	product from linear base 481610 to base 481816
VTSO01000001.1 México	product from linear base 34627 to base 34833
M32869.1 Washington AmW86	product from linear , base 1616 to base 1822
No se obtuvieron productos de PCR para CP001079.1 str. Florida, secuencias parciales de Barinas (JF957795.1, Táchira (JF957794.1) y Lara (JF957793.1, JF957792.1, JF957787.1 y JF957791.1). Tampoco con <i>A. centrale</i> (CP001759.1), ni <i>A. phagocytophylum</i> (NZ_CP046639.1).	

En la Tabla 16 se reportan los resultados de la PCR *in silico* con los cebadores diseñados por Lew *et al.* (2002), observándose que la mayor advertencia es que la temperatura de alineamiento es superior a 58°C, y que el tamaño de los productos de PCR es diferente para cada templado utilizado; no se produce amplicón con las secuencias de Brasil (CP023730.1 y CP023731.1), Taiwan (FJ195757.1), México (VTSO01000001.1), ni las secuencias parciales de Barinas, Táchira y Lara, *A. centrale* (CP001759.1), y *A. phagocytophylum* (NZ_CP046639.1).

Tabla 16. Resultados de la PCR *in silico* de los cebadores diseñados por Lew *et al.* (2002).

Cebadores	1733F:5´TGTGCTTATGGCAGAéATTTCC3´ 2957R:5´AAACCTTG TAGCCCCAACTTATCC3´
Pruebas de idoneidad PCR (Pasa/Advertencia):	
Longitud	Pasa
Porcentaje GC	Pasa
horquilla para GC	Pasa
Tm (vecino más cercano)	Advertencia: Tm es superior a 58
Abrazadera GC:	Pasa
Auto-reconocimiento	Pasa
Templado <i>Proteína mayor de superficie msp1α</i>	Productos de PCR
AY253141.1 Canadá	822 base 22 to base 843 (1733F - 2957R).
AY010247.1 Oklahoma	793 pb, base 44 to base 836 (1733F - 2957R).
M32869.1 Washington	880 bp, base 51 to base 930 (1733F - 2957R)
CP001079.1. Florida, complete genome	1225 bp product from linear template base 1 to base 1225 (1733F - 2957R).
CP001079.1 Florida	>1225 bp base 483352 (1733F - 2957R).
CP000030.1 St. Maries	793 bp product from linear, base 1 to base 793
No se obtuvieron productos de PCR para Brasil (CP023730.1 y CP023731.1), Taiwan (FJ195757.1), México (VTSO01000001.1), secuencias parciales de Barinas (JF957795.1), Táchira (JF957794.1) y Lara (JF957793.1, JF957792.1, JF957787.1 y JF957791.1), <i>A. centrale</i> (CP001759.1), y <i>A. phagocytophylum</i> (NZ_CP046639.1).	

El análisis de PCR *in silico* de los cebadores de Palmer *et al.* (2001) se reporta en la Tabla 17. El análisis advierte sobre la temperatura de alineamiento superior a 58°C,

y el % GC inferior a 40%. Es interesante destacar que no se encontraron productos de PCR con ninguno de los templados encontrados en la base de datos.

Tabla 17. Resultados de la PCR *in silico* de los cebadores diseñados por Palmer *et al.* (2001).

Cebadores	F: 5'ATTTCATATACTGTGCAG3' R: 5'CTTGGAGCGCATCTCTCTTGCC3'
Pruebas de idoneidad PCR (Pasa / Advertencia):	
Longitud	Pasa
Porcentaje GC	Advertencia: %GC es inferior a 40
horquilla para GC	Pasa
Tm (vecino más cercano)	Advertencia: Tm es superior a 58
Abrazadera GC:	Pasa
Auto-recocido:	Pasa
Templado <i>Proteína mayor de superficie msp1α</i>	Productos de PCR
No se obtuvieron productos de PCR secuencias de Canadá (AY253141.1), EE. UU. (AY010247.1, M32869.1, CP001079.1, y CP000030.1), Brasil (CP023730.1, CP023731.1 y CP023730.1), Taiwán (CP023731.1), México (VTSO01000001.1), secuencias parciales de Barinas (JF957795.1, Táchira (JF957794.1) y Lara (JF957793.1, JF957792.1, JF957787.1 y JF957791.1), <i>A. centrale</i> (CP001759.1), y <i>A. phagocytophylum</i> (NZ_CP046639.1).	

En el caso de los cebadores diseñados por de La Fuente *et al.* (2007) el reporte de la PCR *in silico* expone que los cebadores tienen como inconvenientes un % GC superior a 60% y una temperatura de alineamiento superior a 58°C. En cuanto a los amplicones producidos, son de tamaño variable, superiores a 2000 pb; No se obtuvieron productos de PCR para secuencias de Canadá (AY253141.1), EE. UU.

(AY010247.1, CP000030.1 y CP001079.1), Brasil (CP023730.1), Taiwán (FJ195757.1), secuencias parciales de Barinas (JF957795.1, Táchira (JF957794.1) y Lara (JF957793.1, JF957792.1, JF957787.1 y JF957791.1), *A. centrale* (CP001759.1), ni *A. phagocytophylum* (NZ_CP046639.1) (Tabla 18).

Por último, se realizó PCR *in silico* con los cebadores diseñados por Witchuta *et al.* (2021), advirtiéndose que la temperatura de alineamiento es superior a 58°C, % GC superior a 60%, y que se encuentran más de 3 G o C en las últimas 5 bases, lo que promueve la formación de horquillas. Nuevamente, este par de cebadores no produce amplicones con ninguna de las secuencias usadas en el análisis (Tabla 19).

www.bdigital.ula.ve

Tabla 18. Resultados de la PCR *in silico* de los cebadores diseñados por de La Fuente *et al.* (2001).

Cebadores	MSP1aP 5'GCATTACAACGCAACGCTTGAG3' MSP1a3 5'GCTTTACGCCGCCGCCTGCGCC3'
Pruebas de idoneidad PCR (Pasa / Advertencia):	
Longitud	Pasa
Porcentaje GC	Advertencia: %GC es superior a 60
Horquilla para GC	Hay más de 3 G o C en las últimas 5 bases
Tm (vecino más cercano)	Advertencia: Tm es superior a 58
Abrazadera GC:	Pasa
Auto-recocido:	Pasa
Templado <i>Proteína mayor de superficie</i> <i>msp1α</i>	Productos de PCR
M32869.1 Washington AmW86	2244 bp, base 8 to base 2251 (MSP1aP - MSP1a3).
CP001079.1 str. Florida, complete genome	>2589 bp, base 482085 to base 484673 (MSP1aP - MSP1a3).
CP023731.1 Jaboticabal chromosome	>2543 bp, base 479703 to base 482245 (MSP1aP - MSP1a3).
VTSO01000001.1 Mexico	>2232 bp base 34198 to base 36429 (MSP1a3 - MSP1aP).
No se obtuvieron productos de PCR para secuencias de Canadá (AY253141.1), EE. UU. (AY010247.1, CP000030.1 y CP001079.1), Brasil (CP023730.1), Taiwán (FJ195757.1), secuencias parciales de Barinas (JF957795.1, Táchira (JF957794.1) y Lara (JF957793.1, JF957792.1, JF957787.1 y JF957791.1), <i>A. centrale</i> (CP001759.1), y <i>A. phagocytophylum</i> (NZ_CP046639.1).	

De acuerdo a los datos reportados en el análisis de PCR *in silico*, se confirma que los cebadores diseñados por Kovalchuck *et al.* (2021) resultan ser los más idóneos para la identificación y diagnóstico de *A. marginale*, con alta especificidad, sin reacciones cruzadas con otras especies de *Anaplasma*. Estos cebadores pueden ser ideales para la amplificación del gen *msp1α* de cepas venezolanas, para cuyo análisis es necesario contar con CDS (del inglés *coding sequence*) completos.

Tabla 19. Resultados de la PCR *in silico* de los cebadores diseñados por de Witchuta *et al.* (2021).

Cebadores	AMF: 5' CACCGGGTACGCCACCTATCTCGC3' AMR: 5' AACAAAGCTGTGTAGTAGTGTCCGAAGG3'
Pruebas de idoneidad PCR (Pasa / Advertencia):	
Longitud	Pasa
Porcentaje GC	Advertencia: %GC es superior a 60
Horquilla para GC	Hay más de 3 G o C en las últimas 5 bases
Tm (vecino más cercano)	Advertencia: Tm es superior a 58 en ambos cebadores
Abrazadera GC	Pasa
Auto-reconocimiento	Pasa
Templado <i>Proteína mayor de superficie msp1a</i>	Productos de PCR
No se obtuvieron productos de PCR secuencias de Canadá (AY253141.1), EE. UU. (AY010247.1, M32869.1, CP001079.1, y CP000030.1), Brasil (CP023730.1, CP023731.1 y CP023730.1), Taiwán (CP023731.1), México (VTSO01000001.1), ni secuencias parciales de Barinas (JF957795.1, Táchira (JF957794.1) y Lara (JF957793.1, JF957792.1, JF957787.1 y JF957791.1).	

Discusión

Secuencias diana para el diagnóstico de *A. marginale* por medio de PCR

Para el análisis de las secuencias diana usadas en la literatura para la identificación y diagnóstico de *A. marginale*, se realizó una búsqueda en las bases de Pubmed, Sciencedirect y Researchgate, usando los descriptores lógicos en minúsculas y los operadores booleanos en mayúsculas (Tablas 2-4). Las búsquedas realizadas permitieron identificar 4 secuencias diana utilizadas para el diagnóstico molecular por medio de PCR de *A. marginale*: *ADNr16S*, y los genes de la superfamilia *msp*, específicamente *msp5*, *msp4*, *msp1 β* y *msp1 α* . En esta sección se hará una descripción de los principales hallazgos encontrados en la literatura con respecto a los análisis por medio de PCR de cada secuencia, estableciendo las razones por las que el gen *msp1 α* resulta ser la secuencia ideal para el diagnóstico molecular de *A. marginale*.

PCR del gen *ADNr16S*

El genoma de *A. marginale* es pequeño, circular y de doble cadena, cuenta con 1.197.687 pb, con un porcentaje de G-C del 49%, inusual para bacterias intracelulares (Brayton *et al.*, 2005), y posee una amplia cantidad de genes que codifican para antígenos de superficie, los cuales presentan alta variabilidad. Todas estas características limitan la selección de una región diana específica para la especie que permita su identificación diferencial (Sala *et al.*, 2013).

El genoma de *A. marginale* posee 949 secuencias codificantes (CDS, coding sequence), 13 de las cuales codifican para 62 proteínas de membrana externa OMP (del inglés *outer membrane proteins*) (Brayton *et al.*, 2005) organizadas en dos súper familias de genes *msp* (*msp* del inglés, *Major Surface Proteins*): la súper familia de genes *msp2*, que contiene 56 miembros incluyendo *msp2*, *msp3*, *msp4* y 16

pseudogenes; y la súper familia *msp1 α* , que contiene nueve miembros incluyendo *msp1 β* (Kocan *et al*, 2010; Bello *et al*, 2014; Brayton *et al*, 2005). Las proteínas principales de la superficie (MSPs) son las proteínas dominantes, codificadas por 6 genes denominados *msp1 α* , *msp1 β* , *msp2*, *msp3*, *msp4* y *msp5*, pertenecientes a las súper familias *msp1* y *msp2* (Soto *et al*, 2004; Amaro *et al*, 2021).

Las OMP se agrupan de acuerdo a su localización en la membrana, unas se encuentran en menor proporción en el proteoma de *A. marginale*, y se encuentran cubiertas por las proteínas dominantes de superficie para que no sean reconocidas por el sistema inmune del hospedero en un nuevo ciclo de la anaplasmosis. Estas proteínas son proteínas del sistema de secreción tipo IV, que incluyen proteínas asociadas a la membrana VirB9 (AM1315), VirB10 (AM1314), VirB1, y el factor de elongación EF-Tu (AM254); proteínas de membrana interna como Ana29 (AM 076), Ana43, Ana37, Ana32, y Ana17; y proteínas asociadas al apéndice del *Anaplasma* (AM878, AM879, AM880, PepAcitosol aminopeptidasa AM956).

Un estudio reciente que permitió una extensión del genoma de *A. marginale* descubrió nuevas proteínas antigénicas, de las cuales 14 están anotadas en el genoma de *A. marginale*, que son las anteriormente mencionadas. Las otras 7 proteínas están anotadas en el genoma de la rickettsia como producto no definido, e incluyen las proteínas AM072, AM127, AM197, AM366, AM387, AM529, y AM854. A las proteínas de función conocida distintas a la MSP2, MSP3 y MSP5, al igual que a las proteínas de función no definida, se les realizó una búsqueda (BLASTp) en la base de datos de proteínas para determinar su identidad con microorganismos relacionados. Seis proteínas de función desconocida (AM072, AM197, AM366, AM387, AM854 y AM127) y 11 proteínas de función conocida (AM075, AM097, AM254, AM878, AM879, AM956, AM1096, AM1142, AM1164, AM1314 y AM1315) arrojaron un resultado significativo en el BLAST, relacionándolas con proteínas putativas en *A. centrale*, *A. ovis*, *A. phagocytophilum* o *Ehrlichia canis* (Ferreira y Martines, 2017).

La mayoría de las investigaciones sobre caracterización, diagnóstico y vacunación sobre *A. marginale* se han realizado con las proteínas MSPs, por su importancia en la

variación antigénica, diversidad genética, interacción con el hospedero vertebrado e invertebrado, y por su relación con la generación de una infección persistente en el hospedador vertebrado (De la Fuente *et al.*, 2006; Cabezas *et al.*, 2015). La variación antigénica que presentan las cepas de eritrocitos bovinos infectados se debe a que *msp1 β* , *msp2* y *msp3* están representados por una familia de múltiples genes que se han expuesto a una evolución más rápida, ejercida por la presión selectiva del sistema inmune del hospedador en la interacción huésped/patógeno, resultando en variabilidad antigénica en la infección persistente del ganado, de manera que los nuevos epítopes codificados y presentados por estos genes no serán reconocidos por la respuesta inmune en el hospedador en el siguiente ciclo de la anaplasmosis, y por ende el hospedador no podrá eliminar la bacteria de su organismo (Bello *et al.*, 2014). Mientras que los otros tres genes *msp* están representados por un único gen (*msp1 α* , *msp4* y *msp5*) que parecen no sufrir variaciones antigénicas ni en el ganado ni en la garrapata, por lo que son considerados genes más estables, a pesar de la diversidad geográfica con respecto a secuencia y tamaño en diferentes cepas de *A. marginale* (Bello *et al.*, 2014). El descubrimiento de estas MSP entre estos organismos, incluye MSP específicos de especie y altamente conservados en todo el género (Kocan *et al.*, 2015).

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, se han seleccionado para este estudio dos regiones dianas, las MSP y el ARNr16S, que se han usado para el diagnóstico de *A. marginale*. En este sentido, en el año 2001 se realizó la nueva reclasificación del género *Anaplasma* spp a partir del análisis genético del gen *ADNr16S* (Dumler *et al.*, 2001). En esta sección se realizará una síntesis de las referencias documentales más significativas sobre las diferentes técnicas diagnósticas basadas en PCR usadas para el estudio de la anaplasmosis aguda en el ganado, con el objetivo de aportar conocimientos y sustento teórico para el análisis *in silico* de cebadores para el diagnóstico por PCR convencional de *A. marginale*.

El *ADNr16S* es considerado un cronómetro molecular, es decir, una macromolécula común a todos los seres vivos, que cambia con el tiempo, presentando

alteraciones al azar y que aumentan de manera lineal, razón por la cual ha sido la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana desde que fue propuesta por Carl Woese (Universidad de Illinois) a principios de la década de 1970. La comparación de las secuencias del *ADNr16S* permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas, hecho que ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias (Rodicio y Mendoza, 2004).

El ARNr16S tiene aproximadamente 1500 nucleótidos de longitud, y es codificado por el gen *ADNr16S*, el cual forma parte de los 3 genes que conforman el operón ribosomal. Este operón varía de 1 a 15 copias por genoma bacteriano, y ese número de copias se mantiene constante entre especies, géneros, e incluso familias. Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el ARNr16S se pliega formando una estructura secundaria de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla y presentando en su estructura hélices comunes a todos los seres vivos, denominadas hélices universales, que se enumeran desde la 1 hasta la 48 en orden de aparición a partir del extremo 5', pero conteniendo además variaciones que se concentran en zonas específicas (Rodicio y Mendoza, 2004).

Las regiones variables del ARNr16S se designan con la letra "V" y van desde la V1 hasta la V9, sin embargo, son las regiones conservadas las que se utilizan en la mayoría de los casos para diseñar iniciadores universales que permitan la amplificación de estas regiones hipervariables en los ARNr16S de los microorganismos. Es importante indicar, que el análisis de la secuencia de los ARNr16S de distintos grupos filogenéticos reveló la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma; es decir, secuencias específicas cortas que aparecen en todos, o en la mayor parte, de los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca o sólo raramente están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, los oligonucleótidos

firma en el ARNr16S, pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo (Rodicio *et al.*, 2004).

Aunque existen cronómetros moleculares alternativos al *ADNr16S*, hasta el momento ninguno ha conseguido desplazarle. De hecho, esta macromolécula presenta una serie de características por las cuales fue considerado por Carl Woese (Universidad de Illinois) a principios de la década de 1970, como cronómetro molecular definitivo:

1. Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales, por lo que se constituye como una diana universal para su identificación.
2. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
3. Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas, junto con las variaciones en los ARNr18S, a lo largo de toda la escala evolutiva. Los ARNr16S contienen, sin embargo, suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos.
4. El tamaño relativamente largo de los ARNr16S minimiza las fluctuaciones estadísticas.
5. La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
6. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los *ADNr16S*, existen bases de datos amplias y en continuo crecimiento.

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias de los *ADNr16S* de dos bacterias el que indique su relación evolutiva. Además, el análisis comparativo de secuencias permite construir árboles filogenéticos que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados (Rodicio *et al.*, 2004). Hay que tener en cuenta, no

obstante, que es la comparación de genomas completos, y no la comparación de los *ADNr16S*, la que aporta una indicación exacta de las relaciones evolutivas. En su ausencia, la especie bacteriana se define, en taxonomía, como el conjunto de cepas que comparten una similitud del 70% o más, en experimentos de reasociación ADN-ADN. Stackebrandt y Goebel (1994) demostraron que cepas con este nivel de relación presentan típicamente una identidad del 97% o más entre sus genes *ADNr16S*. Así, es improbable que cepas con menos del 97% de identidad en las secuencias de sus *ADNr16S* lleguen a estar relacionadas a nivel de especie (Rodicio *et al.*, 2004).

La amplificación del gen *ADNr16S* ha sido muy valiosa para la detección de *Anaplasma* spp, ya que son bacterias patógenas intracelulares difíciles de aislar y crecer en el laboratorio. Además, el uso de esta técnica ha sido de gran ayuda en la identificación de *A. marginale*, ya que esta bacteria es lo suficientemente divergente para ser considerada como una especie distinta, aún sabiendo que la secuencia del gen *ADNr16S* de *A. marginale*, *A. ovis*, y *A. centrale*, a excepción de una cepa japonesa, son casi idénticas; y que las secuencias del *ADNr16S* de *A. marginale* y *A. centrale* difieren solo en dos posiciones dentro de la región hipervariable (V1), haciendo que el diseño de cebadores específicos de especie en esta región sea casi imposible (Zazueta *et al.*, 2015; Dumler *et al.*, 2001).

Un estudio basado en la secuenciación del gen del *ADNr16S* realizado por Hernández *et al.* (2017) titulado: Diagnóstico por PCR de *A. marginale* en poblaciones bovinas de Ecuador y su identificación molecular mediante la secuenciación de fragmentos ribosomales 16S, tuvo como objetivo investigar la presencia de *A. marginale* en ganado lechero de una comuna en Ecuador. Los autores llevaron a cabo dos PCR para amplificar regiones específicas de la rickettsia para su identificación molecular. En una primera PCR se amplificó el gen *msp5*, y de las muestras que fueron amplificadas se escogieron al azar dos muestras para confirmar la presencia de *A. marginale* mediante la amplificación, clonación y secuenciación del gen *ADNr16S* conservado en todas las especies de *Anaplasma* spp. Una vez

obtenidas las secuencias consenso de cada clon, se compararon, dando como resultado que las secuencias tenían 1383 pb, y al compararlas con la base de datos NCBI Blastn, tenían 100% de similitud con la cepa St Maries de *A. marginale* registrada en GenBank (número de acceso CP000030.1). Este estudio concluyó que la caracterización molecular basada en el análisis de las secuencias de *ADNr16S* permitió determinar que *A. marginale* está presente en Ecuador, esclareciendo la situación epidemiológica de este hemotrófico, pero también enfocando mejor su diagnóstico, tratamiento y control.

Otro estudio titulado: Comparación de microscopia y PCR-RFLP (polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción) para la detección de *A. marginale* en ganado bovino, realizado por Noaman *et al.* (2010), tuvo como objetivo comparar la detección de *A. marginale* en dos números diferentes de campos microscópicos (50 y 100) utilizando el método de tinción Giemsa convencional, en comparación con la técnica PCR-RFLP. Las técnicas de diagnóstico se realizaron en 150 muestras de sangre de bovinos en granjas de la provincia de Irán, en animales que no presentaban síntomas clínicos característicos de anaplasmosis bovina. Primeramente, se realizaron los exámenes microscópicos de sangre teñida con Giemsa, y posteriormente se realizó la PCR empleando los cebadores P1/P2 diseñados en este estudio a partir de la secuencia del *ADNr16S* de *A. marginale* (N° de acceso en el GenBank M60313). Para la determinación de la especificidad para *A. marginale* de los productos de PCR, se utilizó el método PCR-RFLP, en el que la endonucleasa de restricción Bst1107I realiza un corte en la posición 68 del producto de PCR (577 pb) correspondiente a *A. marginale*, mientras que al sitio de restricción está ausente en los productos de PCR de otras especies de *Anaplasma*. El grado de acuerdo entre PCR-RFLP y las dos pruebas microscópicas fue determinado por el índice Kappa y valores con intervalos de confianza del 95%. De las 150 muestras probadas, 58 muestras amplificaron el fragmento de 577 pb correspondiente al gen *ADNr16S*. En estas 58 muestras también se observó el fragmento de restricción de 509 pb esperado para *A. marginale*. Por otro lado, la microscopía de rutina mostró eritrocitos que albergaban estructuras similares

a *Anaplasma* sp en 16 y 75 muestras de sangre determinadas en 50 y 100 campos microscópicos, respectivamente. De las 75 muestras positivas en 100 campos microscópicos, 53 fueron positivas por PCR-RFLP, siendo así 22 falsos positivos por microscopia en 100 campos. El examen de 50 y 100 campos microscópicos mostró una sensibilidad del 25,8 y 91,4% y una especificidad del 99 y 76,1%, respectivamente, en comparación con el 100% sensibilidad y especificidad obtenida por PCR-RFLP. El coeficiente Kappa entre PCR-RFLP y Microscopía (50 campos) indicó un nivel aceptable de acuerdo (0,29). El coeficiente Kappa entre PCR-RFLP y Microscopía (100 campos) indicó un buen nivel de acuerdo (0,64).

A pesar de los resultados obtenidos en este estudio, los investigadores indicaron que el examen microscópico puede cumplir con los resultados deseados para el diagnóstico de anaplasmosis, pero para la detección de animales portadores con bacteriemias bajas, la microscopia de 100 campos es preferible a la microscopia de 50 campos. Sus resultados mostraron que los métodos moleculares como PCR-RFLP se pueden utilizar como un método seguro para identificación del ganado persistentemente infectado con *A. marginale*.

Si bien es cierto que la amplificación del gen *ADNr16S* puede ser de gran utilidad para la diferenciación del género *Anaplasma*, la fuerte similitud de la secuencia de este gen en *A. marginale*, *A. centrale* y *A. bovis*, no permiten el uso del método de PCR simple para la discriminación entre estas especies, proponiéndose el uso de otras técnicas asociadas a la técnica de PCR para hacer un diagnóstico preciso, lo cual dificulta y retarda el diagnóstico de *A. marginale* en el campo, así como la identificación del mismo en infecciones persistentes o asintomáticas de *A. marginale* (Noaman *et al*, 2010; Zazueta, 2015).

Es importante mencionar que Mustapha *et al.* (2015) utilizaron la técnica de qPCR (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) para llevar a cabo el cribado de muestras, en busca de la presencia de bacterias intracelulares obligatorias ya conocidas y potencialmente desconocidas de la familia Anaplasmataceae. Para ello probaron inicialmente varios genes para diseñar un conjunto específico de cebadores.

Entre los genes probados, los genes *rpoB* y *groEL* se consideraron muy diversos con pocos patrones comunes dentro de las diferentes especies de la familia Anaplasmataceae, aunque su filogenia puede presentar buenas relaciones evolutivas entre los miembros del linaje Eubacteria, pero para diferenciar entre especies se requiere de PCR anidada, incrementando la posibilidad de contaminación. Se determinó que el *ADNr16S* no era lo suficientemente diverso para discriminar entre especies estrechamente relacionadas como *A. bovis*, *A. marginale* y *A. centrale*, requiriendo de 1400 pb para un mayor nivel de divergencia. Además, concluyen que las técnicas moleculares que emplean los genes de las proteínas MSP fueron informados por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) con la incapacidad de discriminar entre algunas especies de *Anaplasmas* sp, y los laboratorios que ejecutan el ensayo de PCR de MSPs deben reconocer los problemas de conservación de MSPs entre todas las especies y los asociados con la incapacidad de discriminar entre algunos *Anaplasma* sp.

Estos estudios permiten descartar el uso del análisis de las secuencias del gen *ADNr16S* para realizar la determinación diferencial específica de *A. marginale*, en principio por el tamaño de su amplicón, pero también por requerirse técnicas más costosas para determinar la especie, que se llevan a cabo con mayor dificultad, que requieren de una interpretación más compleja de los resultados, que requieren mayor cantidad de ADN, y con mayor riesgo de contaminación.

Genes que codifican para las proteínas MSP.

Otro grupo de genes por medio de los cuales podría realizarse la identificación específica de *A. marginale* serían los genes que codifican para las proteínas MSP. En este sentido, el gen *msp1β* está conformado por una familia multigénica, compuesta al menos por cuatro copias, del cual dos genes son de longitud completa *msp1β1* y *msp1β2*, y tres genes parciales (*msp1β1pg*, *msp1β2pg* y *msp1β3pg*), que recomponen la diversidad genética y antigénica del gen (Amaya *et al*, 2021; Rodríguez *et al*, 2003). *msp1β* presenta dominios de secuencia repetida, al igual que *msp1α*, aunque

son de menor extensión (Corona *et al.*, 2004). Por medio de ensayos de RFLP, se demostró que, para *Anaplasma spp.*, esta familia de genes es polimórfica entre aislados de diferentes regiones geográficas, entre cepas y entre la misma población. Hay coexpresión de al menos dos copias diferentes del gen *msp1β* en la fase aguda de la anaplasmosis, y la expresión de sus proteínas MSP1β tiene la función de presentar epítopes variables (Corona *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2003) y de actuar como adhesinas, en contraste con MSP1α, la que parece tener afinidad exclusivamente por el eritrocito (Rodríguez *et al.*, 2003).

Barbet *et al.* (1991) realizaron un estudio que permitió el inicio a nuevas propuestas para vacunas recombinantes, sondas SstI y técnicas diagnósticas basadas en el gen *msp1β* de *A. marginale*. En este estudio se amplía la perspectiva del uso del gen *msp1β*, al secuenciarlo, hacer una copia expresada del gen y compararlo con diferentes aislados, usando enzimas de restricción y análisis de hibridación. Los plásmidos contenían el fragmento de 3.9 kb del gen *msp1β* y las enzimas de restricción permitieron conocer el fragmento para la traducción de 3.9 kb, esta identificación permitió identificar que este gen en varias cepas fueron: diferentes en un mismo aislado de Florida y con un considerable polimorfismo de longitud entre estas copias, es decir, la secuencia de 2,5 Kb que contiene la mayor parte de la secuencia codificante del gen *msp1β* se encontró en un aislado de Florida pero no en uno de Texas, y se observaron otras dos formas del gen en 5 aislamientos. Este estudio organizó estas secuencias, y se sugiere que a partir de ahí se pueden seleccionar enzimas de restricción que produzcan un fragmento definido de ORF en el plásmido empleado, que permita la expresión del polipéptido recombinante de un peso molecular de 100.000 Da y sea utilizado como sonda.

El análisis de las proteínas se realizó por inmunoprecipitación o inmunotransferencia con suero anti MSP1β, en el análisis de las proteínas dio como resultado que el sitio de inicio para la transcripción comenzaba dentro del sitio SstI y estaba seguido de una región no traducida, logrando determinar que el gen presenta polimorfismo de secuencia, dada la expresión de algunos plásmidos y no de otros; y

debido a la presencia en unos aislados del fragmento de 2,5 kb y en otros no. Además, el análisis con enzimas de restricción no cortaba en secuencias homólogas para este gen. En comparación con secuencias previas del gen *mpl α* , el mismo demostró tener secuencias de repeticiones menos extensas que este último. A pesar del polimorfismo presentado en esta secuencia, se encontraron secuencias idénticas de algunos aislados, no se ha establecido si todas las copias de secuencia de repetición para este gen son codificantes o presentan pseudogenes, por lo que los autores concluyen que, para el diseño de vacunas recombinantes, sondas SstI y técnicas de PCR se deben identificar las regiones conservadas y realizar diferentes pruebas de comprobación.

En el estudio de Stich *et al.* (1991), titulado: Detección de *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) en la hemolinfa de *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) con PCR, se desarrolló una PCR simple con éxito, usando la región diana secuenciada por Barbet (1991) para el diagnóstico de *A. marginale* en la hemolinfa de garrapatas vivas de *D. andersoni* Stiles. La hemolinfa se obtuvo de patas cortadas de garrapatas macho y hembra expuestas a *A. marginale* en sus estadios de ninfas y de adultos, se recogieron y agruparon muestras de hemolinfa de garrapatas adultas que fueron expuestas al estadio de ninfas en los días 0-10 de alimentación de un ternero susceptible. Para las garrapatas macho y hembra expuestas al estadio adulto, las muestras se recogieron mientras las garrapatas se alimentaban por 7 días de un ternero infectado, y durante una segunda alimentación de 10 días (o hasta la repleción) cuando ya transmitieron el parásito, con 9 días de separación entre alimentaciones. Se recogieron muestras de hemolinfa de garrapatas no infectadas en los mismos momentos para que sirvieran de control negativo. El ADN de *A. marginale* se amplificó con los cebadores BAP-2 (5'-GTATGGCACG TAGTCTTGGATCA-3') y AL34S (5'-CAGCAGCAGCAAGACCTTCA-3'), que codifican un fragmento de 409 pb del gen *mpl β* de *A. marginale* aislado de Florida. La hemolinfa de las garrapatas infectadas fue positiva a la PCR para *A. marginale* en todas las muestras recogidas, incluidos los

adultos no alimentados e infectados como ninfas, para garrapatas adultas que se alimentaron de terneros infectados durante sólo 1 día por transmisión de garrapatas, demostrando ser un método sensible para la identificación de garrapatas infectadas.

Los cebadores utilizados en este ensayo también resultaron específicos, ya que se probaron con especies de 18 géneros diferentes, y universales para 7 aislados (Florida, Virginia, Oklahoma, Illinois, Washington, Idaho, y Texas) de *A. marginale*, aunque en este estudio solo se probó de manera experimental en garrapatas infectadas con aislados de *A. marginale* de los Estados Unidos y no en estudios de campo para el diagnóstico de la enfermedad.

Otro estudio realizado por Sukhumsirichart *et al.* (1999) tuvo como objetivo emplear 5 pares de cebadores en una PCR multiplex para el diagnóstico de 5 hemopatógenos en bovinos. Para *A. marginale*, los cebadores empleados son denominados *Am*, la manera en la que previamente era denominado el producto del gen *msp1β* (Barbet *et al.*, 1991), estos cebadores derivaron de la secuencia de un gen que codifica para una proteína de superficie (no especificada en este estudio), generando un amplicón de 160 pb. Los cebadores se usaron para analizar 35 muestras de sangre bovina de terneros esplectonizados e infectados experimentalmente con diferentes aislados de glóbulos rojos infectados con *A. marginale*, además de aislados de Tailandia. Como resultado de la PCR multiplex, 6 muestras dieron positivas para *A. marginale*, las demás fueron positivas para otros hemopatógenos y negativas para *A. marginale*. Esta PCR multiplex fue altamente sensible, con la capacidad de detectar la presencia 1 a 10 pg de ADN del parásito. Los cebadores utilizados en esta PCR multiplex también mostraron una amplificación altamente específica de cada ADN de parásito respectivo, sin la presencia de productos de PCR no específicos y no objetivo. Los resultados se compararon con la detección de hemoparásitos mediante un examen con microscopio óptico después de la tinción con Giemsa de frotis de sangre de película delgada.

Una comparación de los dos métodos de detección reveló que el 86% de las muestras mostró diagnósticos concordantes con ambas técnicas, concluyendo que la

técnica es rápida, reproducible y tiene una alta especificidad y sensibilidad. Por lo tanto, es adecuada para encuesta epidemiológica y diagnóstico simultáneo de infección hemoparasitaria en sangre bovina.

Figuroa *et al.* (1993) en su estudio: Ensayo basado en la reacción en cadena de la polimerasa multiplex para la detección de ADN de *Babesia bigemina*, *B. bovis* y *A. marginale* en sangre bovina. Los investigadores utilizaron los cebadores para *A. marginale* diseñados por Aboytes-Torres *et al.* (1992) que amplifican un fragmento de 200 pb de una proteína de superficie de *A. marginale* denominada Am105L (manera en la que era denominado el gen *msp1* originalmente, Corona *et al.* (2004)), presente en 12 aislados de *A. marginale* geográficamente diferentes. Se emplearon 20 µl de muestras que fueron diluidas 10 veces, El ADN pStCroix purificado (Aboytes-Torres, 1992) sirvieron como plantillas para la síntesis de la sonda a través de PCR usando Aml 1/12 (*A. marginale*) como cebadores, este procedimiento consistió en reemplazar el dTTP en aproximadamente un 35% con digoxigenina-11- dUTP. Usando cebadores anidados del Grupo II, los tamaños predichos de fragmentos de ADN amplificados fueron 160 pb para las sondas de ADN de *A. marginale*, aumentando la sensibilidad de la técnica. Los resultados en este estudio, tanto en gel de agarosa como en hibridación por transferencia Southern Blot, demostraron que al usar los cebadores del grupo I se amplificaron los fragmentos específicos para cada especie. La técnica fue aplicada a nivel experimental para el diagnóstico de 20 muestras obtenidas de un ternero de EE.UU. infectado, con una parasitemia del 0,3%. Esta muestra fue ajustada y combinada con eritrocitos infectados con otros hemopatógenos, obteniendo un 0,1% de eritrocitos infectados.

El índice de detección de la sonda específica para *A. marginale* fue de 0,0001% en una muestra de sangre con infección mixta. Además, se realizó el diagnóstico en 4 novillos Jersey inoculados experimentalmente con *A. marginale* y *B. bigemina*, 2 años y un 1 años antes de realizar este estudio, dando como resultados que dos de las cuatro muestras mostraron una señal de hibridación cuando se usó la sonda específica

de *A. marginale*. En conclusión, un fragmento de ADN amplificado por PCR e hibridado con una sonda podría detectar un mínimo de aproximadamente 32 eritrocitos infectados con *Babesia* o 320 eritrocitos infectados con *A. marginale* que están contenidos en 20 μ l de células empaquetadas. Aun así, llevar este estudio a nivel de campo en bovinos portadores requiere de una mayor investigación debido a que se requiere sondas de hibridación para *msp1 β* que permitan la confirmación de la especificidad y mejoren la visibilidad de las bandas amplificadas (Figueroa *et al.*, 1993). Los cebadores dirigidos a esta región deben ser confirmados y analizar muy bien una sección estrictamente conservada en el gen. Además, un estudio realizado por Lew *et al.* (2002) indica que *msp1 β* tiene múltiples copias, es conservado, pero detecta tanto *A. marginale* y *A. centrale*, y no diferencia entre ellos.

Decaro *et al.* (2008) emplea una técnica de PCR dúplex en tiempo real para la cuantificación y detección simultánea de *A. marginale* y para *A. centrale*, indicando que los genes empleados como diana para los cebadores y las sondas taqman, fueron el gen *msp1 β* para *A. marginale* y el gen groEL para *A. centrale*. Como resultado de las señales de fluorescencia (6-carboxifluoresceína [FAM] o Texas Red) generadas durante las amplificaciones, cada sonda con doble marcaje reconoció su objetivo específico. La fluorescencia FAM fue generada exclusivamente por muestras de sangre que contenían *A. marginale*, mientras que las señales de Texas Red fueron detectadas solo por muestras positivas de *A. centrale*. Ningún control de plantilla, muestras de sangre negativas y otros hemoparásitos de rumiantes produjeron ninguna señal de fluorescencia detectable, lo que confirmó que el ensayo era altamente específico para la detección y discriminación entre *A. marginale* y *A. centrale*.

El gen *msp2* está formado por una familia multigénica que presenta 52 variables del gen y 16 pseudogenes funcionales, esto le permite codificarse de diferentes formas. Las regiones con alto polimorfismo de aminoácidos expresan proteínas con epítopes diferentes para células B del sistema inmune, permitiendo variación antigénica y protección en cada ciclo de la anaplasmosis, por lo que en animales que se han curado puede surgir una nueva variante de anaplasmosis que no va a ser

reconocida por los anticuerpos de la primera infección. Se han demostrado diferentes variables antigénicas de este gen, además *A. marginale* y *A. centrale* presentan un repertorio similar de epítopes MSP2 que tiene peso molecular de 36 KDa, y se ha detectado una proteína homóloga en *A. phagocytophila* (Corona *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2003; Bello *et al.*, 2014; Palmer *et al.*, 2005).

El gen *msp3* también se conforma de una familia multigénica, que presentan copias distribuidas en el cromosoma con regiones conservadas y variables dentro del marco de lectura abierto. Su proteína es expresada por un simple locus en la cual la variación de los genes se da por recombinación utilizando pseudogenes. Codifica para un antígeno de superficie inmunodominante de 86 KDa con variabilidad antigénica que se encuentra también en *A. centrale* y *A. ovis*. Es estructural y antigénicamente diferente entre cepas de *A. marginale*. (Corona *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2003; Bello *et al.*, 2014; Palmer *et al.*, 2005)

Estos genes codificantes de proteínas principales de superficie para *A. marginale* formado por múltiples genes son también conservados en todas las especies del género, por lo que no cumplen el objetivo de determinar un gen específico de especie, que permita un diagnóstico específico de especie.

El gen *msp5* está representado en el genoma como una simple copia, altamente conservada entre las cepas de *A. marginale* estudiadas. La presencia del gen en todas las especies de *Anaplasma*, incluyendo *A. ovis*, sugiere que este gen es esencial en el ciclo de vida del parásito, lo que avala el uso del mismo para el desarrollo de procedimientos de diagnóstico molecular (Visser *et al.*, 1992). El gen *msp5* codifica a la proteína MSP5 de 19 KDa, que se ubica en la superficie de la rickettsia (Rodríguez *et al.*, 2003), es conservada en todas las cepas conocidas de *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis* (Eleizalde *et al.*, 2007), es de poca complejidad estructural y muy importante en el ciclo de vida celular, aunque se desconoce exactamente su función. Se ha reconocido su homólogo en todas las especies de *Anaplasma*, estructuralmente se presenta en forma multimérica unida por puentes disulfuro que le ayudan a mantener su conformación terciaria, necesaria para su reconocimiento por anticuerpos

de bovinos expuestos a la rickettsia, también se expresa en la forma de vida presente en garrapatas infectadas, por lo que sirve para diagnóstico en bovinos y vectores (Visser *et al.*, 1992; Knowles *et al.*, 1996). Dada su amplia presencia en todos los aislados hasta ahora estudiados, se ha usado con éxito en ensayos diagnósticos en diferentes partes del mundo (Soto, 2010).

Los estudios de este gen se han centrado principalmente en técnicas ELISA, así lo evidencia el trabajo realizado por Hernandez *et al.* (2017), donde conjuntamente con la amplificación del gen *ADNr16S*, evaluaron la presencia de *A. marginale* en bovinos de Ecuador. Para ello se amplificó un fragmento de 605 pb correspondiente al gen *msp5*. Posteriormente, esta PCR fue estandarizada y probada en animales de una región endémica, donde los vectores están presentes, para lo que se recolectaron muestras de sangre de 151 bovinos pertenecientes a 15 hatos de Ecuador. El cebador y la técnica de PCR utilizados fueron descritos anteriormente por Bello *et al.* (1998) y Marques *et al.* (2006), respectivamente. En este estudio se obtuvo que en 130 muestras se identificó el gen específico *msp5* de *A. marginale*, lo que significa que el 86,1 % de los bovinos estaban infectados por la rickettsia. Los autores concluyen que la técnica de PCR estandarizada para el gen *msp5* de *A. marginale* permitió realizar el primer reporte sobre la prevalencia e identificación molecular de este parásito en bovinos de Ecuador.

Un estudio realizado por Torioni *et al.* (1998) indica que la proteína de superficie principal 5 (MSP5) es una proteína de superficie de 19 kDa altamente conservada entre diferentes cepas de *A. marginale*, *A. ovis* y en *A. centrale*. El ensayo competitivo de inmunoabsorción ligado a enzimas que utiliza proteína de superficie principal recombinante 5 (rMSP5-cELISA) de *Anaplasma marginale* es una técnica en la que no se había medido, la verdadera sensibilidad con un número estadísticamente significativo de animales que se sabe que son positivos, y tampoco la sensibilidad para ellos este estudio, validó un (rMSP5-cELISA) de *Anaplasma marginale* en un rebaño de ganado infectado naturalmente en un área del este de Oregón donde *A. marginale* es endémica. Para probar esta hipótesis se requirió la

determinación del verdadero estado de infección del ganado dentro de un área donde *A. marginale* es endémica. Para este propósito, optimizaron una PCR anidada (nPCR), junto con el análisis de secuencias y la hibridación, para identificar el ADN de *A. marginale msp 5* en sangre. Cada uno de los 235 bovinos de un rebaño infectado naturalmente con *A. marginale* se identificó como infectado o no con *A. marginale* mediante el uso de la nPCR, y los sueros recolectados en el mismo momento se analizaron en busca de anticuerpos mediante el uso de rMSP5-cELISA .

La nPCR y la hibridación identificaron 151 bovinos infectados y 84 no infectados entre los 235 animales analizados. Con un punto de corte del 28%, el rMSP5-cELISA mostró una sensibilidad del 96% y una especificidad del 95%. El juicio sobre la fiabilidad de la nPCR y la hibridación para la detección de infecciones persistentes se basó en tres observaciones. Primero, la nPCR pudo detectar tan solo 30 eritrocitos infectados por ml. En segundo lugar, la nPCR pudo detectar consistentemente niveles bajos de rickettsemia en siete bovinos portadores experimentalmente infectados con *A. marginale*. En tercer lugar, el análisis de la secuencia de *msp5* mostró una identidad superior al 95 % entre 30 amplicones de nPCR de ganado infectado naturalmente con cepas de campo de *A. marginale*. Otros estudios han empleado estos cebadores como lo son: Parodi *et al.* (2020), Sing *et al.* (2012), Ramiro *et al.* (2021).

Otros estudios basados en el diagnóstico específico de especie refieren al gen *msp5*. Por ejemplo, el trabajo de Lew *et al.* (2002) indica que los métodos de detección por PCR son sensibles y amplifican el gen *msp5* que es conservado en todas las especies de *Anaplasma spp*, y se basa en una hibridación simple, además que los métodos ELISAc basados en este gen detectan *A. centrále* y no *A. marginale*.

Igualmente, Kocan (2015), señalan varios estudios con respecto al gen *msp5*, un estudio basado en un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas competitivo (cELISA) de la proteína de superficie MSP5 de *A. marginale* demostró tener una alta sensibilidad y especificidad, pero posteriormente se descubrió que reaccionaban con anticuerpos de otros organismos del género *Anaplasma*, esta reacción cruzada

evidencia que ELISAc para la proteína MSP5 es útil para el diagnóstico del género *Anaplasma* spp, más no para la especie, siendo necesario el uso de la PCR para el gen *msp5* para alcanzar el diagnóstico a nivel de especie (Kocan *et al.*, 2012).

El gen *msp4* se encuentra como una simple copia en el genoma de *A. marginale*. Un rasgo peculiar de este gen es que la secuencia en la región 3' contiene repeticiones imperfectas e invertidas que exhiben abundantes estructuras secundarias (Belkis Corona *et al.*, 2004). En el trabajo realizado por de la Fuente *et al.* (2002), los autores han demostrado que este gen proporciona información filogenética sobre la evolución de los aislamientos de *A. marginale* (Corona *et al.*, 2004). Este gen codifica para una proteína de 31 kDa denominada MSP4 (Soto 2010), altamente conservada entre los distintos aislamientos de *A. centrale* y *A. marginale*. Esta proteína contiene bloques de aminoácidos relacionados con la proteína MSP2. Sus epítopes conservados son de gran importancia tanto para el diagnóstico como para el desarrollo de una vacuna (Corona *et al.*, 2004; Soto 2010)

Los anticuerpos monoclonales reconocen el homólogo de esta proteína en aislados de diferentes regiones geográficas distantes, pero no se han detectado homólogos en otras rickettsias (*A. ovis*, *Ehrlichia ruminantium* etc.) y no todos los sueros de animales infectados con *A. marginale* reconocen con la misma intensidad a esta proteína, por lo que se considera que no es un candidato adecuado para la inmunización de animales contra la anaplasmosis. Se ha comprobado que funciona como adhesina al igual que la MSP2 y las subunidades del complejo MSP1, y que tanto la proteína nativa de MSP4 como la recombinante protegen a animales inmunizados en retos con cepas homólogas (Corona *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2003).

De la Fuente *et al.* (2004) utilizaron las secuencias de genes y proteínas de MSP1 α y MSP4, demostraron que las secuencias de *msp4*, pero no las secuencias de ADN o proteínas de MSP1 α , proporcionan información filogeográfica. Los autores llevaron a cabo un análisis de unión de secuencias vecinas del gen *msp4* de Brasil y aislamientos de *A. marginale* del Nuevo Mundo provenientes de Argentina, México y los EE.UU.,

dando un apoyo inicial para un estudio latino. Los resultados demostraron ser consistente con estudios previos en los que *msp4* proporcionó información filogeográfica sobre aislamientos de *A. marginale* a diferencia de MSP1 α , que no fue un marcador útil para la caracterización filogeográfica de aislamientos de *A. marginale*.

Aunque actualmente no se conoce la función específica de MSP4, el análisis realizado por este autor del gen *msp4* de aislamientos de *A. marginale* demostró una variación de su secuencia que respalda su uso en estudios filogeográficos. Se obtuvieron siete secuencias de *msp4* diferentes de 10 aislamientos de *A. marginale* de Minas Gerais, Brasil. Las sustituciones silenciosas de un solo nucleótido diferenciaron las secuencias de *msp4*, excepto por una mutación T \times G en la posición 656 del aislado de Brasil, que resultó en un cambio de aminoácido V \times G en la posición 219. Las relaciones filogenéticas entre aislamientos brasileños y del Nuevo Mundo de Argentina, México y EE. UU se infirieron utilizando secuencias de *msp4*. La alineación de las secuencias de ADN de *msp4* dio como resultado secuencias de 854 pb, de los cuales 170 pb eran variables. El análisis Bootstrap reveló un soporte de (78%) para un clado que contiene aislamientos de América latina (México, Argentina) incluyendo los de Brasil. Los resultados de este estudio demostraron heterogeneidad genética entre los aislamientos brasileños de *A. marginale* mediante el uso de secuencias MSP1a y MSP4, y sugieren que este hallazgo es común en áreas endémicas, independientemente de la garrapata vector predominante. Los resultados confirman que el uso de *msp4* proporciona información filogeográfica útil.

El estudio realizado de la Fuente *et al.* (2006) en África probó que la secuencia del gen *msp4* era idéntica para todas las cepas de *A. marginale* analizadas, las cuales provenían del noreste y sudoeste del Estado Libre (n=6), y también idéntica a la cepa sin cola de Israel (cepa de *A. marginale* que morfológicamente carecen de apéndice de inclusión, N° de acceso del GenBank AY786993); sin embargo, diferían en un nucleótido (G por A en la posición 607, con respecto a la adenina en el codón de

iniciación de la traducción ATG) de la secuencia previamente reportada de la cepa sudafricana SWA (AY666005). Estos resultados concuerdan con reportes previos en los cuales se afirma que la diversidad genética del gen *msp1 α* de *A. marginale* es mayor que la del gen *msp4*.

Gen msp1

El gen *msp1* codifica dos polipéptidos heterogéneos no relacionados, MSP1 α , que está codificada por el gen *msp1 α* , y MSP1 β codificado por al menos dos genes *msp1 β 1* y *msp1 β 2* (Rodríguez *et al.*, 2003). Estas dos subunidades MSP1 α y MSP1 β , están unidas por enlaces disulfuro, y no se relacionan entre sí. El complejo y las dos subunidades separadas, median la adherencia a los eritrocitos bovinos, es decir funcionan como adhesivas (Corona *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2003).

Ahora bien, *msp1 α* es un gen de copia única que está compuesto por una región conservada y una región que varía de acuerdo a un número de secuencias repetidas, cada una de las cuales tiene entre 86-89 pb (28 a 31 aminoácidos), ricas en serinas, ubicadas en el extremo amino terminal de la proteína, después de un decapeptido conservado; estas secuencias varían tanto en el número de repeticiones como en la secuencia, en lo que se refiere a las posiciones variables de aminoácidos (De la Fuente *et al.*, 2006; Cabezas *et al.*, 2013; Ramiro *et al.*, 2021).

El gen *msp1 α* codifica una proteína de 70 a 100 KDa, una de las moléculas mejor caracterizadas en *A. marginale*, involucradas en las interacciones huésped-patógeno (Ramiro *et al.*, 2021). Esta proteína es una adhesina que se une a los eritrocitos bovinos, extractos de células de las garrapatas, y las células intestinales de las garrapatas vectoriales (Kocan *et al.*, 2015). En cuanto a las secuencias repetidas o repeticiones en tándem, éstas contienen dominios funcionales que sirven como adhesinas para los eritrocitos bovinos y las células de las garrapatas (De la Fuente *et al.*, 2007; Cabezas *et al.*, 2013); y se expone extracelularmente para la interacción con los receptores de las células huésped, un requisito previo para la infección de las

células huésped (De la Fuente *et al.*, 2006). También se ha demostrado que MSP1 α participa en el desarrollo de la inmunidad bovina contra *A. marginale*, ya que MSP1 α contiene epítopes para las células T y B sensibles a la neutralización; asimismo, éstos anticuerpos opsonizan los organismos vivos de *A. marginale* para la fagocitosis de los macrófagos (Corona *et al.*, 2004; Cabezas *et al.*, 2013).

Estudios previos han determinado que MSP1 α se conserva durante la multiplicación en bovinos y garrapatas, que el número y las secuencias de las repeticiones en tándem de MSP1 α permanecen iguales en una cepa dada, y que el gen *mSP1 α* es genéticamente estable durante la infección aguda y persistente con una sola cepa (Lew *et al.*, 2002; Cabezas *et al.*, 2013; Ramiro *et al.*, 2021). Otro estudio determinó que MSP1 α , al igual MSP4 y MSP5, están codificadas por genes únicos que parecen no sufrir variaciones antigénicas en el ganado o en la garrapata, por lo que se consideran como genes más estables para estudios filogenéticos, siendo MSP1 α un marcador estable de identidad de cepa, utilizado para identificar cepas de *A. marginale* basándose principalmente en las repeticiones en tándem variables del extremo N-terminal (De la Fuente *et al.*, 2004; Cabezas *et al.*, 2013; Ramiro *et al.*, 2021). Además, es importante resaltar que se han identificado muchos aislamientos geográficos de *A. marginale* que difieren en biología, morfología, secuencias de proteínas y características antigénicas, y han sido caracterizados por la proteína MSP1 α , ya que varía en secuencia y peso molecular debido a los diferentes números de repeticiones en tándem presentes en cada aislamiento geográfico (De la Fuente *et al.*, 2004).

Por otro lado, hay que resaltar que las repeticiones en tándem están ausentes en *A. marginale subespecie centrale* y, aunque *A. centrale* es transmitida por *Rhipicephalus simus* la garrapata del cual se aisló originalmente, la misma no puede ser transmitida por otras especies de garrapatas que se sabe son vectores de *A. marginale*, lo cual justifica la ausencia de estas regiones repetidas en tándem, ya que como se indicó anteriormente son adhesinas que están relacionadas con la interacción huésped-

patógeno, y en este caso particular representarían un sistema de identificación diferencial entre ambas especies (Cabezas *et al.*, 2013).

MSP1a, codificado por el gen *msp1 α* , hasta ahora solo se ha identificado en *A. marginale* a pesar de los intentos de clonar este gen de otras *Anaplasma* spp. (de la Fuente *et al.*, 2007, pero para el 2019 se reporta que Se han encontrado homólogos del gen *msp1 α* de *A. marginale* en genomas de dos especies de Anaplasma: *A. centrale* y *A. ovis* (GenBank número de acceso NZ_CP015994.1), pero con una similitud de secuencia baja con *A. marginale msp1 α* del 31 al 36 % de identidad en el caso de *A. centrale* y del 42 al 48 % – en el caso de caso de *A. ovis* (Kovalchuck *et al.*, 2019)

Ahora bien, MSP1 α no ha demostrado ser una proteína adecuada para realizar estudios filogeográficos, ya que las secuencias de sus repeticiones en tándem son muy heterogéneas (De la Fuente *et al.*, 2004; de la Fuente *et al.*, 2006; Cabezas *et al.*, 2013), por lo que el análisis filogenético de *msp1 α* no proporciona información sobre el origen geográfico (De la Fuente *et al.*, 2004; de la Fuente *et al.*, 2006; Cabezas *et al.*, 2013; Kocan *et al.*, 2015). Sin embargo, el análisis de las secuencias repetidas de MSP1 α contribuyó a la comprensión de la diversidad genética de *A. marginale* dentro de regiones específicas, además de brindar información sobre la evolución de las interacciones huésped-patógeno-vector, por lo que se ha utilizado para la diferenciación y detección específica de aislamientos de *A. marginale* (Corona *et al.*, 2004; de la Fuente *et al.*, 2004; de la Fuente *et al.*, 2007; Kocan *et al.*, 2010; Cabezas *et al.*, 2013). Gracias a los estudios filogenéticos del gen *msp1 α* , se sugirió la coevolución de garrapatas y patógenos, y además proporcionaron evidencia a nivel mundial de múltiples introducciones de cepas de *A. marginale* de diferentes ubicaciones geográficas (De la Fuente *et al.*, 2007).

En base a o todo lo expuesto, hoy en día se sigue manteniendo la idea de que los genes de una sola copia que contienen un número variable de repeticiones entre aislados, son candidatos ideales para el genotipado por PCR, ya que mejora la

capacidad de detectar la presencia de múltiples cepas, por lo que el gen *msp1 α* es un candidato para el desarrollo de un ensayo genérico de genotipado de *A. marginale* que podría aplicarse a nivel mundial (Lew *et al.*, 2002).

Es importante indicar que, según De la Fuente *et al.* (2001), el gen *msp1 α* evoluciona bajo presión de selección positiva por parte del hospedador y la garrapata vector, lo que en áreas endémicas podría explicar la presencia de una población con alta diversidad genética debido a la ocurrencia de varios mecanismos independientes de transmisión, tales como mecánicos y biológico (Ramiro *et al.*, 2021). La heterogeneidad genética observada entre las cepas de *A. marginale* dentro de las regiones endémicas se manifiesta por el movimiento de ganado y el mantenimiento de diferentes genotipos por eventos de transmisión independientes, debido a la exclusión de la infección de *A. marginale* en el ganado y las garrapatas, que comúnmente resulta en el establecimiento de un solo genotipo por animal. Sin embargo, cuando existen genotipos relacionados de forma lejana en la misma región, es posible que se produzcan infecciones de un solo huésped con múltiples cepas de *A. marginale* (de la Fuente *et al.*, 2006).

Un estudio realizado por De la Fuente *et al.* (2004), titulado: Diversidad genética y filogenia molecular de aislados de *A. marginale* de Minas Gerais Brasil, tuvo como objetivo examinar la variación genética entre 10 aislamientos de *A. marginale* obtenidos de ganado infectado de Brasil. Este estudio resalta que dos aislamientos morfológicamente distintos han sido identificados en Brasil basados en la presencia de un apéndice de inclusión, los estudios de transmisión de garrapatas y microscopia electrónica demostraron que el aislado sin cola se multiplicó en células epiteliales de *B. microplus*, mientras que un aislado con cola no fue infectivo para las garrapatas. Este estudio indica que se documentó la ocurrencia de diferencias antigénicas, genéticas, morfológicas y biológicas entre aislamientos de *A. marginale*, pero no exploró la diversidad genética de las secuencias de *msp1*. Para ello, los genes *msp1 α* y *msp4* fueron amplificados y secuenciados en la siguiente población muestral: un

aislado con cola (con apéndice) denominado (AM-MG), obtenido de una vaca con infección aguda, posteriormente del aislado se inoculó en terneros esplectomizados y las muestras para este estudio se tomaron en el pico de parasitemia; otros nueve aislados Brasileños que se obtuvieron de ganado mestizo; para un total de 12 aislamientos de Brasil, 24 de EE.UU., 2 aislamientos de bisontes de EE.UU. y Canadá, y 7 aislamientos latinoamericanos (México, Argentina y Puerto Rico). La región codificante del gen *msp4* se secuenció por completo, pero para el gen *msp1 α* se secuenció solo el fragmento que contenía las repeticiones en tándem, la región *msp4* se utilizó para la alineación de secuencia y el análisis filogenético. Como resultado, las secuencias del gen *msp1 α* de aislamientos brasileños de *A. marginale* demostraron la presencia de 3–5 repeticiones en tándem en la porción amino terminal de la proteína, como se describe para otros aislamientos de *A. marginale*. Las secuencias repetidas de MSP1 α de aislamientos latinoamericanos de *A. marginale* tenían nueve secuencias repetidas, que no estaban presentes en los aislados norteamericanos secuenciados de *A. marginale*; además, las formas repetidas de genotipos (σ , τ , ν) del gen *msp1 α* estaban presentes solo en los aislamientos brasileños, mientras que los aislados latinoamericanos tenían 9 repeticiones en tándem de la forma α , Θ que no se encontraron en aislados de EE.UU.

Los autores concluyen que las interacciones vector-patógeno podrían influir en la presencia de secuencias repetidas de *msp1 α* particulares en aislamientos latinoamericanos de *A. marginale*. Sin embargo, en las regiones geográficas de América Latina donde se ha erradicado *B. microplus*, la anaplasmosis sigue siendo un problema, lo que sugiere que la transmisión mecánica y/u otras especies de garrapatas están involucradas en la transmisión de *A. marginale*, la caracterización de un aislado brasileño de *A. marginale* no transmisible por *B. microplus* sugiere un papel para la transmisión mecánica en la epidemiología de *A. marginale* en Brasil. Esta heterogeneidad probablemente refleje el movimiento del ganado y el mantenimiento

de diferentes genotipos por eventos de transmisión independientes (Palmer *et al.*, 2001; de la Fuente *et al.*, 2003).

Un estudio que extiende el panorama a nivel mundial en cuanto a la identificación y diversidad genética del gen *msp1α* se titula: Análisis de cepas mundiales de *Anaplasma marginale* utilizando secuencias repetidas de la proteína principal de superficie 1α, realizado por de la Fuente *et al.* (2007). El objetivo de este estudio fue la caracterización global y la diversidad genética de las cepas de *A. marginale* recolectadas en países de América del Norte y del Sur, Europa, Asia, África y Australia, incluidos todos los continentes. Este análisis incluye secuencias nuevas de MSP1α de cepas de *A. marginale* de México, Argentina, España, Sudáfrica y China, así como secuencias de MSP1α reportadas previamente de América del Norte y del Sur, Italia, Israel y Australia. Se caracterizaron 131 cepas de *A. marginale* usando 79 genotipos de las secuencias repetidas de MSP1α, ya descritos por de la Fuente *et al.* (2005). Todas las cepas de *A. marginale* en este estudio se obtuvieron originalmente de ganado infectado naturalmente.

El gen *msp1α* se amplificó a partir de ADN de *A. marginale* extraído de eritrocitos infectados, mediante PCR utilizando 10 pmol de cada cebador MSP1aP: 50 - GCATTA CAACGCAACGCTTGAG-30 y MSP1a3: 50 - GCTTTACGCCCGCCTGCGCC-30 como se informó previamente (de la Fuente *et al.*, 2001 y 2003). Los fragmentos amplificados se purificaron con resina y se clonaron en el vector pGEM T (Promega) o se usaron directamente para secuenciar ambas cadenas mediante secuenciación del ciclo de terminación de tinte de doble. Sólo se secuenció el fragmento que contenía las regiones aguas arriba y variables del gen *msp1α*. Cuando se clonaron, se secuenciaron al menos tres clones de cada PCR. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos repetidas de MSP1α de *A. marginale* se usaron para la alineación de secuencias y el análisis filogenético. El alineamiento de secuencias múltiples se realizó utilizando el programa AlignX (Vector NTI Suite V 5.5, InforMax, North Bethesda, MD, EE. UU.) (Thompson *et al.*, 1994). Debido al

alto grado de variación de secuencias dentro de las áreas endémicas, los análisis de filogenéticos de las secuencias de MSP1 α de cepas de América del Norte y del Sur, Italia, Israel y Australia no proporcionaron información filogeográfica (de la Fuente *et al.*, 2005). Sin embargo, los análisis de secuencias repetidas de MSP1 α a escala global pueden proporcionar información filogenética y evolutiva sobre las cepas de *A. marginale*. De tal manera que 62 de los 79 genotipos estaban presentes en cepas de una sola región geográfica, se encontró un grupo con fuerte apoyo en el cluster del 80% para cepas italianas, españolas, argentinas y sudamericanas; por otro lado, hubo un grupo de apoyo débil de 60 al 79% que contenía cepas americanas, europeas y sudafricanas.

Además, algunas repeticiones en tándem de los genotipos 27 y 13 estaban presentes en cepas de diferentes regiones geográficas de América Latina y Sudáfrica, que tenían el mismo vector común *Boophilus microplus*, infiriendo que las poblaciones de *B. microplus* americanas tienen un origen africano. Sin embargo, el papel de otras especies de garrapatas y la transmisión mecánica de cepas de *A. marginale* también podrían desempeñar un papel importante en la evolución de *A. marginale*. Estos resultados contribuyen a la comprensión de la diversidad genética y la evolución de *A. marginale* y las interacciones garrapata-patógeno, respaldando la hipótesis de la heterogeneidad genética observada entre las cepas de *A. marginale* dentro de las regiones endémicas. Estos estudios también sugieren que, con la excepción de Australia, donde se encontró un solo genotipo, en estas regiones ocurrieron múltiples introducciones de cepas de *A. marginale* de diferentes ubicaciones geográficas.

Además, este estudio indica que un análisis inicial de las secuencias de ADN_r16S de *A. marginale* en *Dermacentor variabilis* y *msp1 α* de cepas de *A. marginale* en varias áreas de los EEUU (de la Fuente *et al.*, 2001), aludió que algunas secuencias pueden haber evolucionado conjuntamente con el vector de la garrapata y que las interacciones garrapata-patógeno podrían influir en la presencia de repeticiones únicas de MSP1 α (de la Fuente *et al.*, 2001).

Otro estudio realizado por el mismo autor en 2006 titulado: Prevalencia y Diversidad Genética de cepas de *Anaplasma marginale* en el ganado bovino de Sudáfrica, tuvo como objetivo caracterizar cepas de *A. marginale* a nivel molecular en ganado de granjas comunales y comerciales de Suráfrica, Sureste y Noreste de las provincias del estado libre. Por medio de un Elisa competitivo se evaluó la seroprevalencia de *Anaplasma* spp, en 755 bovinos, sin embargo el ELISAc no diferenció *A. marginale* de *A. céntrale*, y como *A. centrale* no fue objetivo de este estudio y la coinfección de estas dos especies puede ocurrir en el ganado, la identificación y caracterización de *A. marginale* se realizó mediante una PCR especie – específica dirigida al gen *msp1 α* y el gen *msp4* en 215 de las muestras ya evaluadas con la técnica Elisa. Posteriormente, 129 amplicones resultantes de la PCR fueron seleccionados para la secuenciación del fragmento que contiene las regiones aguas arribas y variables del gen *msp1 α* . Como resultado, la seroprevalencia observada para *Anaplasma* spp. fue similar en el noreste y el suroeste, no se observaron diferencias en la prevalencia de *A. marginale* entre los sistemas agrícolas comerciales y comunales. Se analizaron las secuencias de los amplicones *msp1 α* de *A. marginale* de 29 cepas. Las cepas sudafricanas de *A. marginale* revelaron una gran diversidad genética, como lo demuestra el análisis de secuencia de *msp1 α* , que presentó 7 tamaños diferentes de las repeticiones en tándem y 24 tipos de genotipos de las repeticiones en tándem, de los cuales 20 genotipos eran únicos y diferentes, los otros cuatro se repetían siendo un mismo genotipo; los tamaños y genotipos de las repeticiones en tándem se distribuyeron y se encontraron en ambas regiones de Sudáfrica, 14 nuevas secuencias fueron detectadas en comparación con las secuencias informadas anteriormente. Sin embargo, el 42% de la secuenciación de las repeticiones en tándem no fueron exclusivas de estas regiones, lo que indicó la presencia de genotipos comunes entre cepas africanas, americanas y europeas, pero también había genotipos idénticos entre el Noreste, Sureste y el estado libre, confirmando la conservación del gen, por lo que el análisis estadístico no mostró

diferencias entre estas regiones. El alto grado de variación de la secuencia de repetición se dio dentro de áreas endémicas y la secuencia *msp1a* no puede proporcionar información filogeográfica evolutiva. Estos resultados concuerdan con reportes previos en los cuales la diversidad genética del gen *msp1a* de *A. marginale* fue mayor que la de *msp4*. En conclusión, el movimiento de ganado entre diferentes partes de Sudáfrica fue sugerido por la presencia de genotipos idénticos MAP1 α de *A. marginale*, en las regiones noreste y suroeste de la Provincia del Estado Libre, por lo que deben diseñarse estrategias de control para proteger contra cepas genéticamente heterogéneas de *A. marginale*. La caracterización de la prevalencia de la infección y la diversidad de las cepas de *A. marginale* que se informan aquí son fundamentales para el diseño de estudios epidemiológicos y estrategias de control de *A. marginale*.

Lew *et al.* (2002) desarrolló un trabajo titulado: Ensayo de reacción en cadena de la polimerasa *msp1a* para la detección y diferenciación específicas de aislamientos de *Anaplasma marginale*, con el objetivo de desarrollar una PCR basada en el gen *msp1a* de un aislado de Florida (Nº de acceso de GenBank M32871), que pudiera amplificar y diferenciar una amplia gama de aislamientos de *A. marginale*, que pudiera establecer relaciones entre especie, aislados geográficos, brotes de un mismo país y anaplasmosis de diferentes países, de manera intraespecífica y interespecífica, amplificando regiones repetidas dentro del gen *msp1a* que varía en número entre muchos aislamientos. Otros métodos moleculares, como las enzimas de restricción o el uso de secuencias consenso de las regiones intergénicas repetitivas de las enterobacterias y secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas, pero aun así estos métodos no son específicos y son difíciles de interpretar. Los cebadores empleados para su amplificación (1733F y 295R) alineaban con las regiones conservadas que flanquean la secuencia de repetición del gen *msp1a*, y se probaron en aislamientos de diferentes regiones geográficas: 21 aislamientos australianos, y 19 aislamientos de otros países (Argentina, Sudáfrica, Uruguay, Kenia, Israel). Se diseñó

una PCR semianidada cuyo cebador reverse fue utilizado con el mismo forward (1733F y 3134 R), estos últimos pares de cebadores solo se emplearon en caso de que la amplificación usando los primeros cebadores no tuvieran éxito. Para determinar el límite de sensibilidad de la detección por PCR se realizaron diluciones en serie de uno de los aislados, y se amplificó 1 ml de cada dilución utilizando tanto el método de PCR simple (1733F y 295R), como el formato semianidado; además se realizó una hibridación con una sonda dirigida al producto de PCR *msp1a* para su unión a los productos de PCR, que dieron bandas débilmente visibles. Los productos de PCR se clonaron y secuenciaron para determinar la variación en la secuencia de aminoácidos y nucleótidos de las repeticiones. La prueba de PCR no amplificó el gen en *A. centrale* ni *A. ovis*, y los cebadores de la PCR simple amplificaron bandas que variaron en tamaño de 630 pb a 1190 pb, los que representan de 1 a 8 repeticiones internas. Los aislados australianos presentaron una única repetición consistente a 630 pb, a excepción de dos aislados que dieron otro producto más grande de 710 pb; además, el genotipo de la repetición fue único para Australia y las secuencias de los 8 clones de 5 aislados diferentes australianos fueron idénticas en cuanto a su secuencia de aminoácidos y nucleótidos, la repetición única en los aislamientos australianos confirma la naturaleza conservada del gen.

Sin embargo, los dos 2 amplicones de los aislados australianos (F72 y H11) revelaron bandas secundarias muy débiles que tuvieron fuerte hibridación con la sonda, y en una segunda electroforesis con Visigel™ dieron productos adicionales más grandes, lo que puede representar números bajos de otros genotipos de *A. marginale*, o la posible unión no específica de cualquiera de los cebadores en otras partes del gen *msp1a*, aunque el análisis por medio de Blast de la secuencia de los cebadores no indicó que esto último fuese probable. Para aislar estos productos de PCR se produjeron clones idénticos para F72 y H11-4, encontrándose que la inserción de esa secuencia más grande precedió al marco de lectura del gen *msp1a* y no se debió a una unidad de repetición adicional. En conclusión, éstos autores deducen que la comparación entre aislamientos de *A. marginale* durante la

rikettsemia recurrente, tiene estabilidad genética no cambia en cultivo *in vitro* ni durante la transmisión. La secuenciación de los genes australianos proporcionó evidencia de la alta conservación por, lo que el producto principal del gen era idéntico en todos los aislamientos australianos, y la secuencia del producto amplificado de mayor tamaño en uno de los aislamientos australianos presentó la misma unidad repetida idéntica con la diferencia de tamaño debida a una inserción dentro de las secuencias flanqueantes de *msp1 α* . El primer reverse empleado en este estudio no es complementario a las secuencias americanas reportadas por Palmer *et al.* (2001). Los autores recalcan que su método de PCR amplificó más de un producto o genotipo, en contraste con estudios similares donde solo un único genotipo de *msp1 α* se amplifica de cualquier animal al mismo tiempo, estos cebadores han sido empleados en otros estudio como Gioia *et al.* (2018) y Aktas *et al.* (2020)

Por otro lado, en relación a la clasificación establecida para las diferentes repeticiones en tándem del gen *msp1 α* , el estudio de Cabezas *et al.*, (2013), titulado: Importancia funcional e inmunológica de *Anaplasma marginale* y análisis estructural de la secuencia de la proteína de superficie principal MSP1 α , tuvo como objetivo: Proponer una nomenclatura para la clasificación de cepas de *A. marginale* basada en el gen *msp1 α* . Para ello se clasificaron todas las repeticiones en tándem entre las cepas de *A. marginale*, se determinó la variabilidad y frecuencia de aminoácidos en cada posición, se determinó la variación de secuencias en epitopes de células B inmunodominantes, y se modeló la estructura secundaria de las repeticiones en tándem. Las cepas de *A. marginale* se identificaron originalmente por las diferencias en el peso molecular de la proteína MSP1 α , que ha sido establecida como marcador genético estable para la identidad, y que es relevante para muchas facetas de la investigación de *A. marginale*. La clasificación de cepas permite un estudio exhaustivo de la amplia diversidad mundial de *A. marginale*, por lo que el desarrollo de una nomenclatura unificada de MSP1 α de cepas de *A. marginale* basada en todos los datos de secuencia disponibles permitió la revisión y caracterización de la

diversidad genética mundial de esta bacteria. En este estudio, la nomenclatura propuesta es unificada para la clasificación de cepas de *A. marginale* basada en las secuencias de las repeticiones en tándem de MSP1 α y el microsatélite 59-UTR.

Se encontraron un total de 224 cepas de *A. marginale* diferentes que se basan en la ubicación geográfica, el número y la estructura de las repeticiones en tándem, que fueron descargadas y procedían de 17 regiones del mundo, lo que brindan una diversidad global de MSP1 α , mostrando 193 repeticiones en tándem diferentes con alta variabilidad de aminoácidos por posición. La mayoría de las cepas tenían más de una repetición en tándem y el número máximo de repeticiones fue de 10, en la mayoría de las cepas se observó solo en una región determinada, aunque se aislaron varias cepas de varios países latinoamericanos, tales como Argentina, México, Brasil, y Venezuela. Las repeticiones en tándem más comunes encontradas entre todas las cepas de *A. marginale* fueron la M, beta, Y, y B, y se encontraron más de 60 (M), 80 (beta) y 90 (B) veces.

La mayoría de las repeticiones en tándem de MSP1 α se compartieron entre diferentes cepas. Se realizó la identificación de los aislamientos descargados de *A. marginale*, basándose en la secuencia de las repeticiones en tándem y el microsatélite, indicando que la repetición de tipo B fue la más común, se encontró en 43 cepas y hubo genotipos de repeticiones que fueron exclusivos para Brasil (genotipo 72), mientras que la repetición B se encontró en todo el continente americano, además Australia presentó un único genotipo exclusivo de esta región. Algunas repeticiones parecían estar distribuidas en todo el mundo (la repetición M se informó en Israel, Italia, EE. Sudamérica). El número de repeticiones en tándem más común fue de 5 repeticiones en tándem con un 29,80%, seguido de las cepas que contenían 4 con un 28,4% y por último 3 repeticiones en tándem con 20,1%. En cuanto a la O-glicosilación de MSP1 α , se encontró que las repeticiones en tándem de MSP1 α tenían una alta variabilidad en casi todas las posiciones de 31 aminoácidos, lo que sugiere una presión evolutiva considerable sobre esta molécula, cuatro posiciones

estaban totalmente conservadas: serina (S)4 y S25, alanina (A)22 y Glicina 31. Se ha demostrado que MSP1 α está *o*-glicosilada, con regiones serina (S)/treonina (T) presentes en las repeticiones en tándem como el sitio objetivo para este tipo de glicosilación. Además, la capacidad de unión de MSP1 α a las células de la garrapata disminuyó después de la desglicosilación. La conservación de S4 y S25 entre todas las repeticiones en tándem incluidas en este estudio podría indicar que la *o*-glicosilación en estas dos posiciones es muy relevante para la infección por *A. marginale*.

Los aminoácidos en la posición 20 son vitales para la unión al extracto de células de garrapata (TCE), los aminoácidos cargados negativamente, ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E), en la posición 20 demostraron ser esenciales para la unión de MSP1 α a TCE. Cuando la glicina (G) se ubicó en la posición 20, no se observó unión. Este resultado sugirió que el aminoácido en la posición 20 puede ser esencial para que *A. marginale* se una a las células de garrapata, un requisito previo para la infección y transmisión de patógenos por garrapatas. Confirmando que las cepas de *A. marginale* transmisibles por garrapatas tienen una primera repetición en tándem denominada (R1) con un 34,7% de secuencias diferentes, aun así, tiene menos variabilidad de aminoácidos y 6 posiciones conservadas en comparación con otras primeras repeticiones en tándem que no son del tipo R1, y solo tienen 4 posiciones conservadas y mayor variabilidad de aminoácidos en la posición 20. Se encontraron 87 repeticiones en tándem que contenían ácido aspártico (D) en la posición 20 (71%), o ácido glutámico (E) (29%). En total, 161 cepas de *A. marginale* contenían una de estas repeticiones en tándem al menos una vez, y en 114 (71%) de estas cepas, se encontró D20 o E20 en la repetición en tándem R1.

Sorprendentemente, el aminoácido con mayor variabilidad se encontraba en la posición 20, lo que sugiere una mayor presión evolutiva en esta posición. A partir de estos hallazgos, G fue el aminoácido más frecuente en la posición 20, tanto en repeticiones en tándem R1 como no R1, pero solo se encontraron 4 aminoácidos en la

posición 20 en R1 (desde el más alto a la frecuencia más baja: G, D, E y serina [S]), mientras que se encontraron 7 aminoácidos diferentes en la posición 20 en repeticiones en tándem no R1 (G, D, E, S, T, isoleucina [I] y tirosina [Y]). En experimentos anteriores, las repeticiones en tándem no R1 tenían una correlación filogenética con las cepas transmisibles por garrapatas, pero esta correlación no se observó con las repeticiones en tándem R1. Los autores proponen que las repeticiones en tándem no R1 también están involucrados en las interacciones *A. marginale*-garrapata que requieren más variabilidad genética, porque se ha informado que más de 20 especies diferentes de garrapatas transmiten *A. marginale*.

Por último, se determinó la variación de aminoácidos en la secuencia de los epítopes de las células B y T inmunodominantes sensibles a la neutralización, y se modeló la estructura secundaria (2D) de la expresión de las repeticiones en tándem. Se encontró que este epítipo de unión para los linfocitos T y B, sensible a la neutralización, estaba conservado entre cepas heterólogas de *A. marginale*, que las repeticiones en tándem en el extremo N-terminal de MSP1 α están ausentes en *A. centrale*, lo que establece que esta última especie no puede ser transmitida por otras garrapatas que se saben que son vectores de *A. marginale*. Además, la *o*-glicosilación con regiones S/Treonina (T) están presentes en las repeticiones en tándem y aumentan la capacidad de unión a las garrapatas que cuando están desglicosilada.

Los autores describen entonces dos nuevas estructuras de microsatélites, nombradas J y K, argumentando que las cepas únicas de *A. marginale* (77% de todas las secuencias encontradas) se basan en diferencias en la ubicación geográfica, el número y estructura de las repeticiones en tándem MSP1 α y microsatélites, y se clasificaron siguiendo la nomenclatura propuesta, que fue una clasificación de genotipos que va de la letra A-W, luego en letras griegas de alfa (α) a tita (τ), y luego en números de las 1 a la 163. Esta débil asociación entre secuencias repetidas en tándem específicas y regiones geográficas particulares fue reportada previamente por de la Fuente *et al.* (2006) y puede atribuirse al movimiento mundial del ganado, entre

otros factores. En particular, en Australia, donde la introducción de ganado ha sido limitada y solo se ha informado de un genotipo MSP1 α .

Un estudio de Kovalchuck *et al.* (2019) para el diagnóstico especie-específico que fue confirmado con sondas, tuvo como objetivo desarrollar una sonda TaqMan altamente sensible y específica para cada especie de *Anaplasma* de interés en este estudio. Se realizó un ensayo de PCR en tiempo real con un control de amplificación interna (IAC) endógeno fácil de usar para detección y cuantificación de *A. marginale* en muestras de sangre bovina. Donde:

Identifican *A. marginale* con la amplificación del gen *msp5* mediante de la técnica de Torina, *et al.*, (2012) Luego amplifican el amplicon obtenido, para la confirmación de la especie.

Diseñan cebadores y una sonda taqMan: Todas las secuencias completas disponibles del gen *msp1 α* se recuperaron de GenBank y se alinearon con Programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Solo un 3'- altamente conservado. Se utilizó la región terminal del gen *msp1 α* para diseñar los cebadores y la sonda. Los cebadores *msp1 α* -F: 5'- TGTTTGGAACCTAGGCTTATAG-3' *msp1 α* -R: 5'-CTTCTGCTGATCTTCCTGTCTC-3'. En el ensayo de PCR en tiempo real descrito aquí, emplea las regiones 3'-terminales de *msp1 α* , que están altamente conservados entre las cepas de *A. marginale*, han sido elegidos como objetivo para la amplificación. El Análisis *in silico* de la especificidad de los cebadores diseñados y la sonda TaqMan realizado con la herramienta BLASTN no reveló una similitud significativa con otras secuencias bacterianas, incluidos los de los genomas de *A. centrale* (número de acceso de GenBank CP001759) y *A. ovis* (Número de acceso de GenBank NZ_CP015994.1). Estas razones nos permiten considerar esta región de el gen *msp1 α* como un objetivo adecuado para el ensayo de PCR para la detección y cuantificación de *A. marginale* en sangre bovina. Los cebadores diseñados y la sonda TaqMan se probaron en PCR en tiempo real usando 50 muestras de ADN muestras de vacas positivas para *A. marginale*. Los 50 obtuvieron amplicones de 207 pb de

longitud mostró una identidad de secuencia del 99-100 % con el gen *msp1α* de *A. marginale* de GenBank.

Dos estudios realizados en Ecuador en los últimos años evaluaron, con métodos diferentes de PCR el gen *msp1α*. El primero de ellos fue realizado por Gioia *et al.*, (2018) titulado: Anaplasmosis bovina y patógenos transmitidos por garrapatas en bovinos de las Islas Galápagos (Santa cruz, San Cristóbal e Isabela), el objetivo de los autores fue realizar un estudio transversal para determinar las especies de *Anaplasma spp* y estimar su prevalencia en bovinos de las tres principales islas productoras de ganado mediante ensayos de PCR, secuenciación genética y Elisa. Se realizó un diagnóstico de PCR para *Anaplasma spp* a partir se sangre recolectada con EDTA en bovinos, el ADN se extrajo de la sangre completa con el kit blood Quinck pure, posteriormente el ADN se sometió a técnicas de PCR especie específica para *A. marginale* y *A. phagocytophilum*. Por último, se realizó la secuenciación del material genético de varias especies de *Anaplasma spp* en las islas. Para este estudio se analizaron 395 muestras de 10 rebaños seleccionados por Isla, y 10 bovinos de cada rebaño. Para la determinación de *Anaplasma spp* se realizó una PCR dirigida a una sección del gen *ADNr16S*. Para la determinación de *A. phagocytophilum* se realizó una PCR específica dirigida a una sección del gen *msp2*, y para la determinación de *A. marginale* se realizó una PCR específica dirigida al gen *msp1α*. Por último, la secuenciación se realizó a partir de la amplificación de gen del *ADNr23S* y el gen *groEL*, este último fue amplificado con primers específicos para *A. platys* o parecidos. Cabe destacar que este estudio fue transversal y aplicó diferentes técnicas, entre ellas el ensayo inmunoenzimático ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra *A. marginale*, con una sensibilidad del 90%. De 395 muestras, 382 fueron positivas para *Anaplasma spp* con el gen *ADNr16S*, de las 382 muestras 356 dieron positivas para *A. marginale* y ninguna fue positiva para *A. phagocytophilum*. 30 Muestras que resultaron positivas en la PCR de amplio espectro para *Anaplasma spp* fueron seleccionadas y luego sometidas a una PCR dirigida a una sección del

ADNr23S y genes de proteína de choque térmico *groEL* con primers específicos para *A. platys* o similares a *A. platys*.

Los productos de PCR fueron secuenciados y analizados por el software BLAST para identificar especies plasmáticas de *Anaplasma spp.* El análisis Blast para la región amplificada y secuenciada del gen *ADNr23S* arrojó 99% de identidad con anaplasma de origen canino, y 98% de identidad para *A. marginale*. En cuanto a la secuenciación del gen *groEL*, arrojó 99% de identidad para *A. platys*. Tres de las 16 muestras que dieron positivas para el ELISA indirecto fueron negativas por PCR especie específica de *A. marginale*, y fueron identificadas por secuenciación, dando secuencias similares a *A. platys*, sugiriendo falsos positivos por ELISA. En conclusión, las islas de los Galápagos es una región endémica para *A. marginale* con una prevalencia global del 100%. Las cepas de *A. marginale* y *A. platys* están estrechamente relacionadas al menos para estos dos genes. Aunque no existe un informe de patogenicidad para esta cepa plasmática de *A. platys* en bovinos, puede ser importante tener en cuenta la presencia de esta bacteria al interpretar los resultados para *A. marginale*, además esto parece respaldar aún más la posibilidad de reacciones cruzadas en lo ensayo ELISA.

El segundo trabajo ecuatoriano titulado: Epidemiología y diversidad genética de *Anaplasma marginale* en Zamora, Chinchipé, Ecuador, realizado por Ramiro *et al.* (2021), utilizó 185 bovinos seleccionados al azar para llevar a cabo el diagnóstico por PCR anidada y sondas de hibridación dirigida al gen *mSP5* de *Anaplasma sp.* Posteriormente 13 cepas representativas y positivas para el diagnóstico ya mencionado, fueron caracterizadas genéticamente en base al gen *mSP1 α* para estudios de diversidad genética, según la clasificación de Cabezas *et al.*, (2013), realizada en más de 250 repeticiones en tándem conocidas en todo el mundo. Posteriormente, se realizó la secuenciación de las repeticiones en tándem para su análisis y clasificación según de la Fuente *et al.* (2007). Se obtuvo una prevalencia general de 63,8% por medio de la técnica PCR del gen *mSP5* y la hibridación con una sonda específica para

msh5 de *Anaplasma spp.* Sobre la base de los resultados de la PCR para *msh5*, trece muestras positivas fueron seleccionadas y secuenciadas para el gen *msh1a* y depositados al GeneBank bajos los N° de accesos que van de MF288032 hasta MF288044, teniendo como resultados de sus análisis que los amplicones para el gen *msh1a* mostraron pesos moleculares entre 350 y 850 pb, consistentes al polimorfismo de longitud generado por las repeticiones en tándem. Los análisis de la secuenciación de las repeticiones en tándem revelaron el 100% de identidad (13/13) para *A. marginale* y las cepas contenían más de una repetición en tándem, se encontraron 13 nuevos genotipos para Ecuador (D, G, E, Q, α , ϕ , 13, 14, 17, 18, 27, 64 y 65) que han sido informados en estudios anteriores, pero en las regiones Zamora y Nangaritza predominaron los genotipos 27, 13-18. Se determinaron los genotipos alfa numéricos y se realizó la identificación de cepas con el software RepeatAnalyzer (creado por Catanese, 2016) identificándose 10 cepas diferentes, dos de las cuales fueron con los genotipos 64-65-D-65-E, y la segunda cepa con los genotipos 64-65-DE, que fueron nuevas para Ecuador, pero ya habían sido mencionadas en otros estudios. Y las otras 8 cepas presentaron los siguientes genotipos. Cepa A: DDDDDGE, Cepa B: EQYY, Cepa C: 27-13-13, Cepa D: E-Y, Cepa E: 27-13-Y-14, Cepa F: 27-13-18, Cepa G: 27-13-13-18, Cepa H: Y-17-17, siendo la cepa F la más extendida, encontrándose en 4 muestras, y la combinación 27-13 apareció en 7 genotipos.

El análisis filogenético de las secuencias de MSP1 α reveló que las cepas de los cantones Zamora y Nangaritza se agruparon, con excepción de la cepa Z1 (MF288041), y estaban estrechamente relacionadas con las secuencias de Sudáfrica, México, Venezuela, Cuba y Filipinas. En cambio, la cepa Z1 estaba más cerca de otros grupos de cepas observados en México y Brasil. Las cepas encontradas en los cantones de las regiones norte (Yantzaza y Panguí) y sur (Palanda y Chinchipe) de la provincia se agruparon indistintamente en dos grupos, y dos de ellos (MF288036 y MF288034) mostraron similitud con cepas de Italia y Puerto Rico, mientras que los otros tres (MF288032, MF288033 y MF288035) estaban más cerca de las cepas de

México, Venezuela y EE. UU. Este estudio indica que los diferentes genotipos en cuenta a la secuencia de los microsatélites fueron frecuentes según este orden: el genotipo G fue más común que el genotipo C<E<Q<Y<13<14<17<18<27<64<65<D. Las trece nuevas repeticiones en tándem para estas regiones fueron idénticas a cepas de *A. marginale* en todo el mundo, además se describieron dos genotipos del gen *msp1α* que fueron idénticos a brotes de anaplasmosis en México y Venezuela.

En cuanto al genotipo de los microsatélites, la presencia predominante en Ecuador fue el genotipo G y por ser común a nivel mundial sugiere que hay un ancestro común que pudo originarse en Sudáfrica, y se han generado nuevos genotipos en Ecuador, además de la evolución dada por presión de selección positiva por parte tanto del hospedador como de la garrapata en áreas endémicas podría explicar la presencia de una población de *A. marginale* con alta diversidad genética debido a la ocurrencia de varios mecanismo de transmisión tales como mecanismo biológicos.

En conclusión de la revisión bibliográfica aludimos la importancia que tiene el gen *msp1α* para el diagnóstico específico de *A. marginale*. En el estudio realizado por de la Fuente *et al.*, (2006) se menciona que las infecciones por *A. marginale* se identificaron mediante PCR específica de la especie con el gen *msp1α*. El estudio de Lew *et al.*, (2002) indica que el método de PCR de *msp1α* desarrollado permitió la amplificación y comparación de aislados de *A. marginale* originarios de América del Norte y del Sur, África, Israel y Australia, siendo un método sensible y específico para *A. marginale*. Además, otros estudios establecen que una simple prueba de PCR basada en MSP1α ha logrado diferenciar con éxito *A. marginale* de América del Norte (de la Fuente *et al.*, 2001; Palmer *et al.*., 2001), pero el método no se ha intentado con aislamientos de otros continentes (Lew *et al.*, 2002). Las aplicaciones de una prueba de PCR específica para *A. marginale* permitirán confirmar las interpretaciones de ELISA y amplificar *A. marginale* específicamente. A fines de lograr los objetivos de la investigación, se descartan el uso de los genes antes

explicados excepto el gen *msp1α* ya que es el escogido como la región diana más adecuada.

Análisis de los cebadores diseñados para el gen *msp1α* de *A. marginale*

En las Tablas 10-14 se presenta el análisis por medio de Primer Blast de 5 pares de cebadores diseñados y reportados en la literatura para el gen *msp1α* de *A. marginale*. Este análisis permitió concluir que los cebadores diseñados por Kovalchuk *et al.* (2019) fueron los que presentaron los mejores resultados en cuanto a especificidad, temperaturas de alineamiento y %GC para la amplificación del gen *msp1α* de *A. marginale* (Tabla 13). En este sentido, el diseño de los cebadores para ser usados en PCR es fundamental para determinar el tamaño del fragmento amplificado, así como la especificidad de la PCR. El momento de realizar el diseño de cebadores para PCR se han estructurados una serie de recomendaciones que permiten garantizar, por lo menos *in silico*, el éxito de la PCR, tales como (i) el %CG debe ser de aproximadamente 50%, mientras que el de porcentaje de purinas/pirimidinas debe encontrarse entre 40 y 60%; (ii) se debe evitar que los cebadores alineen con una secuencia del templado que contengan repeticiones de una única base; (iii) en los extremos, las últimas bases deben ser una C o G, y el extremo 3' no debe tener una importante estructura secundaria; (iv) evitar la complementariedad entre la pareja de cebadores, entre el mismo cebador, así como la formación de estructuras secundarias debido a la complementariedad de secuencia de cada uno de los cebadores; (v) deben tener una longitud entre 18 a 30 pb; (i) la temperatura de alineamiento debe ser similar entre ambos cebadores, y estar entre los 45 y 60°C (Prescott *et al.*, 1999).

Los cebadores diseñados por Palmer *et al.* (2001) no son específicos para la especie, ni para el género de *A. marginale*, lo que se evidencia ya que la búsqueda por coincidencia al azar en Primer Blast no reportó alineamiento con *A. marginale* (Tabla 10), a pesar de que los autores reportan que fueron diseñados usando como templado el gen *msp1α* de *A. marginale*, específicamente usando regiones conservadas que flanquean las secuencias repetidas, como marcador estable para determinar la región

repetida variable de *A. marginale* sobre muestras de garrapatas infectadas. El cebador directo se ubicaba en la posición de nucleótido 299 a 280, en relación con el sitio de inicio de la transcripción, numeración basada en la secuencia *msp1α* de la cepa de Florida con número de acceso M32871 y M32872, indicando el número de repeticiones que se puede determinar a partir del tamaño del amplicón resultante, debido a que los 268 pb que preceden a los 17 pb que siguen a las repeticiones en tándem se conservan en todas las cepas de *Anaplasma*. Este estudio indica que la diversidad genotípica no pareció generarse rápidamente dentro de un animal, sin embargo, el resultado de especificidad puede ser justificado por la variación y pérdida de la conservación de esa región conservada flanqueante de las regiones variables o repeticiones en tándem a lo largo del tiempo.

Por otro lado, los cebadores utilizados por Lew *et al.* (2002) cumplen varias de las recomendaciones para el diseño de cebadores, ya que la temperatura de alineamiento es similar entre ambos cebadores, el %CG se aproxima al 50% para ambos cebadores, y es específico para *A. marginale*, ya que hibrida con una coincidencia exacta con 50 cepas de la base de datos. Sin embargo, se debe tener presente que la auto complementariedad entre ambos cebadores es alta, y que se evidenció alineamiento con 3 cepas de *A. phagocytophilum* (Tabla 11).

Los cebadores diseñador por de la Fuente *et al.* (2007) presentan temperaturas muy altas y diferentes entre ambos cebadores, lo mismo se determinó para el % de CG, además, la auto complementariedad es alta. Además, este par de cebadores hibrida solo con 10 cepas de la base de datos *nr* de Primer Blast, la cual incluye secuencias curadas y no curadas (Tabla 12). Se ha reportado el uso de estos cebadores en cepas sudafricanas, sin embargo, el análisis por medio de Primer Blast no reportó alineamiento con cepas de esta región, siendo probable que las secuencias reportadas en la literatura estén conformadas por las regiones de repetición en tándem para *msp1α*, no sean las secuencias completas.

Kovalchuk *et al.* (2019) diseña un par de cebadores en los que las temperaturas de alineamiento y el % de CG son muy parecidos entre ambos, en los extremos termina

con una C o G a excepción del cebador forward, que comienza con una T, el porcentaje de purinas y pirimidinas se establece adecuadamente para estos cebadores, y la autocomplementariedad es baja. El 100% de los alineamientos fueron con secuencias del gen para *msp1α* de *A. marginale*. Este par de cebadores cumplen a cabalidad los criterios sugeridos para el diseño de primers, así como la especificidad de alineamiento con una gran cantidad de cepas de la base de datos (Tabla 13).

Por último, los cebadores del estudio más reciente realizado por Witchuta *et al.* (2021) presentaron una gran especificidad para *A. marginale*, ya que un gran número de cepas hibridan con estos cebadores, sin embargo, se observó la presencia de apareamientos inespecíficos en las tres primeras bases del extremo 5'. En cuanto a la temperatura de alineamiento y el % de CG, son similar entre ambos cebadores, pero se encuentran por encima de 60°C y 50%, respectivamente. No ocurre autocomplementariedad en el extremo 3', y los extremos terminan en G o C, a excepción de cebador reverse donde el extremo 5' presenta una Adenina (Tabla 14).

El análisis por medio de Primer Blast arroja como resultado final que son los cebadores diseñados por Kovalchuk *et al.* (2019) los que cumplen con los criterios de diseño y especificidad para la amplificación del gen *msp1α* de *A. marginale*, siendo necesario ser probados en cepas de *A. marginale* de Venezuela.

Discusión de la PCR *in silico*

Los resultados de la PCR *in silico* con los cebadores para el gen *msp1α* de *A. marginale* se presentan en las Tablas 15-19. En líneas generales, los cebadores diseñados por Palmer *et al.* (2001) y Witchuta *et al.* (2021), no produjeron amplicón con ninguna de las secuencias usadas como templado (Tablas 17 y 19, respectivamente). Los cebadores diseñados por de La Fuente *et al.* (2007) fueron capaces de producir amplicones putativos entre 2200 y 2500 pb usando como templado secuencias de *A. marginale* de diferentes orígenes geográficos, pero resultaron generar advertencias con respecto a la temperatura de alineamiento, %GC y formación de horquillas (Tabla 18). Por último, los cebadores diseñados por

Kovalchuck *et al.* (2019), produjeron un amplicón putativo de 207 pb con varias de las secuencias del gen *msp1 α* de *A. marginale* usadas como templado (Tabla 15). Ninguno de los cebadores produjo un amplicón cuando se usaron secuencias parciales del gen *msp1 α* de *A. marginale* asiladas en Barinas, Lara y Táchira.

En el análisis de un producto de PCR, es de gran ayuda recordar la estructura que presenta el gen para el que fueron diseñados los cebadores, ya que el producto obtenido se relaciona de cierta manera a alguna parte de su estructura. En este caso, el gen *msp1 α* , que se conserva durante la multiplicación del *A. marginale* en bovinos y garrapatas, se ha considerado como un marcador estable de identidad de cepa, y se ha utilizado para identificar cepas de *A. marginale* basándose en repeticiones en tándem variables ubicadas en la región N-terminal, y un microsatélite 5'-UTR ubicado en el extremo 5' del gen (Ramiro *et al.*, 2021). Las diferencias en el peso molecular del gen *msp1 α* entre las diferentes cepas ambientales se deben al número variable de repeticiones en tándem ricas en serina ubicadas en la región N-terminal de la proteína, los cuales puede variar entre 23 a 31 repeticiones, y son continuas con una región C-terminal altamente conservada. Este número de repeticiones en tándem puede variar entre cepas, pero se mantiene constante a nivel intragénico. El análisis de las secuencias repetidas del gen *msp1 α* contribuyó con la comprensión de la diversidad genética de *A. marginale* dentro de regiones específicas, además de brindar información sobre la evolución de las interacciones huésped-patógeno-vector (Cabezas *et al.*, 2013).

La PCR *in silico* realizada en este estudio permitió identificar los pros y contras de los cebadores que se han reportado en la literatura para el diagnóstico molecular de *A. marginale*, específicamente los dirigidos al gen *msp1 α* . Los cebadores usados por Palmer *et al.* (2001), al igual que los cebadores de Lew *et al.* (2002), fueron diseñados para amplificar la región conservada que flanquea a las repeticiones en tándem del gen *msp1 α* , regiones que son utilizadas para evaluar la diversidad genética presente en las diferentes cepas de *A. marginale*, que ocurre ya sea por el movimiento

del ganado, por el mecanismo de transmisión dado en cada región y la coevolución de la garrapata (de la Fuente *et al.*, 2007). De esta manera, son las repeticiones en tándem las que se expresan en la membrana para la interacción y adhesión del microorganismo con los eritrocitos bovinos y con las garrapatas, así como también son responsables de generar la respuesta inmunológica protectora debido a su enorme variabilidad (Cabezas *et al.*, 2013). Debido a que las repeticiones en tándem son altamente variables, también se someten a esta variabilidad las regiones flanqueantes, las cuales pueden sufrir variaciones importantes de la secuencia dentro de una misma especie, y entre especies diferentes. Por esta razón, la PCR *in silico* para los cebadores usados por Palmer *et al.* (2001) fue negativa, además que se reporta para este par de cebadores un %GC muy bajo, lo que podría generar un producto débil cuando se lleve a cabo la PCR *in vivo* (Tabla 17).

La disponibilidad de numerosas secuencias del gen *msp1a* de *A. marginale* *msp1a* en GenBank, y de que la estructura y secuencia de las repeticiones en tándem varían entre cepas de diferentes ubicaciones geográficas, pero se mantiene la porción restante de la proteína altamente conservada, han hecho posible la obtención de productos de PCR *in silico* con los cebadores diseñados por Lew *et al.* (2002), han obtenido buenos resultados en el análisis *in silico* dando un producto de amplificación en casi todos los templados utilizados, a excepción de los provenientes de Brasil, Taiwán y México (Tabla 16). Esta PCR *in silico* no produjo mayores advertencias, salvo lo alto de la temperatura de hibridación, por lo que podrían resultar útiles para el diagnóstico de *A. marginale* en campo, siempre que se mejore la temperatura, ya que la región a la que se dirigen los cebadores de Lew *et al.* (2002) se mantiene constante a pesar de las repeticiones variables en ese extremo del gen.

Por otro lado, los cebadores empleados por de la Fuente *et al.* (2007) también han sido utilizados en la caracterización de la diversidad genética de aislados de *A. marginale* proveniente de regiones geográficas. Sin embargo, en este caso, PCR *in silico* no reportó un producto para todos los templados, posiblemente debido a que el %GC es muy alto, lo que conlleva a que las temperaturas de hibridación sean muy

altas. Por otro lado, el hecho de que los cebadores contengan más de 3 bases nitrogenadas de C o G en los extremos incrementa la posibilidad de que los cebadores formen horquillas, disminuyendo el rendimiento de la PCR (Tabla 18). Para llevar a cabo un diagnóstico a nivel de campo, resultan inapropiados, sobre todo porque el autor indica que la frecuencia de posiciones variables de aminoácidos dentro de los aislamientos geográficos es mayor en esta región que en el resto de la proteína (de la Fuente *et al.*, 2001). Como resultado del alto grado de variación de secuencias dentro de las áreas endémicas, las secuencias de *m脾1α* no brindaron información filogeográfica, porque se encontrarían determinadas repeticiones en tándem en unas cepas y en otras no (de la Fuente *et al.*, 2006).

Otros cebadores que no dieron un producto de amplificación fueron los de (Witchuta *et al.*, 2021) (Tabla 19), en donde la PCR *in silico* arroja las mismas advertencias que las reportadas para los cebadores diseñados por de La Fuente *et al.* (2007), explicadas anteriormente. Los cebadores de Witchuta *et al.* (2021) fueron diseñados para amplificar las regiones flanqueantes de las repeticiones en tándem, las cuales han variado a lo largo del tiempo, ya que como lo menciona de la Fuente *et al.* (2001), el gen *m脾1α* evoluciona bajo presión de selección positiva por parte del hospedador y la garrapata vector, lo que en áreas endémicas podría explicar la presencia de una población con alta diversidad genética debido a la ocurrencia de varios mecanismos independientes de transmisión, tales como mecánicos y biológicos (Ramiro, 2021).

Los únicos cebadores que fueron diseñados en la región 3' del gen *m脾1α*, altamente conservada entre las cepas de *A. marginale*, donde no se encuentran regiones de repeticiones en tándem, fueron los cebadores diseñados por Kovalchuk *et al.* (2019), dando un producto de PCR *in silico* con la mayoría de los templados utilizados. En el caso del gen *m脾1α* del aislado de Florida (CP001079.1) no dio un producto, pero sí se obtuvo para el genoma completo de este mismo aislado, lo que indica que la secuencia de este gen se ha reportado de manera parcial en la base de datos. Por otro lado, la PCR *in silico* usando estos cebadores fueron positivas para 4

templados más que los cebadores de Lew *et al.* (2002). En el caso de los cebadores de Kovalchuk *et al.* (2019), el cebador forward presenta una advertencia que disminuye el rendimiento de la PCR, ya que presenta una auto-hibridación o recocido con 4 bases seguidas, sin embargo, es un factor que en la PCR *in vivo* se puede controlar usando las concentraciones correctas del cebador.

En la Figura 2 se presenta un árbol filogenético construido con secuencias del gen *msp1a* de *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis* reportadas en las bases de datos NCBI, provenientes de diferentes orígenes geográficos. Se puede observar que, debido a la agrupación de las diferentes secuencias del gen *msp1a* de *A. marginale* en clados muy cercanos, la secuencia de este gen se conserva en gran medida en las diferentes cepas de *A. marginale*; sin embargo, resulta muy divergente para otras especies de *Anaplasma*, como *A. centrale* y *A. ovis*, las cuales se separan en un clado diferente.

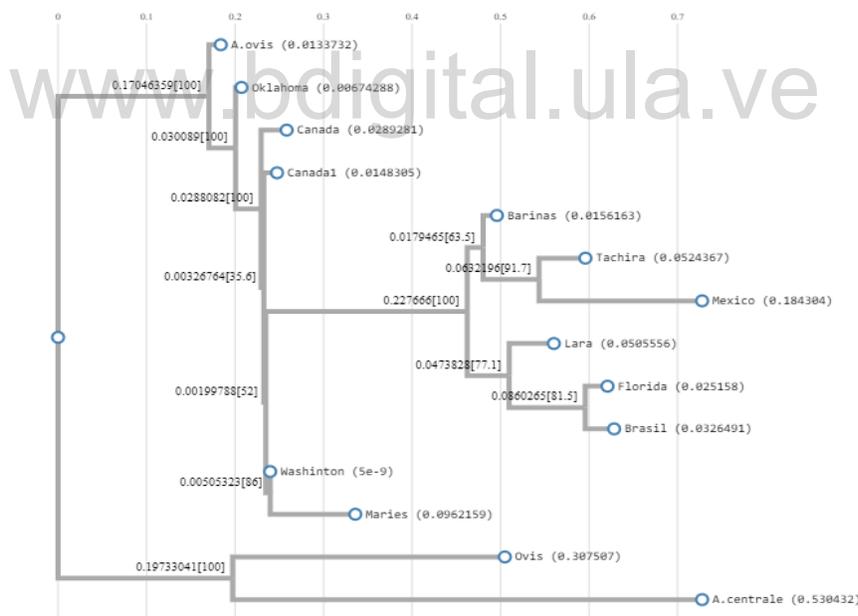


Figura 4. Árbol filogenético construido con las secuencias del gen *msp1a* de *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis*.

Al observar los alineamientos realizados con las secuencias utilizadas para la construcción del árbol filogenético de la Figura 2, se evidencia que las regiones

centrales del gen, son bastantes conservadas, pero no lo suficiente como para diseñar cebadores en tales regiones; incluso se incluyen en estas regiones del alineamiento las secuencias parciales del gen *msp1a* de *A. marginale* de Barina, Táchira y Lara (Figura 3). Sin embargo, la región 3' de los diferentes aislados de *A. marginale* son estables y presentan alta conservación, mientras que estas regiones difieren en las secuencias del gen *msp1a* de *A. centrale* y *A. ovis* (Figura 4). Se observa en la Figura 4, que las secuencias parciales del gen *msp1a* de *A. marginale* de Barinas, Táchira y Lara no incluyen la región 3' por lo que no es posible obtener productos de PCR *in silico* usando estas secuencias como templados, por lo que es necesario obtener secuencias completas de aislados venezolanos para poder incluirlos en este tipo de análisis.

```

Barinas      -----GAGGAGCTGATAGCTCGTCAGCGAGTGGTCAGCAGCAAGAGAGTAGTGTGTCAT
Canada      CTCAATTAGGAACTGATAGCTCGTCAGCGGGTGATCAGCAGCAAGGGAGTGGTGTGTCAT
Lara        -----GGACTGATAGCTCGTCAGCGGGTGATCAGCAGCAAGAGAGTAGTGTGTCAT
Tachira     -----GAGCTGATAGCTCGTCAGCGAGTGGTCAGCAACAAGAGAGTGGTGTGTTAT
Canadal     -----GAGCTGATAGCTCGTCAGCGGGTGGTCAGCAGCATGAGAGTAGTGTGTCAT
Brasil      -----GAGCTGATAGCTCGTCAGCGAGTGGTCAGCAGCAAGAGAGTAGTGTGTTAT
Mexico     -----GGACTGATAGCTCGTCAGCGAGTGGTCAGCAGCAAGAAAGTAATGTGTTAT
Florida     -----GAGCTGATAGCTCGTCAGCGGGTGGTCAGCAGCAAGAGAGTAGTGTGTCAT
Oklahoma   -----GAGCTAATTGGCGGCAAGAGATGCGCTCCAAGGTTGCGAGTGTGAGTACA
Maries     -----GGACTGATTGGCGGCAAGAGATGCGCTCCAATGTTGCGAGTGTGAGTACA
Washinton  -----GAGCTGATAGCTCGTCAGCGGGTGGTCAGCAGCAAGAGAGTAGTGTGTCAT
A.ovis     -----GGACTGATTGGCGGCAAGAGATGCGCTCCAAGGTTGCGAGTGTGAGTACA
Ovis       CTGGTGGCACAGTTGATTGGCAAAAAGCAATATCTGACAAGATCGGAAGCCAGGAGTACA
A.centrale -----GTGTAGGTTGGAAGT-----CAGCTTGGTTAGAATCTGTACA
                *.:*:*  . . . . . * : * :. : ** .:

Barinas     CTCAAAGTG--AGGCCAGTACATCGTCTCAATTAGGGACTGATTGGCGGCAAGAGATGC
Canada     CTCAAAGTGGTCAGGCCAGTACATCGTCTCAATTAGGAGCTGATTGGCGGCAAGAGGTGC
Lara       CTCAAAGTGG--TGCCAGTACATCGTCTCAATTAGGAGCTGATTGGCGGCAAGAGGTGC
Tachira    CTCAAAGTGGTCAGGCCAGTACATCGTCTCAATTAGGGACTAATTGGTGGCCAGAGATGC
Canadal    CTCAAAGTGATCAGGCCAGTACATCGTCTCAATTATGGACTGATTGGCGGCTAGAGATGC
Brasil     CTCAAAGTGATCAGGCCAGTACATCGTCTCAATTAGGAGCTGATAG-----
Mexico     CTCAAAGTGATCAGGCCAGTACATCGTCTCAATTAGGGACTGATAG-----
Florida    CTCAAAGTGATCAGGCCAGTACATCGTCTCAATTAGGAGCTGATAG-----
Oklahoma   TTTTGGCTGCTCGTGCCCTTATTTCTGTAGGGGTCTATGCTGCTCAG-----
Maries     TGTTGGCTGCTCGTGCCCTTATTTCTGTAGGGGTCTATGCTGCTCAG-----
Washinton  CTCAAAGTGGTCAGGCCAGTACATCGTCTCAATTAGGGACTGATTGGCGGCAAGAGATGC
A.ovis     TGTTGGCTGCTCGTGCCCTTATTTCTGTAGGGGTCTATGCTGCTCAG-----
Ovis       TGGATGCTGCTCGTCCATCATAGCTGTAGGGATTTATGCTGCACAG-----
A.centrale G-TGTGCTGCACCTGACTGTTGGTCATTAGG-TATGGTGTAAACGT-----
                . **      . * : * : . : . . * . : .

```

Figura 5. Alineamiento de la región central del gen *msp1a* de *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis*.

```

Barinas -----
Canada -----
Lara -----
Tachira -----
Canada1 -----
Brasil -----
Mexico -----
Florida -----
Oklahoma -----
Marles -----
Washington -----
A.ovis -----
Ovis -----
A.centrale -----
ATGCGGCTGACAAGTTC CGTGTGATGATGTTTGGTGGTGCTCCTGCGG-----GGCAAG

Barinas -----
Canada -----
Lara -----
Tachira -----
Canada1 -----
Brasil -----
Mexico -----
Florida -----
Oklahoma -----
Marles -----
Washington -----
A.ovis -----
Ovis -----
A.centrale -----
AGAAAACTGCCGAACCTGAGCATGAGGCTGCGACCCCGTCAGCTAGTAGCGTTCCGTCAA
-----TACATCGTCTCAATTAGGAGCTGATAGCTCGTCAGCGAGTG-----GTGAG
TTTGGGTTCCATGGCTGAGTCAGACACTAGATTACAGTGATTGGAGAGCGGTGCTGCAT
-----TACATCGTCTCAATTAGGAGCTGATAGCTCGTCAGCGGGTGGTCAGCAGCAAG
AGAAAACTGCCGAACCTGAGCATGAGGCTGCGACCCCGTCAGCTAGTAGCGTTCCGTCAA
AGAAAACTGCCGAACCTGAGCATGAGGCTGCGACCCCGTCAGCTAGTAGCGTTCCGTCAA
AGGAGACCATAGAGCTTGATCGCGGGACTGGGGCTCCGTGAGTTGATAGCTTTACTTCTG
-----TACGTCCA

```

Figura 6. Alineamiento de la región 3' del gen *msp1a* de *A. margina*, *A. centrale* y *A. ovis*.

Finalmente, este tipo de análisis *in silico* resulta ser una poderosa herramienta para la selección de secuencias diana, diseño y análisis de cebadores y ejecución de ensayos de PCR virtuales, que permitan predecir en gran medida el comportamiento de los ensayos *in vivo*, lo que resulta en ahorro de tiempo y recursos económicos, ya que se estandarizan las condiciones *in silico*, para luego ser probadas *in vivo* en el laboratorio y en el campo.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. La secuencia idónea para el diagnóstico por PCR de *A. marginale*, que resulta ser más sensible y específica, encontrada en fuentes primarias disponibles, fue el gen *msp1 α* , ya que este gen solo se encuentra en *A. marginale*, y no ha demostrado identidad mayor del 50% con secuencias de otras especies.
2. Ya que el gen *msp1 α* es un gen de copia única con múltiples repeticiones en tándem, su amplificación permite el genotipado de diferentes cepas pertenecientes a la misma especie, ya que su función con el hospedador desde la interacción específica de este gen con la célula blanco de *A. marginale* y su vector, la capacidad de generar una respuesta inmunológica, le dan importancia relevante de especificidad.
3. El gen *ADNr16S*, que tradicionalmente se utiliza para la identificación molecular de bacterias, presenta una identidad de hasta 98% con secuencias de otras especies de *Anaplasma*, tales como *A. centrale*, *A. phagocytophilm*, *A. bovis* y *A. platy*, lo que amerita la utilización de otras técnicas especializadas y costosas para la identificación específica de especie de miembros del género *Anaplasma*.
4. Los genes *msp1 β* , si bien han permitido la identificación de *A. marginale*, no se han llevado a cabo estudios de campo a gran escala, puede presentar variabilidad del gen entre cepas, y presenta pseudogenes de función desconocida que pueden dificultar el diagnóstico. El gen *msp5*, ampliamente usado en el diagnóstico por ser un gen de copia única y generar una importante respuesta inmune, genera falsos positivos ya que se encuentra muy

conservado en otras especies. El gen *mSP4* se encuentra altamente conservado en otras especies de *Anaplasma*, siendo ineficiente en la detección específica de *A. marginale*.

5. De los cinco pares de cebadores específicos para el gen *mSP1 α* , encontrados en la literatura para la identificación y diagnóstico de *A. marginale*, son los de Kovalchuk *et al.* (2019) los que han resultado de gran utilidad para la identificación de *A. marginale*, ya que de acuerdo a los resultados del análisis con Primer Blast, fueron los que mostraron coincidencia de hibridación con la mayor cantidad de cepas (58 secuencias codificantes) encontradas en la base de datos *nr*, siendo el 100% de los alineamientos con secuencias del gen para *mSP1 α* de *A. marginale*.
6. Los cebadores de Kovalchuk *et al.* (2019) presentan temperaturas de alineamiento y %GC similares entre ambos cebadores, las cuales se encuentran dentro de los rangos recomendados para el diseño de cebadores, y con baja autocomplementariedad.
7. Los cebadores diseñados por Kovalchuk *et al.* (2019) produjeron un amplicón putativo de 207 pb con varias de las secuencias del gen *mSP1 α* de *A. marginale* usadas como templado, sin resultados positivos se usaron secuencias parciales del gen *mSP1 α* de secuencias de Barinas, Lara y Táchira, de *A. centrale* y *A. ovis*.
8. La especificidad y eficiencia de los cebadores diseñados por Kovalchuk *et al.* (2019) para el gen *mSP1 α* de *A. marginale* se debe a que amplifican la región 3' de dicho gen, suficientemente conservada entre cepas de *A. marginale*, pero diferente entre especies del género *Anaplasma*.
9. No se obtienen productos de PCR con ninguno de los pares de cebadores analizados en este estudio cuando se usan como templado secuencias parciales del gen *mSP1 α* de *A. marginale* obtenidas de cepas de Táchira, Lara y Barinas,

debido a que estas secuencias no se encuentran completas y carecen de la diana para la que fueron diseñadas los cebadores.

10. El análisis computacional de cebadores y posibles productos de PCR son una herramienta que permite realizar predicciones y mejoras en los experimentos de PCR, ahorrando tiempo y recursos antes de ser aplicados *in vivo* en el laboratorio.

Recomendaciones

1. Realizar estudios a nivel de campo, especialmente para determinar la capacidad diagnóstica de los cebadores más idóneos encontrados en el análisis *in silico* de este trabajo.
2. Profundizar en estudios de alineamientos de secuencias del gen *mspl α* de *A. marginale*, ya que el mismo es un posible blanco para ser usado en un kit de diagnóstico específico para esta especie.
3. Apoyar el aislamiento y obtención de secuencias de genomas completos, así como del gen *mspl α* , de cepas de *A. marginale* provenientes de regiones endémicas de Venezuela, que permitan conocer la diversidad genética y la secuencia de las regiones más conservadas entre las diferentes cepas.
4. Implementar como medida de control en cada establecimiento o finca ganadera, la realización de pruebas moleculares específicas de especie, antes de la movilización de animales.

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Abollo, E. y Villalba, A. (2015). Diagnóstico molecular y epidemiología de enfermedades relevantes de moluscos bivalvos. *Revista AquaTIC* 45.
- Aktas, M. Y Ozubek, S. (2019). Genetic diversity of major surface protein 1 α of *Anaplasma marginale* in dairy cattle. *Rev. Infection, Genetics and Evolution* 1348(20): 30439-1 <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104608>.
- Allemans, R.; Kamper, S.; Viseshakul, N.; y Barbet, A. (1993). Analysis of the *Anaplasma marginale* genome by pulsed-field electrophoresis. *Journal of General Microbiology* 139, 2439-2444
- Andrade, S.; Chacón, K.; y Rivera, B. (2016). Enfermedades transmitidas por vectores y cambio climático. (Trabajo de pregrado). Universidad Autónoma de Aguas calientes, México.
- Aubry, P.; y Geale, D.W. (2011). A Review of Bovine Anaplasmosis: Review of Bovine Anaplasmosis. *Transboundary and Emerging Diseases* 58(1), 1-30. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173>.
- Barbet, A.; y Allred R.D. (1991). The *mspL* Multigene Family of *Anaplasma marginale*: Nucleotide Sequence Analysis of an Expressed Copy. *Infection And Immunity*, 971-976.
- Baca, R. (2020) Prevalencia de hemoparásitos y alteraciones hematológicas en bovinos de las fincas “Los Cerritos y Jiñocuabo” León, Municipio la Reynaga, enero-marzo, 2020. (trabajo de pregrado). Universidad Nacional Agraria (UNA)
- Baltes, N.J.; Voytas, D.F. (2015). Enabling plant synthetic biology through genome engineering. *Trends in biotechnology* 33(2): 120-31. [returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fhttp://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799\(14\)00237-](http://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799(14)00237-)
- Bello, R.; y Eleizalde, M. (2014). Mecanismos de Variación Antigenica en *Anaplasma marginale*. *Rev. Fac. Cs. Vets.UCV* 55(2):112-123.
- Bello, A.R.; Cloeckert,A.; Vizcai, N.; Gonzatti,M.I.; Aso,P.M.; Dubray,G.; y Zygmunt, M.S. (1998). Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5 for Serological Diagnosis of Bovine Anaplasmosis in Venezuela. *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology* 5(2): 259–262.
- Benavides, O.; Polanco, P.; Vizcaino, G.; Betancur, H.; (2013). Criterios y protocolo para el diagnóstico de hemoparásitos en bovinos. *Revista Ciencia Animal*. Bogota, CO. (En línea). <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-carne/sanidad/articulos/criterios-protocolos-diagnostico-hemoparasitos-t5112/165-p0.htm>
- Bolívar, A.M. (2014). LP. RCP y RCP-Múltiple : parámetros críticos y protocolo de estandarización (RCP and RCP-Multiplex:critical parameters and standardization protocol). *Avan Biomed* 3(1):25-33.

- Bolívar, A.M. (2013). Metodología diagnóstica para hemoparásitos dentro de la ganadería bovina con énfasis en la reacción en cadena de la polimerasa y su variante múltiple. *Rev. Salud Anim*, 35 (1), 1-9.
- Brayton, K. A.; Kappmeyer, L. S.; Herndon, D.R.; Dark, M.J.; Tibbals, D.L.; Palmer, G.H.; y Knowles, D.P. (2005). Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(3), 844-849. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406656102>
- Cabezas-Cruz, A.; Passos, M.F.; Lis, K.; Kenneil, R.; y Valde's, J.J. (2013) Relevancia funcional e inmunológica de la secuencia y análisis estructural de la proteína de superficie principal 1α de *Anaplasma marginale*. *PLoS ONE* 8(6): e65243. doi:10.1371/journal.pone.0065243
- Castro, C.J.; Maddox, D.; Segundo, S.L.; Rodríguez, H.N.; Casuso M. Z.; Paredes, J.D.; y Cobo, M.(2019). Caracterización *In Silico* y análisis de La Expresión se la subunidad alfa De la acetil-coenzima A Carboxilasa Heteromérica De Dos Microalgas. *Acta Biológica Colombiana*24 (2); 275-290
- Cammilli, A.; Reyna-Bello, A.; Caballero, H. (2001). Respuesta inmune contra la MSP-5 en bovinos durante una infección experimental y en animales crónicamente infectados con *Anaplasma marginale*. In *Memorias, LI Convención Anual, Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia. (ASOVAC)*. San Cristóbal, Estado Táchira, Venezuela.
- Carrillo, A. (2017) Detección microbiológica y molecular de *Anaplasma spp* en ganado bovino del Municipio de Ovejas, Sucre-Colombia. (Trabajo de pregrado). Universidad de Sucre, Colombia.
- Corona, B.; Rodríguez, M.; Martínez S. (2004). *Anaplasmosis bovina*. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET* ISSN 1695-7504. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/636/63612647010.pdf>
- Cortés-vecino, J.A. (2011). Garrapatas : estado actual y perspectivas. *Biomedica*, 31, 3- 315.
- Corona-González, B.; Obregón, D.; AlemánI, Y.; AlfonsoI, P.; VegaI, E.; Díaz, A.; y Martínez, S. (2014). Tendencias en el diagnóstico de la anaplasmosis bovina. *Rev. Salud Anim* 36 (2): 73-79.
- de Almeida, L.P.; Ndao, M.; Van Meirvenne, N.; y Geerts, S. (1997). Diagnostic evaluation of PCR in goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *ActaTrópica* 66(1):45-50.
- de la Fuente, J.D.; Ruybal, P.; Mbatí, P.A.; Mtshali, M.S.; Shkap, V.; Mohale N.E.; Moloi T.P.; Spickett A.M.; Latif, A.A.; Kocan, K.M.; y Vicente, J. (2006). Prevalence and Genetic Diversity of *Anaplasma marginale* Strains in Cattle in South Africa. *Zoonosis Public Health* 54, 23–30.
- de la Fuente, J.; Passos, M.F.; Van Den Bussche, R.A.; Ribeiro, F.B.; Facury-Filho, E.J.; y Kocan, K.M. (2004). Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology* 121, 307–316.

- de la Fuente, J.; Ruybal P.; Mtshali, M.; Naranjo V.; Shuqing, L.; Mangold, A.J.; Rodriguez, S.; Jimenez, R.; Vicente, J.; Moretta R.; Torina, A.; Almaza, C.; Mbat, P.M.; Torioni, S.; Farber, M.; Rosario-Cruz, R.; Gortazar, C.; y Kocan, K. Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. *Veterinary Microbiology* 119, 382–390.
- de la Fuente, J., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., Rodríguez, S.D., Garcia, M.A., y Kocan, K.M. (2001). Evolution and function of tandem repeats in the major surface protein 1a of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Anim. Health Res. Rev.* 2, 163–173.
- Decaro, N.; Carelli, G.; Lorusso, E.; Lucente, M.E.; Greco, G.; Lorusso, A.; Radogna, A.; Ceci, L.; y Buonavoglia, C. (2008). Duplex Real-Time Polymerase Chain Reaction for Simultaneous detection and Quantification of *Anaplasma Marginale* and *Anaplasma Centrale*. *J Vet Diagn Invest* 20, 606–611.
- Desquesnes, M. (1997). Evaluation of simple PCR technique for the diagnosis of *Trypanosoma vivax* infection in the serum of cattle in comparison to parasitological techniques and antigen-enzyme-linked immunosorbent assay. *Acta Trop* 65:139-148.
- Dumler, J.S.; Barbet, A. F.; Bekker, P. J.; Dasch, G. A.; Palmer, G. H.; Ray, S. C.; y Rurangirwa, F. R. (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales : unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichiaequi* and ‘ HGE agent ’ as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 2145–2165.
- Dumler, J.S. (2017). Guidelines for the Direct Detection of *Anaplasma spp.* in Diagnosis and Epidemiological Studies. *Vector-Borne And Zoonotic Diseases* 17 (1): 12-22.
- Ferreira, J.; y Juan C. Martinez. (2017). Antígenos subdominantes de *Anaplasma marginale*: nuevo candidatos vacunales contra la anaplasmosis bovina. *Rev. Fac. Cs vets UCV* 58(1): 34-44.
- Figuroa, J.V.; Chieves, L.P.; Johnso, G.S.; Buening G.M. (1993). Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Veterinary Parasitology* 50: 69-81.
- García, M.A. (2018). Prevalencia de Hemoparasitosis en novillos de engorde en la finca Santa Lastenia Malacatoya, Granada, septiembre 2017-mayo 2018. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria Managua, Nicaragua. <https://repositorio.una.edu.ni/3787/1/tnl73g216p.pdf>.
- Gioia, G.V.; Vinueza, R.L.; Marsot, M.; Devillers.; Cruz, M.; Petit, E.; Boulouis, H.J.; Moutailler, S.; Monroy, F.; Coello, M.A., Gondard, M., Bournez, L.; Haddad.; y Zanella, G. (2018). Bovine anaplasmosis and tick-borne pathogens in cattle of the Galapagos Islands. *Rev. Transbound Emerg Dis*: 1–10.

- Gonzales, J.L. (2003). Evaluation of a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of bovine Trypanosomiasis and epidemiological surveillance in Bolivia. *BioMed central* 2: 1-8
- Hernandez, M.; y Osorio, L. (2008). Frecuencia de hemoparásitos en bovinos del bajo Cauca y alto San Jorge. 2000 -2005. *Revista MVZ-Cordoba* 3(3):1486-1494.
- Herrera, M.; Soto, A.; Urrego, V.; Rivera, G.; Zapata, M.; y Ríos, L. (2008). Frecuencia de hemoparásitos en bovinos del bajo cauca y alto san Jorge, 2000-2005. *Rev. Medicina Veterinaria y Zootecnia Córdoba* 13(3): 1486-1494.
- Junsiri, W.; Watthanadirek, A.; Poolsawat, N.; Minsakorn, S.; Nooroong, P.; Jittapalpong, S.; Chawengkirtikul, R.; y Anuracpreeda, P. (2021). Caracterización molecular de *Anaplasma marginale* basada en los genes *msp1 α* y *msp1 β* . *Veterinary Microbiology* S0378-1135(21): 00259-5.
- Kocan, K.M.; De la Fuente J.; Blouin, E.F.; y Garcia-Garcia, J.C. (2004). *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology* 129: 285–300.
- Kocan, K.M.; De la Fuente, J.; Blouin E.F.; Johann, F., y Ewing, S.A. (2010). La historia natural de *Anaplasma marginale*. *Parasitología Veterinaria* 167 (2010) 95–107.
- Kocan, K.M.; de la Fuente, J.; Step, L.D.; Blouin, F.E.; Coetzee, J.F.; Simpson, K.M.; Genova, S.G.; y Boileau, M.J. Current Challenges of the Management and Epidemiology of Bovine Anaplasmosis. *The Bovine Practitioner* 44 (2).
- Kocan, K.M.; De la Fuente, J.; y Cabezas-Cruz, A. (2017) El género *Anaplasma*: nuevos retos tras la reclasificación. *Rev. Sci. tecnología* 34 (2): 577-586.
- Kovalchuk, S.N.; Babii, A.V.; y Arkhipova, A.L. (2019). Real-time PCR assay with an endogenous internal amplification control for detection and quantification of *Anaplasma marginale* in bovine blood. *Ticks and Tick-borne Diseases* 1877-959(19): 30263-8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101334>.
- Kuttler, K.L. (1984). Anaplasma infections in wild and domestic ruminants: A Review *Journal of Wildlife Diseases* 20(1): 12-20. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-20.1.12>.
- Lew, A.E.; Bockb, R.E.; Minchina, C.M.; y Masakac, S. (2002). Ensayo de reacción en cadena de la polimerasa de *msp1 α* para la detección y diferenciación específicas de aislamientos de *Anaplasma marginale*. *Microbiología veterinaria* 86, 325–335.
- Li, k. y Brownley, A. (2010). Primers Diseño para RT-PCR. *Rev. Protocolos de PCR, métodos en biología molecular.* 2 (630).
- Marques, L. (2006). Estandarización de la técnica de PCR para el diagnóstico de la Anaplasmosis bovina y ovina. *Revista Agronomía Tropical.* *Agronomía Trop* 56 (4).
- Medina, V.; Armando, R.B.; Marqués, T.L.; y Campos, A.M. (2017). Diagnóstico de los hemotrópicos *Anaplasma marginale*, *Trypanosomaspp* y *Babesiaspp*. Mediante técnicas de Elisa y PCR en tres fincas ganaderas de la provincia de Pastaza, Ecuador. *Revista científica FCV-LUZ* 27 (3): 162-171.

- Morlais, I.; Ravel, S.; Grébaud, P.; Dumas, V. y Cuny G. (2001). New molecular marker for *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* identification. *Acta Trop.* 80(3), 207-13.
- Mustapha, D., Davoust, B., Benterki, M.; Fenollar, F.; Raoult, D.; y Mediannikova, O. (2015). Development of a new PCR-based assay to detect Anaplasmataceae and the first report of *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma platys* in cattle from Algeria. *Rev. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 39 (2015): 39–45.
- Nieves, L. (2018). Detección molecular de *Anaplasma SP* en ovinos del Municipio Montelíbano Departamento de Córdoba-Colombia. (Trabajo de pregrado). Universidad Nacional de Colombia.
- Noaman, V.; y Shayan, P. (2010). Comparison of Microscopy and PCR-RFLP for detection of *Anaplasma marginale* in carrier cattle. *Rev. Iranian Journal microbiology* 2(2): 89-94
- Organismo de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2011). Ganadería y Deforestación. Subdirección de Información Ganadera y de Análisis y Política del Sector. Dirección de Producción y Sanidad Animal. Boletín Políticas Pecuarias. Recuperado de <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a0262s/a0262s00.pdf>.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2004). Manual de las Pruebas de Diagnóstico de las vacunas para animales terrestres. Quinta edición, Primera Edición en español. Capítulo 2.5.15. Tripanosomiasis (*Tripanosoma evansi*).31. Recuperado de http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.5.15_Tripanosomosis.pdf
- Palmer, G. H.; Barbet, A. F.; Kuttler, K. L.; y Mcguire, T. C. (1986). Detection of an *Anaplasma marginale*. Common Surface Protein Present in All Stages of Infection. 23 (6).
- Palmer, G.H.; Rodríguez, J.L.; Knowles, D.; y Brayton, K.A. (2005). Distinctly different msp2 pseudogene repertoires in *Anaplasma marginale* strains that are capable of superinfection. *Gene* 361:127–132.
- Parodi, P.; Corbellini, L.G.; Leotti, B.V.; Rivero, R.; Miraballes, C.; Riet-Correa, F.; Venzal, J.M.; y Armúa-Fernández, M.T. (2020). Validation of a multiplex PCR assay to detect *Babesia* spp. and *Anaplasma marginale* in cattle in Uruguay in the absence of a gold standard test. *Rev. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1–7.
- Pohl, A.E.; Cabezas, C.A.; Ribeiro, P.; Silveira, J.A.; Silaghi, C.; Pfister; y Passos, M.L. (2013). Detection of genetic diversity of *Anaplasma marginale* isolates in Minas Gerais, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal* 22 (1): 129-135.
- Prescott, L.M., y Harley, J.P. (1999), Microbiología cuarta edición, Editorial MacGraw Hill Madrid España. pp. 320-344.
- Raies, A.B.; y Bajic, V.B.; (2016). *In silico* toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. *Wiley Interdisciplinary Reviews:*

- Computational Molecular Science [Internet]. Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wcms.1240/full>.
- Ramiro-Muñoz, T.G.; Obregón-Alvarez, D.; Díaz-Sánchez, A.A.; Cabezas-Cruz, A.; Zamora-Gutiérrez, L.; Martínez Marrero, S.; y Corona-González, B. (2020). Epidemiology and genetic diversity of *Anaplasma marginale* in Zamora-Chinchipe, Ecuador. Ticks and Tick-borne Diseases.
- Riveroll, F. (2022) Diseño de Primer para PCR. Recuperado de <https://friveroll.github.io/posts/dise%C3%B1o-de-primers-para-pcr/>
- Rodicio, M.; y Mendoza, C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22(4):238-45
- Rodríguez, M. (2004). Utilización de técnicas genéticas (PCR y PCR cuantitativo en tiempo real) e inmunológicas (ELISA), para la detección y cuantificación de diferentes especies animales e FOIE GRAS. (Trabajo de pregrado). Universidad Complutense e Madris, Madrid.
- Rodríguez, R. (2018). Anàlisis *In Silico* de las viabilidad de la mutación de sistemas biológicos. *Revista de Ciencias médicas de Pinar del Rio* 22 (4).
- Rodríguez, S. (2003) Inmunología e inmunoprofilaxis de la anaplasmosis bovina. *Rev. Ciencias Veterinarias* 9(4).
- Sala, J. (2013). Transmisión Transplacentaria de *Anaplasma marginale* en bovinos nativos del noreste argentino. (Trabajo de pre-grado). Universidad Nacional del Litoral de Argentina.
- Seixas, A.; Joazeiro, A.C.; Martins, J.; Masuda, A.; Da Silva Vaz, J. (2015). A PCR for Differentiate between *Anaplasma marginale* and *A. central*. *Rev. Acta Scientiae Veterinariae* 43 (1270): 1679-9216.
- Soto, K. (2010). Determinación de la prevalencia de anaplasmosis en el ganado bovino faenando en la empresa metropolitana de rastro de quito (EMRQ) mediante la aplicación de las técnicas de diagnóstico: microscopia de frotis sanguíneos, reacción en cadena de la polimerasa y ensayo inmunoenzimatico competitivo. (Trabajo de maestria) Escuela politécnica del ejército, Sangoquil, Ecuador.
- Stich, R.; Bantle, J.A.; Kocan, K.M.; y Fekete, A. (1993). Detection of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Hemolymph of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) with the Polymerase Chain Reaction. *Rev. J. Med. Entomol* 30(4): 781-788.
- Stackebrandt, E.; y Goebel, B.M. (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44 (846): 9
- Suarez, *et al.* (2009). Factores de riesgo a la Tripanosomosis bovina en explotaciones ganadera de Venezuela. *Zootecnia Trop* 27(4): 363 – 372.
- Sukhumsirichart, W.; Uthaisang-Tanechpongamb, W.; y Chansiri, K. (1999). Detección de Infección por Hemoparásitos Bovinos Utilizando Multiplex Reacción en cadena de la polimerasa. *ScienceAsia* 25, 85-90.

- Tamasaukas, R.; Agudo, L.; Silva, A.; Florio, J.; Vintimilla, M.; y Rivera, S. (2010). Hemoparasitosis en ganadería doble propósito venezolana, diagnóstico y control: una revisión. *Revista Agronomía Mesoamericana*. Agron. Mesoam 21(2).
- Tamasauska, R.; y Rivera, S. (2010). Hemoparásitos en ganadería doble propósito venezolana, diagnóstico y control: una revisión. *Rev. Agronomía Mesoamericana* 21(2): 367-381.
- Tana, H.L.; Navarrete, A.K.; Román, R. R.; Reyna, B.A.; y Chavez, L.M. (2017). PCR-diagnóstico de *Anaplasma marginale* en poblaciones bovinas del Ecuador y su identificación molecular mediante secuenciación de fragmentos ribosomales 16S. *Rev. Investigación veterinaria de BMC* 13(392).
- Tananyutthawongse, C. (1999). Detección de la infección por hemoparásitos bovinos. Uso de la reacción en cadena de la polimerasa multiplex. *Science Asia* 25 (1999): 85-90
- Torioni, E.S.; 1 Donald, P.K.; Travis, C.M.; Mcguire, G. H.; Palmer, G.H.; Suarez, E.; y Mcelwain, T.F. (1998). Detección de ganado naturalmente infectado con *Anaplasma marginale* en una región de endemicidad por PCR anidada y una competencia ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas utilizando proteína de superficie principal recombinante 5. *Revista De Microbiología Clínica* 36 (3): 777-782.
- Ye, J.; Coulouris, G.; Zaretskaya, I.; Cutcutache, I.; Rozen, S.; y Madden, T. (2012). Primer-BLAST: una herramienta para diseñar cebadores específicos para la reacción en cadena de la polimerasa. *BMC Bioinformática* 13(134). doi:10.1186/1471-2105-13-134
- Yousefi, A.; Rahbari, S.; Shayan, P.; Sadeghi-dehkordi, Z.; y Bahonar, A. (2017). Molecular detection of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma ovis* in sheep and goat in west highland pasture of Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 7(5), 455-459. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.017>.
- Watson, J.D.; Gilman, M.; Witkowski, J.; y Zoller, M. (1992). The polymerase chain reaction. En: *Recombinant DNA*, 2ª ed. Scientific American Books (Ed.), EE.UU., 79-95.
- World Organisation for Animal Health. (2015). Anaplasmosis Bovina. Manual Terrestre de la OIE. Recuperado de https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.01_Anaplasmosis_bovina.pdf
- Zazueta, A. (2015). Caracterización genética de los genes de la membrana externa del sistema de secreción tipo IV de *Anaplasma marginale* (Trabajo de pregrado). Universidad Autónoma De Sinaloa, Mexico.

www.bdigital.ula.ve