

Revista de la Sociedad Mexicana de  
**Biotechnología**  
y Bioingeniería A.C.

Año 2023 Volumen 27, Número 1  
ISSN 0188-4786



Sociedad Mexicana de  
Biotechnología y Bioingeniería



Revista de la Sociedad Mexicana de  
**Biotecnología**  
y Bioingeniería A.C.

---

**MESA DIRECTIVA**

2022 – 2024

Dra. Romina Rodríguez Sanoja  
**Presidenta**

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera  
**Vicepresidente**

Dra. Beatriz Ruiz Villafán  
**Secretaria**

Dra. María Dolores Reyes Duarte  
**Tesorero**

Dr. Manuel Alejandro Lizardi Jiménez  
**Subsecretario**

M. en C. Karina Adames Beas  
**Vocal Profesional**

Biol. Teresa Elizabeth Mtz Oropeza  
**Vocal Estudiante**

**EDITORA**

Dra. María Soledad Córdova Aguilar  
UNAM

**Co-editor**

Dr. Jorge Gracida  
UAQ

**COMITÉ EDITORIAL**

Dra. Yazmín Alcalá Canto  
Departamento de Parasitología.  
FMVZ-UNAM

Dr. Víctor Hugo del Río Araiza  
Departamento de Parasitología.  
FMVZ-UNAM

Dra. Nidia Maribel León Sicairos  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Sinaloa

Dr. Antonio Verdugo-Rodríguez  
Laboratorio Microbiología Molecular  
FMVZ-UNAM

**Formación y edición**

Pas. QA Mariana Espinoza Tapia

ISSN 0188-4786, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. incluida en PERIÓDICA, índice de Revista Latinoamericanas en Ciencias (CICH-UNAM), en LATINDEX (Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal), los artículos se encuentran en Google Académico. Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título 04-1999-082516265000-101. Los conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México. o a la siguiente dirección electrónica [revista\\_biotecnologia@smbb.mx](mailto:revista_biotecnologia@smbb.mx).

# Índice

Instrucciones para los autores 4

Editorial 8

## Artículos

**Structural analysis and determination of the expression of Microplusin from *Rhipicephalus microplus* during a challenge with pathogenic bacteria**

Hugo Aguilar-Díaz, Raquel Cossío-Bayúgar, Rosa Estela Quiroz-Castañeda, Estefan Miranda-Miranda, Rodolfo Lagunes-Quintanilla, Juan Alberto Ramos Aragón 10

**Genomic analysis of Mexican strains of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale*: an application for the development of a species-specific molecular detection test**

Alejandra Isabel González-Cruz, Rosa Estela Quiroz-Castañeda, Elizabeth Salinas Estrella, Hugo Aguilar-Díaz, Jesús Francisco Preciado - de la Torre 19

**Desarrollo de un sistema diagnóstico de un ELISA indirecto con la proteína recombinante hemaglutinina neuraminidasa del virus de la Enfermedad del Ojo Azul en cerdos**

Julieta Sandra Cuevas Romero, José Luis Cerriteño Sánchez 28

**Importancia del diagnóstico molecular en las enfermedades que afectan a las abejas melíferas**

Marisela Leal-Hernández, Karla Itzel Alcalá Escamilla, Fernando Cerón Téllez 40

# Instrucciones para los autores

## Guía de Autores

La revista puede recibir trabajos de investigación original, así como de revisión en los campos de la Biotecnología y Bioingeniería. Todos los manuscritos serán sujetos a revisión por al menos dos miembros del Comité Editorial y deberán contar con una recomendación de aceptación para ser publicados.

Los idiomas en los que se puede publicar en la revista son el español y el inglés.

Los trabajos se escribirán en hoja tamaño carta (21.6 cm x 27.6 cm). Los márgenes aplicados a todo el manuscrito serán de 2.5 cm para los extremos superior e inferior, así como 3 cm de cada lado. Las páginas deberán estar numeradas en la parte inferior y central de cada hoja.

Para evitar errores innecesarios se recomienda usar el corrector de gramática y ortografía del procesador de palabras. Se recomienda que los trabajos completos tengan un máximo de 25 páginas, escritas con un interlineado de 1.5 renglones, incluyendo las tablas y figuras. Las publicaciones en la revista Biotecnología están exentas de costo para los autores.

Cuando corresponda, se recomienda el uso de abreviaturas para referirse a unidades de tiempo (h, min, s), de volumen (l, ml,  $\mu$ l), de peso (kg, g, mg,  $\mu$ g), ADN, ARN y otras comúnmente aceptadas en la literatura científica.

Los trabajos de investigación original pueden tocar cualquiera de los diversos campos que cultivan la biotecnología y la bioingeniería, desde aspectos fundamentales hasta sus aplicaciones, incluyendo: Enzimas y Biocatálisis, Microbiología, Biotecnología Agrícola y Vegetal, Biotecnología Marina, Alimentos y bebidas, Biotecnología farmacéutica, Biotecnología Ambiental, Bioingeniería y fermentaciones, Bioenergía y biocombustibles, Biología de sistemas y bioinformática, Biología sintética, Nanobiotecnología y biomateriales, Ingeniería metabólica, Omicas, Bioseguridad y Bioética.

Tanto los trabajos de investigación original como las revisiones deberán apegarse al siguiente formato:

1. El título del manuscrito se escribirá en negritas con letra Arial o equivalente tamaño 14. El título deberá estar centrado y ser conciso e informativo. Evite el uso de abreviaciones y fórmulas.

# Instrucciones para los autores

2. El nombre de los autores ocupará los siguientes renglones escribiendo el nombre y primer apellido de cada participante. Se usará letra Arial o equivalente tamaño 12. Los nombres de los participantes deberán estar centrados, señalando con un asterisco el autor responsable de la publicación. En el siguiente renglón con letra itálica Arial del mismo tamaño, se incluirá la dirección postal de la institución de adscripción de los autores, así como la dirección de correo del autor corresponsal. Si el responsable fuera un estudiante, deberá incluir una carta del tutor o director del trabajo autorizándolo.
3. Se deberá añadir un Resumen de no más de 250 palabras en español y el correspondiente Abstract en inglés.
4. Se incluirán entre 3 a 6 Palabras clave: que permitan clasificar el artículo en una base de datos. Estas palabras deberán de incluirse en español y en inglés (Key words).
5. Si el texto inicia con el nombre de algún subtema, éste de pondrá como primera línea en cursivas con letra Arial o equivalente tamaño 10. Después en el siguiente renglón se iniciará el texto descriptivo usando letra Arial o equivalente tamaño 10. El texto deberá ser escrito con un interlineado de 1.5 renglones. Se deberá dejar un espacio de un renglón al inicio de una sección o subtema nuevo. Los géneros y especies deberán escribirse en letras itálicas.
6. Las figuras deberán numerarse con arábigos, correlativamente en orden de aparición en el texto. No se integrarán al texto, sino al final del manuscrito. No obstante, para facilitar el trabajo de edición, se recomienda indicar la ubicación de las mismas en el momento en que son mencionadas por primera vez en el texto. Las figuras deben incluir un breve título explicativo en la parte inferior de la misma. Si es necesario incluir fotos, éstas se deberán designar como figuras.
7. Las tablas también se numerarán con arábigos ubicados en la parte superior de las mismas e incluirán un breve título explicativo. Las notas en las tablas deberán ser indicadas con letras minúsculas en superíndice. La ubicación de las tablas será señalada en el texto, pero se anexarán en hojas separadas y al igual que las figuras, al final del manuscrito.
8. La información dada como referencias bibliográficas deberá permitir a los lectores llegar con facilidad a la fuente de información original. En el texto del trabajo, las referencias se citan por autor y año entre paréntesis redondos. Por ejemplo: “Martínez & García (1999) han demostrado que...”, o bien, “Datos recientes (Martínez & García, 1999) han demostrado que...”. Si la cita posee varios autores se escribirá como sigue: “Gutiérrez et al. (2003), han demostrado...” O bien: “Datos recientes (Gutiérrez et al., 2003) han mostrado...”

# Instrucciones para los autores

Si la cita es una página de Internet, la dirección URL deberá escribirse completa y entre paréntesis directamente en el texto.

9. La lista de Referencias se deberá escribir con el mismo tipo de letra del texto principal (Arial tamaño 10) y con sangría francesa de acuerdo con el siguiente formato:

## Artículos:

Bayegan AH, Clote P (2020) RNAmountAlign: Efficient software for local, global, semiglobal pairwise and multiple RNA sequence/structure alignment. PLoS ONE 15(1): e0227177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227177>.

## Libros:

Ullrich M (2009) Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends. Horizon Scientific Press, Norwich.

## Capítulos de libros:

Sánchez S & Demain AL (2009) Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (EIB). Flickinger MC (ed). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. pp. 396-458.

## Patentes:

Fenical WH, Jensen PR & Kwon HC (2009) Polyol macrolide antitumor-antibiotics from the marine actinomycete strain CNQ140. US patent 7,521,414.

## Congresos y reuniones:

Reyes N, Domínguez RM, Islas I & Solis S (2007) Inducción diferencial por pH y temperatura del complejo pectinolítico producido por células inmovilizadas de *Aspergillus HL*. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia Mich. México. OIII-12.

# Instrucciones para los autores

Sitios en internet:

CAZY, Carbohydrate-Active Enzymes Database. (<http://www.cazy.org/>)

Tesis de pre y posgrado:

Cárdenas C (2009) Evaluación del uso biotecnológico de la semilla de *Ditaxis heterantha* para la producción de safranal. Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 1-78.

Cada autor es responsable de la precisión de las citas que emplea.

Una vez que ha sido revisado y aceptado su trabajo, los autores deberán enviar una carta de cesión de los Derechos de Autor, de manera que la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería pueda hacer uso del artículo aceptado, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica y tecnológica. En ningún caso, dichos derechos afectan la propiedad intelectual que es propia de los autores, para usar la totalidad o parte de ese artículo con fines no lucrativos.

Los trabajos se someten en línea en la página electrónica de la Sociedad Mexicana de Biotecnología, en la dirección <https://smbb.mx/publicaciones/publicacion-de-articulo/>. Al momento de recibirlo, se enviará un acuse de recibo al autor correspondiente. La dirección para mantener comunicación con el editor es: [revista\\_biotecnologia@smbb.mx](mailto:revista_biotecnologia@smbb.mx) y [marisol.cordova@icat.unam.mx](mailto:marisol.cordova@icat.unam.mx).

Una vez aceptados, los trabajos son editados y enviados a los autores para su corrección. En esta condición no se permitirán cambios sustanciales en el contenido de los mismos sin la aprobación del editor en jefe. Una vez aprobada la prueba, el trabajo se publicará en línea y podrá ser consultado en la página de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería AC <http://www.smbb.com.mx/>.



## **Biotecnología pecuaria: trazando el camino para mejorar la salud animal y alcanzar una agricultura sostenible**

La biotecnología pecuaria se ha convertido en una herramienta crucial para mejorar la salud y el bienestar animal, mejorando la seguridad alimentaria y apoyando el desarrollo de una agricultura sostenible. Los trabajos desarrollados para esta edición especial exploran el potencial de la biotecnología pecuaria en el manejo y diagnóstico de enfermedades y plagas que afectan al ganado, incluidas las garrapatas y las enfermedades que éstas transmiten, la bacteria intracelular del ganado bovino *Anaplasma* sp., el virus de la enfermedad del ojo azul en los cerdos o aquellas enfermedades que afectan a las abejas melíferas.

Con detalle los temas desarrollados son:

- Structural analysis and determination of the expression of Microplusin from *Rhipicephalus microplus* during a challenge with pathogenic bacteria. (Análisis estructural y determinación de la expresión de la Microplusina de *Rhipicephalus microplus* durante un desafío con bacterias patógenas).

*Rhipicephalus microplus*, comúnmente conocida como garrapata del ganado, representa una amenaza importante para el ganado debido a las enfermedades que transmite. El análisis estructural y la expresión de la Microplusina, una proteína producida por *R. microplus* para defenderse durante una infección bacteriana, puede proporcionar información crucial para el desarrollo de nuevos tratamientos contra la garrapata y entender como ésta se defiende de bacterias patógenas. Esta investigación sienta las bases para posibles intervenciones centradas en el control de la garrapata.

- Genomic analysis of Mexican strains of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale*: an application for the development of a species-specific molecular detection test. (Análisis genómico de cepas mexicanas de *Anaplasma marginale* y *Anaplasma centrale*: una aplicación para el desarrollo de una prueba de detección molecular específica de especie).

La anaplasmosis, causada por *Anaplasma marginale* en México y *Anaplasma centrale* en otras latitudes, provoca importantes pérdidas económicas en la industria ganadera. En este trabajo se describe el desarrollo de una prueba de detección molecular específica de cada especie para el diagnóstico precoz y el tratamiento eficaz de *Anaplasma*. Esta prueba permite identificar la especie *Anaplasma centrale*, especie exótica para nuestro país, y determinar si está presente en el ganado bovino y así tomar medidas de control adecuadas para evitar su diseminación.

# Editorial

- Development of a diagnostic system of an indirect ELISA with the recombinant protein hemagglutinin neuraminidase of the Blue Eye Disease virus in pigs. (Desarrollo de un sistema diagnóstico de un ELISA indirecto con la proteína recombinante hemaglutinina neuraminidasa del virus de la enfermedad del ojo Azul en cerdos).

La enfermedad del ojo azul, causada por un virus representa una amenaza para la salud y la producción porcina. El desarrollo de un sistema de diagnóstico indirecto mediante ELISA con la proteína recombinante hemaglutinina neuraminidasa permite una detección más rápida y precisa. Este avance no sólo ayuda a controlar la propagación de la enfermedad, sino que también permite a los agricultores tomar decisiones informadas sobre el tratamiento y la prevención.

- Importance of molecular diagnosis in diseases affecting honey bees. (Importancia del diagnóstico molecular en las enfermedades que afectan a las abejas melíferas)

Las poblaciones de abejas melíferas en todo el mundo enfrentan diversas amenazas, incluidas plagas, patógenos y desafíos ambientales. Las técnicas de diagnóstico molecular ofrecen un gran avance en la identificación y el manejo de enfermedades que afectan a las abejas melíferas. Al comprender los marcadores genéticos asociados con las enfermedades, los apicultores pueden tomar medidas oportunas y específicas para proteger y apoyar las colonias de abejas melíferas, promover la polinización y garantizar un ecosistema agrícola próspero. Se podría considerar al diagnóstico molecular como un punto de inflexión para la salud de las abejas melíferas y la producción apícola.

***Dra. Raquel Cossio Bayugar***  
*Presidente SMBB Delegación Morelos*  
[raquel.cossio@gmail.com](mailto:raquel.cossio@gmail.com)

## Structural analysis and determination of the expression of *Microplusin* from *Rhipicephalus microplus* during a challenge with pathogenic bacteria

Hugo Aguilar-Díaz<sup>1\*</sup>, Raquel Cossío-Bayúgar<sup>1</sup>, Rosa Estela Quiroz-Castañeda<sup>2</sup>, Estefan Miranda-Miranda<sup>1</sup>, Rodolfo Lagunes-Quintanilla<sup>1</sup>, Juan Alberto Ramos-Aragón<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Unidad de Artropodología, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP. Carr. Fed. Cuernavaca-Cuautla No. 8534, Jiutepec, Morelos, México, 62550.

<sup>2</sup>Unidad de Anaplasmosis, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP. Carr. Fed. Cuernavaca-Cuautla No. 8534, Jiutepec, Morelos, México, 62550.

<sup>3</sup>Unidad de Babesiosis, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP. Carr. Fed. Cuernavaca-Cuautla No. 8534, Jiutepec, Morelos, México, 62550.

Corresponding author: aguilar.hugo@inifap.gob.mx

### Resumen

En México, la garrapata *Rhipicephalus microplus* es la especie de mayor impacto económico y sanitario, debido a su gran capacidad expoliativa y vectorial para transmitir agentes infecciosos al ganado bovino como *Babesia* spp. y *Anaplasma marginale*. En este sentido, *R. microplus*, posee una amplia variedad de mecanismos inmunológicos de protección, incluyendo la producción de péptidos antimicrobianos (PAMs). Al momento, existen escasos reportes del papel del sistema inmune de *R. microplus*, ante la exposición con bacterias patógenas, ni mucho menos en la interacción patógeno-vector. Por lo anterior, este trabajo pretende caracterizar algunos de los mecanismos inmunológicos de *R. microplus* asociados a la expresión de PAMs, durante el reto con *Staphylococcus saprophyticus* y *Anaplasma marginale*, así como el análisis estructural de la *microplusina*. Nuestros resultados muestran la expresión diferencial de *microplusina* en presencia de hemolinfa de garrapatas infectadas con *S. saprophyticus*, y hemolinfa de garrapatas infectadas con *A. marginale*. Así mismo, se demostró la expresión basal del péptido antimicrobiano en hemolinfa de garrapatas sin infección. Adicionalmente, se encontró que la *microplusina* presenta una estructura molecular con 6 residuos de cisteínas conservados, similar al que contienen los PAMs pertenecientes a la familia de las defensinas. Estos hallazgos, corroboran la idea de la alta plasticidad que presenta la respuesta inmune de los artrópodos, dependiente del patógeno. El avance en el conocimiento de la biología de *R. microplus*, contribuye al descubrimiento de blancos, para el desarrollo de nuevos fármacos y/o vacunas para el control integrado de plagas.

**Palabras Claves:** *Rhipicephalus microplus*, Péptidos antimicrobianos, *Microplusina*, *Anaplasma marginale*

### Abstract

In Mexico, the *Rhipicephalus microplus* tick is the species with the most significant economic and health impact due to its great predatory and vectorial capacity to transmit infectious agents to cattle, such as *Babesia* spp. and *Anaplasma marginale*. In this regard, *R. microplus* has various immunological protection mechanisms, including the production of AMPs. At the moment, there are few reports on the role of the immune system of *R. microplus* to the pathogenic bacteria exposure, much less information exists about the pathogen-vector interaction. Therefore, this work aims to characterize some immunological mechanisms of *R. microplus* associated with the expression of AMPs during the challenge with *Staphylococcus saprophyticus* and *A. marginale*, as well as the structural analysis of *microplusin*. Our results show the differential expression of *microplusin* in the presence of hemolymph from ticks infected with *S. saprophyticus* and hemolymph from ticks infected with *A. marginale*. Likewise, the *microplusin* basal expression in the ticks' hemolymph without

infection was demonstrated. Additionally, it was found that *microplusin* has a molecular structure with six conserved cysteine residues, similar to that contained in AMPs belonging to the defensin family. These findings corroborate the idea of the high plasticity that the immune response of arthropods presents, depending on the pathogen. Advances in knowledge of the biology of *R. microplus* contribute to the discovery of targets for developing new drugs and/or vaccines for integrated pest control.

**Key Words:** *Rhipicephalus microplus*, Antimicrobial peptides, *microplusin*, *Anaplasma marginale*

## Introduction

Parasitic diseases are a global problem that limits veterinary health and the productive performance of livestock. In relation, ticks represent the most important group of pathogens that cause diseases in cattle. Specifically, *Rhipicephalus microplus* is the hematophagous ectoparasite considered one of the leading causes that limit livestock production in the tropics and subtropics due to the direct and indirect damages it causes. Among these affectations, its great plundering and vectorial capacity stand out in transmitting various infectious agents such as *Babesia* spp. and *Anaplasma marginale* [1,2]. Different control strategies have been developed, where chemical acaricides are the most used tools for tick control [3]. However, the inappropriate use of these components has selected resistant populations to these compounds [4]. As a result, the importance of searching for molecular and immunological targets for developing more efficient vaccines, drugs, and/or control strategies has been highlighted. In this regard, vector control has been proposed based on acaropathogenic organisms, such as *Staphylococcus saprophyticus* bacteria, which cause yellow beak disease in *R. microplus*. This infection produces a yellowish exudate in females that blocks the genital pore, preventing oviposition and causing the death of the tick [5].

On the other hand, the tick immune system has a wide variety of protective mechanisms, where hemolymph is the circulatory fluid initiating the orchestrated protective immune response analogously to the blood, and the lymphoid system takes place by hemocytes [6]. These cells can respond through various mechanisms such as phagocytosis, production of reactive oxygen species, nodulation, and encapsulation, among others [7]. However, several pathogens manage to evade the mechanisms of the immune system

and colonize the tick's organs. Additionally, it is known that the immune system of arthropods has a remarkable plasticity that is reflected in the type of response it generates; it is even pathogen-dependent and can present significant differences between Gram-positive and Gram-negative bacteria [8].

In ticks, AMPs are genetically encoded polypeptides synthesized on ribosomes that are part of the innate immune response [9]. These molecules are synthesized in the fat body and released into the hemolymph in response to microorganisms' invasion. They can recognize surface membrane components such as lipopolysaccharides (LPS) and peptidoglycan (PGN) generated by Gram-positive and Gram-negative bacteria. Structurally the AMPs are short sequences (30-60 amino acids), and the vast majority have a positive charge, and classify into three groups: a) Linear peptides that form  $\alpha$ -helices without cysteine residues; b) Cyclic peptides with cysteine residues; and c) Peptides with an excessive representation in amino acid residues [10–12]. Within these groups, defensins are the most studied AMPs in invertebrates and show a classic conserved pattern of Cys-1-Cys-4, Cys-2-Cys-5, and Cys-3-Cys-6 cysteine residues, linked together by three disulfide bridges that stabilize the molecule and maintain the tertiary structure [13]. Likewise, the mechanism of action of AMPs is based on the formation of pores in the membrane of the pathogen due to the insertion of peptides by electrostatic interactions, generating an osmotic shock that culminates in cell lysis [14]. In relation, it has been shown that *microplusin* is constitutively expressed in fatty body, ovaries, and eggs, and its mechanism of action is based on the blockage of copper ions necessary for the respiratory metabolism of microorganisms, thus inhibiting the growth of Gram-positive bacteria.

In contrast, the tick immune response mediated by the AMPs in the presence of their pathogens, or those they transmit remains unclear. Therefore, the main objective of this work was to perform a structural analysis of the *R. microplus microplusin*. As well as to evaluate its relative expression during infection with *S. saprophyticus* and *A. marginale* within the pathogen-vector interaction, to propose new molecular and immunological therapeutic targets, resulting in the development of new drugs and/or vaccines or control methods that contribute to integrated pest control.

## Materials y Methods

### **Bioinformatic analyses**

In order to identify the *microplusin* mRNA sequence of *R. microplus*, a selective search was performed by BLASTn analyses in three databases including GeneBank, SwissProt, and KEGG. Additionally, for alignment and phylogenetic analysis, we selected the AMPs mRNA sequences of ticks species with the highest similarity percentages (>95%) to *R. microplus microplusin* sequence.

### **Tridimensional structure analysis of microplusin**

The prediction of the 3D structure of the complete sequence of the *microplusin* of *R. microplus* and the cysteine identification was carried out in the SwissModel program and VMD 1.9.3. The stereochemical and energetic validation of the 3D structure was performed using different tools of the ExPASy and Proteomics Tools servers.

### **Sequence alignment of cysteine residues**

In order to compare the ticks *microplusin* sequences with *Drosophila melanogaster* antimicrobial peptides [13], an alignment analysis was performed with the MUSCLE program. The AMPs sequences of *D. melanogaster* have conserved cysteine regions widely studied.

### **Prediction of the physical-chemical parameters of microplusin**

The physical-chemical parameters were determined using an *in silico* analysis from the amino acid sequence of the *microplusin* in the ProtParam and ProtScale programs. The parameters evaluated included molecular

weight, theoretical isoelectric point, amino acid composition, and hydrophobicity.

### **Phylogenetic Analysis**

The phylogenetic analysis was carried out in the MEGA 7 software using the ticks *microplusin* sequences aligned with the MUSCLE program. The analysis included a sequence of *Streptomyces* spp as the orthologous taxa (outgroup). Finally, the phylogenetic tree was reconstructed by the Maximum Likelihood and Jones-Taylor-Thornton method and a bootstrap value of 500.

### **Infection of *R. microplus* ticks with *S. saprophyticus* and *A. marginale***

The *R. microplus* strain INIFAP-Media Joya CA was expanded by infesting pathogen-free cattle under controlled conditions, with 1 g of eggs equivalent to 20,000 tick larvae. Twenty-one days post-infestation engorged female ticks were collected and washed with an Antibiotic-Antimycotic mixture (Gibco™ Thermo Fisher Scientific). Cleaned ticks were infected by immersion in SIGMA-ALDRICH® soy trypticasein selective liquid medium containing  $1 \times 10^8$  *S. saprophyticus* bacteria. The presence of the bacterium was confirmed by end-point PCR of the 16S rRNA of *S. saprophyticus* and by evaluating the characteristic signs of infection of the yellow beak in ticks. Internal controls were engorged ticks without infection but treated under the same conditions in the presence of a selective medium. For the infection with *A. marginale*, eggs from the ticks obtained in the expansion were used to infest a bovine positive for infection with *A. marginale* in the same way as previously mentioned. Verifying the infection in the hemolymph tick was carried out by amplifying by end-point PCR the *Anaplasma* sp *msp5* gene.

### **Hemolymph extraction**

Hemolymph extraction from all experimental and control groups was performed by subcuticular puncture of engorged females with a scalpel blade, as described by [15]. The extracted hemolymph was centrifuged at 500 x g, resuspended in anticoagulant citrate buffer at 4°C (0.098 mM NaOH, 0.14M NaCl, 0.017 M EDTA, 0.04 M citric acid pH 4.5), and stored at -20°C.

## **Specific oligonucleotide design**

Specific oligonucleotides were designed in the NCBI PRIMER-BLAST program based on the *R. microplus microplusin* gene sequences obtained:

FMp:5'-TTCGACTTCGGCTCATCACC-3' and RMp: 5'-AACGGACATCGCTTGTCCA-3'. The specificity of the designed oligonucleotides was performed using a BLASTn analysis in the NCBI, SwissProt, and KEEG databases.

## **Determination of the presence of the microplusin gene in the R. microplus genome by end-point PCR assays**

The presence of the *microplusin* gene sequence in the tick genome was determined by conventional end-point PCR assays under the parameters indicated by the manufacturer (PCR Master mix, Promega®). Previously, the culture and expansion of an embryonic cell line of *R. microplus* was carried out in 50 mL and MEM-L-15 medium supplemented with 20% fetal bovine serum. DNA extraction was performed from confluent embryonic cells using the phenol-chloroform-isoamyl alcohol technique, as indicated in the technical data sheet. The DNA obtained was resuspended in nuclease-free water and stored at -70°C until use. The PCR products obtained were visualized in 1.5% agarose gels, documented in a Photo Doc-It Viresa equipment and analyzed with the OMAX TopView 3.7 software.

## **Housekeeping gene validation**

As a constitutive control, the phospholipid-hydroperoxidase glutathione peroxidase (*phgpx*) gene was used, with the oligonucleotides:

Fw-*phgpx* GTTTGCAGACACCTCAGCGTGCC, and Rv-*phgpx* GCTAGACTGCACAAGCAATACGGG [16]. The constitutive gene was validated by RT-PCR, with the Super Script® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity DNA Polymerase Kit, according to the manufacturer's specifications.

## **Determination of relative expression levels of microplusin by RT-PCR**

The total RNA extraction from the hemolymph of uninfected ticks (CTR), infected with *S. saprophyticus* and *A. marginale* was carried out using the conventional TRIzol technique, according to the manufacturer's instructions.

Finally, the RNA obtained was resuspended in nuclease-free water and stored at -70°C until use. The integrity of the samples was evaluated by electrophoresis in 2% agarose gels, and for all reactions equimolar concentrations of RNA from the different conditions were used. The relative expression of the *microplusin* gene in ticks infected with different pathogenic bacteria was performed by Super Script® III One-Step RT-PCR System Kit according to the technical sheet. The oligonucleotides used for each reaction were those previously described for *microplusin* and *phgpx* genes. The PCR amplicons were visualized on a 2% agarose gel and documented on a Photo Doc-It Viresa equipment. Densitometric analysis of the gel were performed in the ImageJ program to quantify the intensity and determine the relative differential expression for each antimicrobial peptide, normalized with the constitutive *phgpx* gene.

## **Results**

### **Bioinformatic analyses**

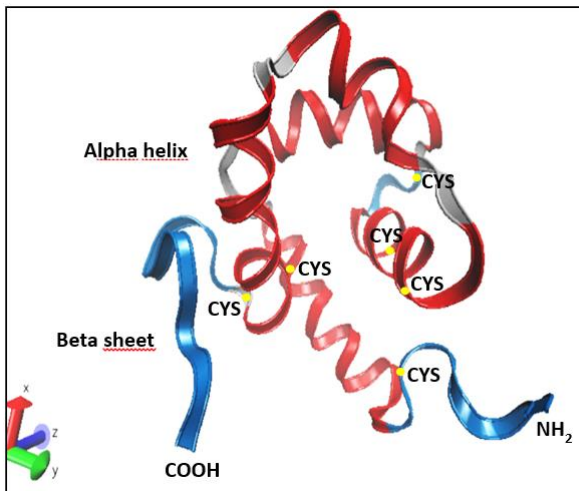
The search in the different databases and the *in silico* analyses revealed several *microplusin* sequences for *R. microplus* with high levels of identity (>95%) with sequences of other tick species.

### **Tridimensional structure analysis of microplusin**

The structural analysis of the *microplusin* sequence and the stereochemical and energetic validation of the 3D structure (Z-score, Local Quality Estimate, and Comparison PDB structures) showed values within the parameters established for the quality of the estimated model. Based on the conserved structure of AMPs reported in insects, the structural prediction shows highly conserved regions, different from the classical pattern Cys-1-Cys-4, Cys-2-Cys-5, and Cys-3-Cys-6 (Fig.1) [13].

### **Sequence alignment of cysteine residues**

The alignment showed high similarity in the cysteine location of *R. microplus* and the *R. zambeziensis*, *R. appendiculatus* and *R. pullcelus* ticks. Interestingly, all ticks sequences have similarity to only two out six cysteines from *D. melanogaster*, which have a



**Figure 1. Prediction of molecular structure of *R. microplus microplusin*.** The model shows the presence of  $\beta$ -sheet and  $\alpha$ -helix, with 6 cysteine residues conserved in the defensin family, showing a differential arrangement. Swiss-Model and VMD programs 1.9.3

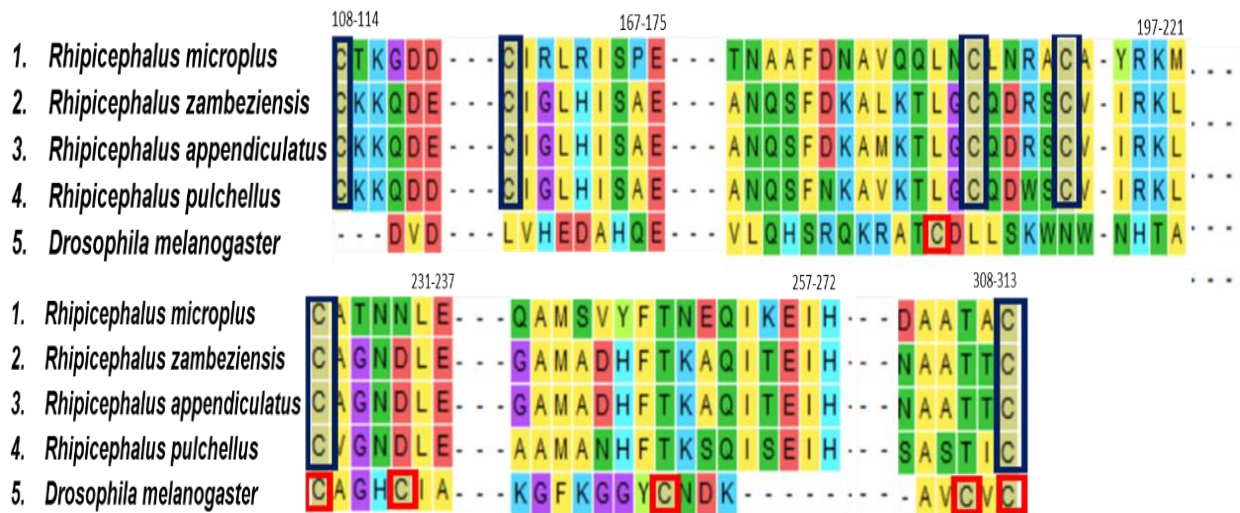
spatial arrangement of Cys-1-Cys-4, Cys-2-Cys-5, and Cys-3, Cys-6 characteristic of most insect AMPs (Fig. 2).

### **Prediction of physical-chemical structural parameters of microplusin**

The evaluation of the physical-chemical properties predicted a molecular weight (MW) of 12 kDa; an isoelectric point (IEP) of 5.34, and 110 amino acids (aa). Regarding hydrophobicity, the results predicted that the molecule has an amino acids distribution with a net negative charge while the first amino acids have hydrophobic properties.

### **Phylogenetic Analysis**

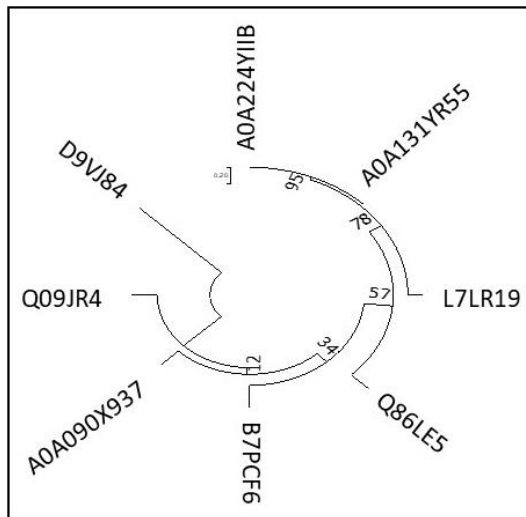
The phylogenetic tree revealed that the *microplusin* of *R. microplus* organizes as a monophyletic group that included *R. pulchellus*, *R. appendiculatus*, and *R. zambeziensis*. Interestingly, sequences from *Ixodes scapularis* and *Ixodes ricinus* groups in a different clade (Fig. 3).



**Figure 2. Alignment analysis of the cysteine residues of *microplusin* of several species of ticks and *D. melanogaster*.** The sequences of *R. zambeziensis*, *R. appendiculatus*, and *R. pulchellus* aligned with the *microplusin* of *R. microplus*. The red box indicates the Cys-1-Cys-4, Cys-2-Cys-5, and Cys-3-Cys-6 location present in most insect AMPs. The dark blue box shows the different location of the cysteines.

## Determination of the presence of the *microplusin* gene in the *R. microplus* genome

The results of the PCR showed an amplicon of approximately 250 bp, in the three different DNA extractions performed (Fig. 4).



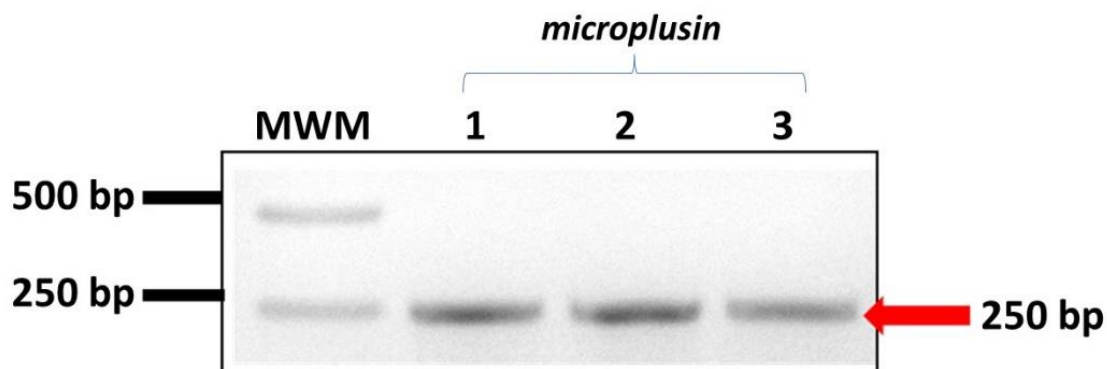
**Figure 3. Phylogenetic tree of the *microplusin* sequence of *R. microplus* reconstructed with the Maximum Likelihood analysis and the Jones-Taylor-Thornton evolutionary method.** The numbers near the nodes show the replicates of the bootstrap. The accession number corresponding to AOA224YIIB *R. zambeziensis*; AOA131YR55 *R. appendiculatus*; L7LR19 *R. pulchellus*; Q86LE5 *R. microplus*; B7PCF6 *I. scapularis*; AOA090X937 *I. ricinus*; Q09JR4 *Argas monolakensis*; D9VJ84 *Streptomyces* spp.

## Housekeeping gene validation

The relative expression of the *phgpx* gene in the *R. microplus* genome was validated using end-point RT-PCR assays. The results showed the presence of an amplicon of approximately 500 bp (Fig. 5, upper gel). The molecular weight of the amplicons of the *phgpx* gene was the reference for subsequent tests.

## Determination of relative expression levels of *microplusin* by RT-PCR

The expression of *microplusin* in the hemolymph of ticks infected with the pathogenic bacteria *A. marginale* and *S. saprophyticus*, and without infection (control), showed an amplicon of 250 bp, with a relative differential expression in each case (Fig. 5). It should be noted that this expression increased in the condition where there is no infection, in contrast to ticks infected with *A. marginale*, where a decrease in the relative expression of the messenger was observed (Fig. 5, lane C). Likewise, in the treatments with *S. saprophyticus*, a low relative expression was observed compared to hemolymph without infection (control), however, the expression was higher than that observed in the infections with *A. marginale* (Fig. 5, lane B). The densitometry analyzes of the amplicons were normalized with the constitutive gene *phgpx*. The relative expression in the hemolymph of uninfected ticks (control) was of 102.08% (Fig. 5 panel b).

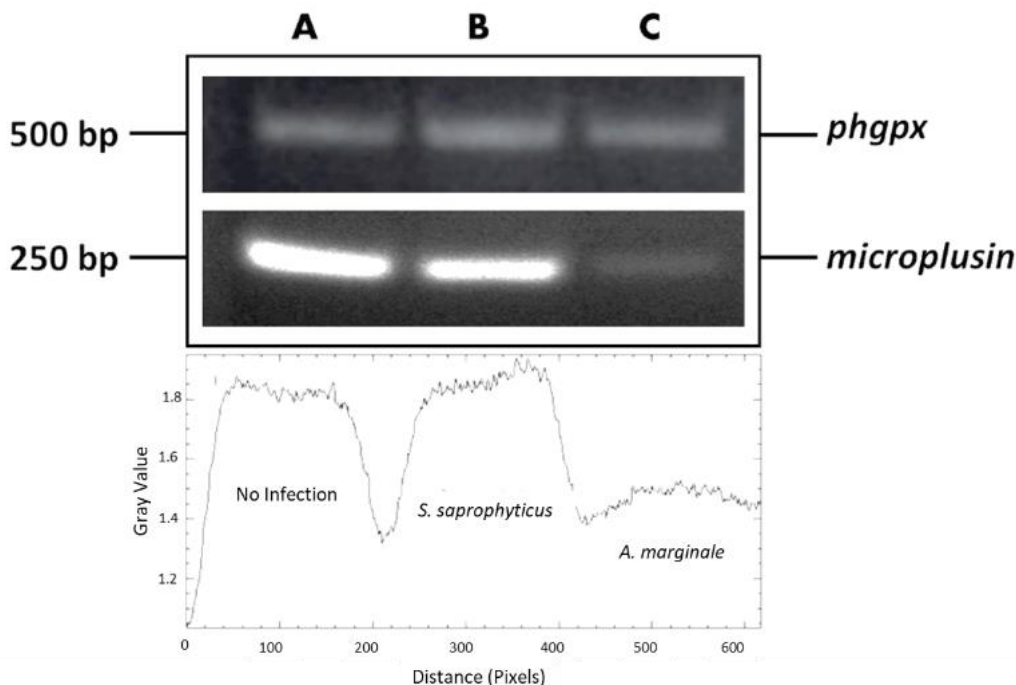


**Figure 4. PCR amplification of the *microplusin* gene in the *R. microplus* genome.** Three amplicons of approximately 250 bp were observed. Lanes 1, 2 and 3 correspond to genomic DNA extracted from embryonic cells of *R. microplus* from three different samples. MWM: 1 Kb molecular weight marker.



In contrast, in the hemolymph of ticks infected with *S. saprophyticus*, a 1.2-fold decrease was observed. The relative expression percentage remains at 85.475% (Fig. 5, panel b). Finally, in hemolymph from ticks infected with *A. marginale*, a 3.2-fold decrease in relative expression percentage was observed, this is

32.648% lower than the controls (Fig. 5, panel b). Additionally, the plot profile results reveal a marked variation in amplicon intensity in hemolymph from ticks infected with *S. saprophyticus* and *A. marginale* (Fig. 5, panel b).



**Figure 5. Determination of the relative expression of the *R. microplus microplusin* gene in hemolymph from ticks infected with *S. saprophyticus* and *A. marginale* by RT-PCR assays.** Upper gel: lanes A, B and C, expression of the constitutive gene *phgpx* (control). Bottom gel: lane A: relative expression in hemolymph from ticks without infection (control); lane B: relative expression in hemolymph of ticks infected with *S. saprophyticus*; lane C: relative expression in hemolymph of ticks infected with *A. marginale*. All amplicons of *microplusin* have a molecular weight of 215 bp, while the amplicons of 500 bp correspond to the control (*phgpx*). Bottom panel: plot profile showing the intensity variation of the bands corresponding to hemolymph from ticks without infection, hemolymph from ticks infected with *S. saprophyticus*, and hemolymph from ticks infected with *A. marginale* (plot obtained with ImageJ).

## Discussion

Bioinformatic analyses are an interesting tool for studying infectious diseases and the pathogens that cause them. Thus, the search for new vaccination targets using these tools has contributed to advances in reverse vaccinology. On the other hand, in recent years, veterinary sciences have shown a trend toward the development of new forms of vector control. In this regard, studying the molecular and immunological mechanisms in the vector-pathogen interaction has gained significant interest in elucidating the associated mechanisms. Therefore, this work focused on the structural and functional characterization

of a type of AMPs known as *microplusin*, which is part of the immune response of the cattle tick *R. microplus*.

We observed that *microplusin* had a different arrangement of cysteine residues present in the AMPs of insects that have been widely studied and characterized [13]. Additionally, the predicted physical-chemical (negative charge) characteristics of *microplusin* are not like those of other AMPs (positive charge). Therefore, this negative charge arrangement could suggest a change in the mechanism of disruption of the membrane integrity of microorganisms. On the other hand, the analysis of the relative expression of

*microplusin* in response to infection by Gram-positive and negative bacteria represents a great advance in the biology of *R. microplus*, suggesting the role of these AMPs in response to infections with differential mechanisms. These infections include a pathogenic bacterium for the tick itself, *S. saprophyticus*, and *A. marginale*, a bacterium that *R. microplus* transmits to cattle.

Interestingly, both bacteria can mediate a differential immune response mediated by AMPs. Our results corroborate the idea of the high plasticity of the arthropod's immune response that, depending on the pathogen, the immune response varies. Finally, our results contribute to advancing in the knowledge and elucidation of vector-pathogen interactions, opening the possibility of searching for new targets based on tick immunosuppression, which contributes to the development of strategies to achieve effective biological control.

## Acknowledgements

The work was carried out in the Arthropodology laboratory of the CENID-SAI of the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock Research, with the support of INIFAP FONDOS FISCALES, Project No. SIGI 13512934133.

## References

De la Fuente J, Blouin EF, Manzano-Roman R, Naranjo V, Almazán C, Pérez de la Lastra JM, Zivkovic Z, Jongejan F, Kocan KM (2007) Functional genomic studies of tick cells in response to infection with the cattle pathogen, *Anaplasma Marginale*. *Genomics* 90. doi:10.1016/j.ygeno.2007.08.009.

Aguilar-Díaz H, Quiroz-Castañeda R, Cobaxin-Cárdenas M, Salinas-Estrella E, Amaro-Estrada I (2021) Advances in the study of the tick cattle microbiota and the influence on vectorial capacity. *Front. Vet. Sci.* 8. doi:10.3389/fvets.2021.710352.

Samish M, Ginsberg H, Glazer I (2004) Biological control of ticks. *Parasitology* 29 (S389-403). doi:10.1017/s0031182004005219.

Abbas RZ, Zaman MA, Colwell DD, Gilleard J, Iqbal Z (2014) Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. *Vet. Parasitol.* 203. doi:10.1016/j.vetpar.2014.03.006.

Miranda-Miranda E, Cossio-Bayugar R, Quezada-Delgado MDR, Sachman-Ruiz B, Reynaud E (2010) *Staphylococcus saprophyticus* is a pathogen of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Biocontrol Sci. Technol.*(20). doi:10.1080/09583157.2010.505325.

Sonenshine DE, Hynes WL (2008) Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. *Front. Biosci.* 1. [https://digitalcommons.odu.edu/biology\\_fac\\_ubs/62](https://digitalcommons.odu.edu/biology_fac_ubs/62)

Kopáček P, Hajdusek O, Buresová V, Daffre S (2010) Tick innate immunity. In: invertebrate immunity. Söderhäll, K. (eds). Springer, Boston, MA. pp.137–162.

Sonenshine DE, Macaluso KR (2017) Microbial invasion vs. tick immune regulation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7. doi:10.3389/fcimb.2017.00390.

Estrada-Peña A, Cabezas-Cruz A, Obregón D (2020) Resistance of tick gut microbiome to anti-tick vaccines, pathogen infection and antimicrobial peptides. *Pathogens* 9. doi:10.3390/pathogens9040309.

Fogaça AC, Sousa G, Pavanelo DB, Esteves E, Martins LA, Urbanová V, Kopáček P, Daffre S (2021) Tick immune system: what is known, the interconnections, the gaps, and the challenges. *Front. Immunol.* 12. doi:10.3389/fimmu.2021.628054.

Lai R, Lomas LO, Jonczyk J, Turner PC, Rees HH (2004) Two novel non-cationic defensin-like antimicrobial peptides from haemolymph of the female tick, *Amblyomma hebraeum*. *Biochem. J.* 379. doi:10.1042/BJ20031429.

Wu J, Zhou X, Chen Q, Chen Z, Zhang J, Yang L, Sun Y, Wang G, Dai J, Feng T (2022) Defensins as a promising class of tick antimicrobial peptides: a scoping review. *Infect. Dis. Poverty* 11 (71).

# Artículos

doi:10.1186/s40249-022-00996-8.

Ganz T (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3. doi:10.1038/nri1180.

Silva FD, Rezende CA, Rossi DCP, Esteves E, Dyszy FH, Schreier S, Gueiros-Filho F, Campos CB, Pires JR, Daffre S (2009) Structure and mode of action of *Microplusin*, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *J. Biol. Chem.* (284). doi:10.1074/jbc.M109.016410.

Aguilar-Díaz H, Quiroz-Castañeda RE, Salazar-Morales K, Miranda-Miranda E (2022) A Newly Optimized Protocol to Extract High-Quality Hemolymph from the Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*: Improving the Old Conditions. *Curr. Res. Parasitol. Vector-Borne Dis.* 2. doi:<https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2021.100066>.

Cossío-Bayúgar R, Miranda E, Holman PJ (2005) Molecular cloning of a phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35. doi:10.1016/j.ibmb.2005.08.008.

## Genomic analysis of Mexican strains of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale*: an application for the development of a species-specific molecular detection test

Alejandra Isabel González-Cruz<sup>1</sup>, Rosa Estela Quiroz-Castañeda\*<sup>2</sup>, Elizabeth Salinas-Estrella<sup>2</sup>, Hugo Aguilar-Díaz<sup>2</sup>, Jesús Francisco Preciado- de la Torre<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Politécnica del Estado de Morelos. Paseo Cuauhnahuac 566, Lomas del Texcal, 62574 Jiutepec, Morelos, México.

<sup>2</sup>Centro Nacional en Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad. Carretera Cuernavaca- Cuautla 55, Col. Progreso, 62574 Jiutepec, Morelos, México

Corresponding author: [quiroz.rosa@inifap.gob.mx](mailto:quiroz.rosa@inifap.gob.mx); [requiroz79@yahoo.com.mx](mailto:requiroz79@yahoo.com.mx)

### Resumen

La detección de patógenos es fundamental para la vigilancia de las enfermedades que podrían desarrollarse en el ganado bovino de nuestro país. La anaplasmosis bovina puede ser causada por *Anaplasma marginale* y *Anaplasma centrale*; sin embargo, en México sólo se ha identificado la primera especie. En varios países del mundo *A. centrale* se utiliza como vacuna contra la anaplasmosis bovina. En nuestro país es considerada especie exótica y su uso como vacuna está prohibido. No obstante, es importante tener pruebas moleculares que detecten los patógenos circulando en el ganado que se moviliza dentro y hacia afuera del país. Este trabajo se basa en un análisis pangenómico de cepas de *A. marginale*, aisladas en México, y *A. centrale* para identificar genes únicos de especie. La secuencia de estos genes únicos se utilizó para diseñar oligonucleótidos que amplifican productos de PCR utilizando como templado DNA genómico extraído de sangre de animales en campo y de sangre congelada. La prueba amplifica un fragmento de las secuencias de *exoSbcC* de *A. centrale* y *biotin* de *A. marginale*, candidatos para la detección de estas especies.

**Palabras Claves:** Anaplasmosis bovina, ganado, detección molecular, muestreo

### Abstract

The detection of pathogens is essential for the surveillance of diseases that could develop in cattle in our country. *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* can cause bovine anaplasmosis; however, only the first species has been identified in Mexico. In several countries of the world, *A. centrale* is used as a vaccine against bovine anaplasmosis. In our country, it is considered an exotic species, and its use as a vaccine is prohibited. However, it is crucial to have molecular tests detect pathogens circulating in cattle moving in and out of the country. This work is based on a pan-genomic analysis of *A. marginale* strains isolated in Mexico and *A. centrale* to identify species-unique genes. The sequence of these unique genes was used to design oligonucleotides that amplify PCR products using genomic DNA extracted from field animal blood and frozen blood as a template. The test amplifies a fragment of the sequences of *A. centrale* *exoSbcC* and *A. marginale* *biotin* genes which are candidates for detecting these species.

**Key Words:** Bovine anaplasmosis, cattle, diagnostic tool, PCR, sampling

### Introduction

Bovine anaplasmosis occurs in tropical and subtropical areas of the world and is endemic in Mexico, Central and South America, and the Caribbean Islands [1]. This microorganism infects bovine erythrocytes producing anemia, hemolysis, fever, abortions, weight loss, and a rapid drop in milk production in cows [2]. In Mexico, as in other tropical regions of the

world, bovine anaplasmosis is caused by *Anaplasma marginale*; however, *Anaplasma centrale*, a naturally attenuated species, is considered to cause mild anaplasmosis in cattle [3]. *A. centrale* is less virulent, and it was detected by Sir Arnold Theiler, and 100 years later, this live vaccine is still used in South Africa, Israel, South America, and Australia [4,5]. In México, this species has not been reported, and its use as a vaccine is not

permitted because it is considered an exotic species by the authorities. Additionally, this “vaccine strain” of *A. centrale* was used to generate the complete genome sequence in 2010 [6].

Biological transmission of *A. marginale* is mediated by ticks of the genus *Rhipicephalus microplus*, *Dermacentor* spp., and *Ixodes* spp, while *A. centrale* is transmitted transstadially by the tick *R. simus* [7]. On the other hand, transmission can also occur mechanically by blood inoculation, biting flies, and by the use of surgery equipment [1,8].

The genetic diversity of *Anaplasma* spp. strains vary from one geographic region to another. Because of this, the detection of the causal agent is a critical step for its control and decision-making. Therefore, detecting *A. marginale* and *A. centrale* is an effective way to detect the presence of these microorganisms in cattle. One of the most widely used molecular detection methods for *Anaplasma* spp. is the polymerase chain reaction (PCR). Currently, several genes are used in these methods as molecular markers for bacterial identification, including 16S rRNA, 23S rRNA, the intergenic region 16S-23S rRNA, *rpoB*, *recA*, *gyrB*, *dnaK*, *amoA*, *oxc*, *hitA*, gene *D*, citrate synthase, *rOmpA*, and *rOmpB*, to mention a few (Machado et al. 2016). Specifically, in *A. marginale*, several molecular markers have been used to analyze the genetic diversity of this pathogen, including major surface proteins (MSP) such as MSP1a, MSP4, and MSP5, which are encoded by single genes [5]. In the last years, several reports about the molecular characterization of *A. marginale* strains have been reported [9–11].

This work aims to develop a molecular test based on pangenomic studies to identify genes specific to species that allow differentiation in the presence of *A. marginale* or *A. centrale* in cattle blood samples. Since, in Mexico, *A. marginale* reaches a prevalence higher than 50% in endemic areas [12], it is essential to have a detection method that allows distinguishing between the *Anaplasma* species circulating in cattle to make decisions and avoid the spread of the disease.

## Materials and Methods

### **Bioinformatic analysis**

We performed a pangenomic analysis to identify the genes specific to each species with the Get Homologues program between the seven genomes of *A. marginale* reported in Mexico (Assembly numbers GCA\_00888801305.1, GCA\_008690265.1, GCA\_003331125.1, GCA\_00888801275.1, GCA\_008274665.1, GCA\_00888801275.1, GCA\_008690255.1, GCA\_00888801275.1) the *A. marginale* reference strain St. Maries (GCA\_000011945.1), and the genome of *A. centrale* (GCA\_000024505.1) reported in the Genbank database. The generated binary pangenomic matrix that ranks 1 and 0 for the presence and absence of genes, respectively, unique gene sequences in each genome were identified from the gene annotation obtained from the RAST server (<https://rast.nmpdr.org/>).

### **Oligonucleotides design**

We designed gene-specific oligonucleotides for the selected genes for *A. marginale* and *A. centrale* using the Primer-Blast tool from the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), with the following parameters: 50% GC content, a Tm of 60°C, an average length of 23 bp, and an average amplicon of 300 bp.

### **Genomic DNA extraction**

We extracted the genomic DNA from five frozen blood samples of strains (Mex-01-001-01, Mex-31-096-01, Mex-15-099-01, Mex-17-017-01, Mex-28-037-02) of *A. marginale* from the Germplasm, Anaplasmosis Unit (CENID-SAI, INIFAP) and from the blood of isolates from Tapalpa, Jalisco, with the ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System kit (Promega). Briefly, 200 µL of blood was added in a 1.5 mL Eppendorf tube mixed with 20 µL of Proteinase K to perform protein digestion in the sample, then 25 µL of Cell Lysis Buffer (CLD) was added to release the genetic material of the bacteria. Subsequently, it was mixed for 10 seconds to obtain a homogeneous mixture and incubated at 56°C for 10 minutes.

Once the incubation time had elapsed, the mixture was pipetted to an extraction column, and 250  $\mu$ L of Binding Buffer (BBA) was added and centrifuged the sample for 1 minute at 16,300 g. After centrifugation, the column was washed three times with 500  $\mu$ L of Column Wash Solution (CWD) and centrifuged for 3 minutes at 16,300 g. The extraction column was run through a centrifuge for 3 minutes at 16,300 g. The extraction column was then run through with 500  $\mu$ L of CWD and then transferred to a 1.5 mL Eppendorf tube; 80  $\mu$ L of nuclease-free water was added and incubated for 15 minutes, followed by 1.5 minutes of centrifugation at 16,300 g. Genomic DNA was quantified spectrophotometrically (NABI, Microdigital), and its integrity was verified by electrophoresis in 1% agarose gel stained with ethidium bromide (10 mg/mL). The PCR reactions to detect *A. centrale* were performed in collaboration with Ph.D. Evangelina Primo (INTA, Argentina).

#### **Molecular detection of *A. marginale* and *A. centrale***

We prepared an end-point PCR reaction by mixing 12.5  $\mu$ L of Master Mix (Bioline), 1  $\mu$ L (10 pmol/ $\mu$ L) of the forward oligonucleotide, 1  $\mu$ L (10 pmol/ $\mu$ L) of the reverse oligonucleotide, 300 ng of genomic DNA, and nuclease-free water for a final volume of 25  $\mu$ L. Amplification conditions were: initial denaturation 94°C, 3 minutes; one denaturation cycle 94°C, 30 seconds; one alignment cycle 60°C, 30 seconds; 30 elongation cycles 72°C, 30 seconds and one final elongation cycle 72°C, 10 minutes. We verified PCR product amplification in a 1% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide (10 mg/mL).

#### **PCR product purification and sequencing**

We used the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega) to purify the amplicons and sequenced them at the Synthesis and Sequencing Unit of the Institute of Biotechnology UNAM.

## Results

#### **Identification of the genes of *A. marginale* and *A. centrale***

Genes specific to each species were identified in the pangenomic matrix generated between each *A. marginale* and *A. centrale* strain genome. The genome annotation with the RAST server identified the protein sequence encoding each gene. Some of the unique genes selected from *A. centrale* were exonuclease SbcC (fig|6666666.325746.peg.70); pentapeptide repeat domain protein (fig|6666666.325746.peg.256); streptococcal hemagglutinin protein (fig|6666666.325746.peg.912); cytoplasmic axial filament protein CafA (fig|6666666.325746.peg.1064); and RecA (fig|6666666.325746.peg.1164). The single genes selected from *A. marginale* were biotin operon repressor/biotin-protein ligase (fig|6666666.341241.peg.401) and proline dehydrogenase (fig|6666666.341241.peg.574).

#### **Oligonucleotide Synthesis**

Seven pairs of oligonucleotides were synthesized, five pairs for genes of *A. centrale* and two pairs for genes of *A. marginale*. The oligonucleotide sequences, amplicon size, and T<sub>m</sub> values are shown in Table 1.

#### **Genomic DNA extraction**

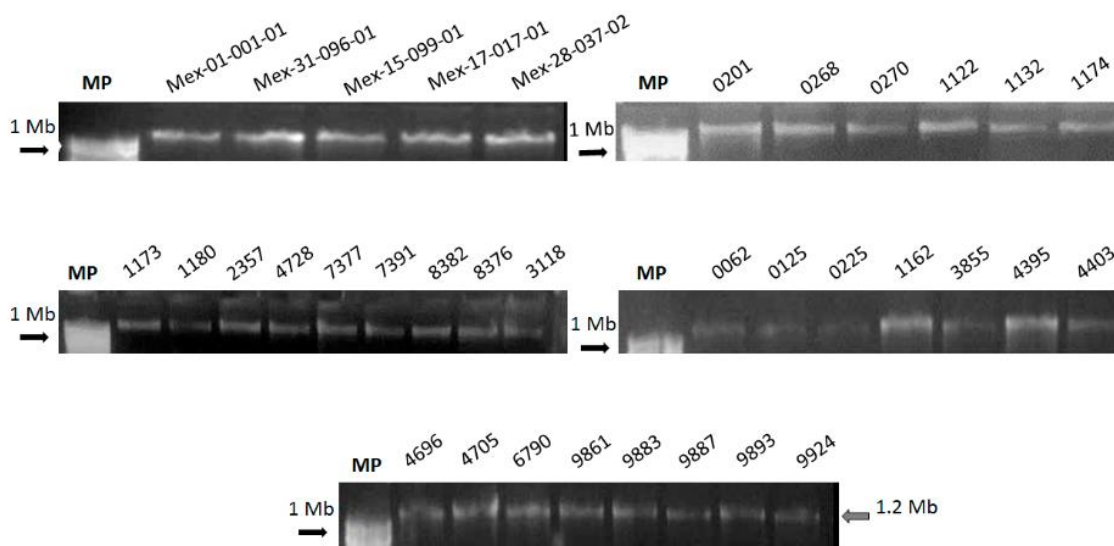
The quality of the extracted genomic DNA from five frozen blood samples of Mexican strains of *A. marginale* (Mex-01-001-01, Mex-31-096-01, Mex-15-099-01, Mex-17-017-01, Mex-28-037-02) from the Germplasm of the Anaplasmosis Unit (CENID-SAI, INIFAP) and from 30 blood samples from cattle of Tapalpa, Jalisco (isolates 0201, 0268, 0270, 1122, 1132, 1174, 1173, 1180, 2357, 4728, 7377, 7391, 8382, 8376, 3118, 0062, 0125, 0225, 1162, 3855, 4395, 4403, 4696, 4705, 6790, 9861, 9883, 9887, 9893, 9924), is shown in Figure 1.

#### **Amplification of the unique genes of *A. marginale***

We obtained amplicons corresponding to 220 bp fragments of the biotin operon repressor/biotin-protein ligase (biotin) gene and 234 bp fragments of the proline

**Table 1.** Sequences of oligonucleotide pairs synthesized for PCR amplification of the single genes of *A. marginale* (AM) and *A. centrale* (AC).

Name	Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Amplicon size (pb)
<i>ACExoSbcCFwd</i>	CAAGGCACTGGGAGAAAAGCTAGA	60	267
<i>ACExoSbcCRev</i>	CCTAGTATCCCCAACTTCTCGC	60	267
<i>ACRecAFwd</i>	GAGAATGGCGGTGAGGGTTTTGAT	60	194
<i>ACRecARev</i>	CTCACACCCAACCTCCTGGCATA	60	194
<i>ACPentapFwd</i>	GCCGTGTTGAACAGAGCGAAAATC	60	192
<i>ACPentapRev</i>	AGACCATATAGCCTCACTGGCGTT	60	192
<i>ACStrepFwd</i>	CCAGCGGCAATGTATCGAAAGAC	60	300
<i>ACStrepRev</i>	TTTGTACTCCAGCTCCAGCTTCCT	60	300
<i>ACCitoFwd</i>	CAACAGCGGTGTGTGAAAATGGA	60	223
<i>ACCitoRev</i>	CTTAACAATTAAGCGAGGGGGCGT	60	223
<i>AMBiotinFwd</i>	CCGGAGCTGAAGCTATCGAACTTG	60	220
<i>AMBiotinRev</i>	CAAGCACCATTTGCCATGGGTAT	60	220
<i>AMProlinFwd</i>	AAGCGCATGCAGGGTTGTA	60	234
<i>AMProlinRev</i>	CTAAGCAGGGACTCCGCCA	60	234



**Figure 1.** Mexican strains and isolates used for genomic DNA extraction. The genomic DNA was extracted from blood from Germplasm (CENID-SAI, INIFAP) and isolates from Jalisco, México.

dehydrogenase (prolin) gene of *A. marginale* with the corresponding oligonucleotides pair.

Of the two genes, we selected the gene biotin for further PCR amplification using DNA from isolates. The amplicons were observed in samples from blood from the Germplasm and isolates (Figure 2 and Table 2). Additionally,

BLASTn bioinformatic analysis of the sequences reported in the electropherograms showed that the biotin operon repressor/biotin-protein ligase gene has an identity of 99.84% with the *A. marginale* strain Jaboticabal. In comparison, the identity of the proline dehydrogenase gene was 99.48% with the same strain.



**Figure 2.** Agarose-gel electrophoresis of PCR amplicons of *A. marginale* specific genes. The size of the *Biotin* and *Prolin* amplicons are 220 and 234 bp, respectively. The Mexican *A. marginale* strains resulted in positive for both genes. Only one amplicon for *Prolin* gene was observed in strain Mex-17-017-01. In *A. centrale*, none of the amplicons were observed.

**Table 2.** Results of PCR amplification with oligonucleotides targeting *A. marginale* gene *Biotin* in Mexican isolates

Sample	Result	Sample	Result
0201	Negative	0062	Positive
0268	Negative	0125	Positive
0270	Negative	0225	Positive
1122	Negative	1162	Positive
1132	Negative	3855	Positive
1173	Negative	4395	Positive
1180	Negative	4403	Positive
2357	Negative	4696	Positive
4728	Negative	4705	Positive
7377	Negative	6790	Positive
7391	Negative	9861	Positive
8382	Negative	9885	Positive
8376	Negative	9887	Positive
3118	Negative	9924	Positive
MQ water	Negative		

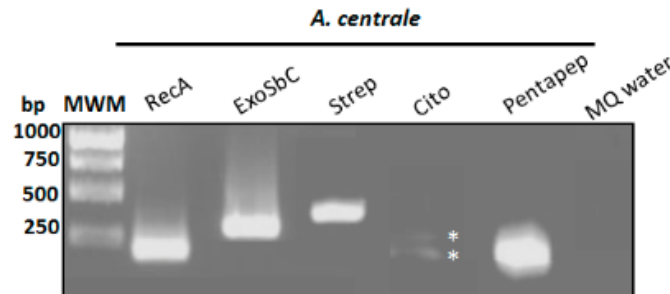
### Amplification of the unique genes of *A. centrale*

No amplification of any of the five genes selected for *A. centrale* (exonuclease SbcC (Exo SbcC), pentapeptide repeat domain protein (Pentapep), streptococcal hemagglutinin protein (Strep), cytoplasmic axial filament protein CafA (Cito), and RecA) was observed in any of the samples tested (Table 3). We only observed amplicons of the

expected sizes in the samples with *A. centrale* genomic DNA as template (Figure 3). The identity percentages obtained after BLASTn bioinformatic analysis of the electropherogram sequences showed that the percentage of identity for the Exo SbcC, Pentapep, Strep, Cito, and RecA genes is 99.55, 95.39, 98.04, 99.63, and 99.04%, respectively, with the *A. centrale* Israel strain.



# Artículos



**Figure 3. Agarose-gel electrophoresis of PCR amplicons of *A. centrale* specific genes.** The size of the *RecA*, *ExoSbcC*, *Strep*, *Cito*, and *Pentapep* amplicons observed are 194, 267, 300, 223, and 192 bp, respectively. The control reaction using MQ water was negative for all *A. centrale* genes.

## Discussion

Bovine anaplasmosis, caused by *A. marginale*, has a wide distribution in Africa, Australia, Asia, and Latin America, generating economic losses. In Mexico and other countries, the development of molecular tests to detect *Anaplasma* spp. is a vital tool for a specific diagnosis and to initiate the corresponding treatments to control the disease. In order to develop a molecular test for the detection of *Anaplasma* spp., a selection of genes specific to *A. marginale* and *A. centrale* based on genomic analysis has been carried out to obtain a specific and effective detection method.

This analysis aimed to identify genes of *A. marginale* and *A. centrale* with potential as molecular markers for the detection of both bacteria from genomic DNA extracted from blood samples of cattle. We evaluated *A. marginale* strains from the Germplasm Bank (CENID-SAI) and bovine blood isolates from

Tapalpa, Jalisco. In this work, we performed a genomic analysis to select specific *A. marginale* genes that are not in *A. centrale* genome and vice versa. Once this criterion was established, the genes *ExoSbcC*, *Pentap*, *RecA*, *Strep*, and *Cito* of *A. centrale* and *Biotin* and *Prolin* of *A. marginale* were considered as unique genes.

For *A. marginale*, we detected amplicons for the *Biotin* (220 bp) and *Prolin* (234 bp) genes in strains Mex-01-001-01, Mex-15-099-01, Mex-28-037-02, and, Mex31-096-01. The PCR reaction barely amplified both genes in strain Mex-17-017-01 (Figure 2), probably due to a low amount or to the degradation of the template DNA. The presence of *A. marginale* was also detected in the isolates from Tapalpa, Jalisco (Table 2). In *A. centrale* none of the genes were detected neither in Mexican strains nor isolates from Jalisco.

**Table 3.** Results of PCR amplification with oligonucleotides targeting *A. centrale* gene *ExoSbcC* in Mexican isolates

Sample	Result	Sample	Result
0201	Negative	0062	Negative
0268	Negative	0125	Negative
1132	Negative	1162	Negative
1173	Negative	4403	Negative
2357	Negative	4696	Negative
4728	Negative	4705	Negative
7377	Negative	6790	Negative
8376	Negative	9861	Negative
1180	Negative	9893	Negative
0270	Negative	9924	Negative
1174	Negative	MQ water	Negative
8382	Negative		
3118	Negative		
7391	Negative		
1122	Negative		
0225	Negative		

*A. centrale* was detected with the primers *RecA*, *ExoSbcC*, *Strep*, *Pentapep*, and *Cito* (Figure 3) using DNA from *A. centrale* as template which suggest that these five genes could be used to detect this pathogen by molecular methods. On the contrary, no amplification product was observed in any Mexican strains or isolates (Table 3).

This work is a basic approach for detecting both species of *Anaplasma* in our country. Although endpoint, nested, and real-time PCR assays have already been developed elsewhere, they are based on genes from reference strains that are not necessarily genetically identical to those present in our country [13–15].

The use of PCR of different types in diagnosing *A. marginale* and *A. centrale* allows advances in diagnosis and the design of efficient detection methods and epidemiological studies [16–19].

On the other hand, to confirm that the amplicons corresponded to *Anaplasma* spp. sequences, they were sequenced and analyzed bioinformatically by BLASTn. It was observed that the amplified products in the Mexican strains and isolates have percentages of the identity of 99.84% with Brazilian strains reported in NCBI. Meanwhile, the identity of the sequences obtained by amplification of *A. centrale* showed percentages higher than 99% with the Israel strain. Because *A. centrale* is considered a less virulent species than *A. marginale* it has potential as a vaccine against anaplasmosis. However, there are studies on infections caused by *A. centrale*, such as the one in 2008, where 58 cases of bovine anaplasmosis caused by *A. centrale* were reported in Europe [20].

Using the PCR technique for identifying *A. centrale* has generated favorable results. Khumalo et al. (2016) used real-time PCR to identify and characterize *A. centrale* in buffaloes and cattle.

These first results obtained are of great importance for the anaplasmosis control programs developed in our country since we could implement new tools for detecting the disease. Although it is necessary to establish more analyses to detect *A. centrale*, using a more significant number of samples from different country regions and perform sensibility test to assess the minimal amount

of genomic DNA necessary to detect the pathogen.

Finally, establishing a molecular test to detect *A. centrale* in our country is vital due to its close relationship with *A. marginale* and the continuous importation of cattle to our country from South America, where *A. centrale* is used as a vaccine, which increases the probability of finding this pathogen in the country.

## Acknowledgements

The authors thank Ph.D.Fernando Martínez Ocampo for his valuable participation in the analysis of the unique genes of *A. marginale* and *A. centrale*, and Ph.D Maria Evangelina Primo for the *A. centrale* reactions.

## References

- Kocan, K.M.; de la Fuente, J.; Blouin, E.F.; Coetzee, J.F.; Ewing, S. a. The Natural History of *Anaplasma Marginale*. *Vet. Parasitol.* **2010**, *167*, 95–107, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.012>.
- Kocan, K.; de la Fuente, J.; Guglielmono, A.A.; Meléndez, R.D. Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma Marginale* Infection in Cattle. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 698–712, doi:10.1128/CMR.16.4.698-712.2003.
- Corona, B.; Rodríguez, M. Anaplasmosis Bovina ( Bovine Anaplasmosis ). **2005**, *VI*, 1–27.
- Theiler, A. Further Investigation into Anaplasmosis of South African Cattle. In *First report of the Director of Veterinary Research. Department of Agriculture of the Union of South Africa*; Theiler, A., Ed.; South Africa, 1911, 1911; pp. 7–47.
- Aubry, P.; Geale, D.W. A Review of Bovine Anaplasmosis. *Transbound. Emerg. Dis.* **2011**, *58*, 1–30, doi:10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x.
- Herndon, D.R.; Palmer, G.H.; Shkap, V.; Knowles, D.P.; Brayton, K.A. Complete Genome Sequence of *Anaplasma Marginale*

Subsp. Centrale. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 379–380, doi:10.1128/JB.01330-09.

Potgieter, F.T.; van Rensburg, L. Tick Transmission of Anaplasma Centrale. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **1987**, *54*, 5–7.

Zabel, T.A.; Agosto, F.B. Transmission Dynamics of Bovine Anaplasmosis in a Cattle Herd. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* **2018**, *2018*, 4373981, doi:10.1155/2018/4373981.

Guarnizo, T.R.M.; Alvarez, D.O.; Díaz-Sánchez, A.A.; Cabezas-Cruz, A.; Gutiérrez, L.Z.; Marrero,

S.M.; Corona-González, B. Epidemiology and Genetic Diversity of Anaplasma Marginale in Zamora-Chinchipec, Ecuador. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **2020**, *11*, 101380, doi:https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101380.

Quiroz Castañeda, R.E.; Amaro Estrada, I.; Rodríguez Camarillo, S.D. Anaplasma Marginale: Diversity, Virulence, and Vaccine Landscape through a Genomics Approach. *Biomed Res. Int.* **2016**, *2016*, 9032085, doi:10.1155/2016/9032085.

Bahia, M.; Silva, L.T. da; Silva, B.M. da; Cordeiro, M. dias; Guterres, A.; Silva, C.B. da; Silva, J.B. da; Fonseca, A.H. Genetic Diversity of Anaplasma Marginale in Calves with Anaplasmosis on Farms in Minas Gerais, Brazil. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **2021**, *12*, 101552, doi:https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101552.

Rodríguez, S.D.; García-Ortiz, M.A.; Jiménez-Ocampo, R.; Vega y Murguía, C.A. Molecular Epidemiology of Bovine Anaplasmosis with a Particular Focus in Mexico. *Infect. Genet. Evol.* **2009**, *9*, 1092–1101, doi:10.1016/j.meegid.2009.09.007.

Molad, T.; Mazuz, M.L.; Fleiderovitz, L.; Fish, L.; Savitsky, I.; Krigel, Y.; Leibovitz, B.; Molloy, J.; Jongejan, F.; Shkap, V. Molecular and Serological Detection of A. Centrale- and A. Marginale-Infected Cattle Grazing within an Endemic Area. *Vet. Microbiol.* **2006**, *113*, 55–

62, doi:10.1016/j.vetmic.2005.10.026.

Shkap, V.; Leibovitz, B.; Krigel, Y.; Molad, T.; Fish, L.; Mazuz, M.; Fleiderovitz, L.; Savitsky, I. Concomitant Infection of Cattle with the Vaccine Strain Anaplasma Marginale Ss Centrale and Field Strains of A. Marginale. *Vet. Microbiol.* **2008**, *130*, 277–284, doi:https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.02.013.

Chaisi, M.E.; Baxter, J.R.; Hove, P.; Choopa, C.N.; Oosthuizen, M.C.; Brayton, K.A.; Khumalo, Z.T.H.; Mutshembele, A.M.; Mtshali, M.S.; Collins, N.E. Comparison of Three Nucleic Acid-Based Tests for Detecting Anaplasma Marginale and Anaplasma Centrale in Cattle. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **2017**, *84*, e1–e9, doi:10.4102/ojvr.v84i1.1262.

Yang, C.; Liu, J.; Li, A.; Li, Y.; Liu, A.; Xie, J.; Liu, G.; Yin, H.; Guan, G.; Luo, J. Evaluating the Babesia Bovis Infection of Cattle in China with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Acta Parasitol.* **2015**, *60*, 721–726, doi:10.1515/ap-2015-0103.

Reinbold, J.B.; Coetzee, J.F.; Sirigireddy, K.R.; Ganta, R.R. Detection of Anaplasma Marginale and A. Phagocytophilum in Bovine Peripheral Blood Samples by Duplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 2424–2432, doi:10.1128/JCM.02405-09.

Joazeiro, A.C.; Martins, J.; Masuda, A.; Seixas, A.; Vaz, S. A PCR for Differentiate between Anaplasma Marginale and A. Centrale. *Acta Sci. Vet.* **2015**, *43*, 1–7.

Hove, P.; Khumalo, Z.T.H.; Chaisi, M.E.; Oosthuizen, M.C.; Brayton, K.A.; Collins, N.E. Detection and Characterisation of Anaplasma Marginale and A. Centrale in South Africa. *Vet. Sci.* **2018**, *5*, doi:10.3390/vetsci5010026.

Carelli, G.; Decaro, N.; Lorusso, E.; Paradies, P.; Elia, G.; Martella, V.; Buonavoglia, C.; Ceci, L. First Report of Bovine Anaplasmosis Caused by Anaplasma Centrale in Europe. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1149*, 107–110, doi:10.1196/annals.1428.069.

# Artículos

Khumalo, Z.T.H.; Catanese, H.N.; Liesching, N.; Hove, P.; Collins, N.E.; Chaisi, M.E.; Gebremedhin, A.H.; Oosthuizen, M.C.; Brayton, K.A. Characterization of Anaplasma

Marginale Subsp. Centrale Strains by Use of *msp1aS* Genotyping Reveals a Wildlife Reservoir. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, *54*, 2503–2512, doi:10.1128/JCM.01029-16.

## Desarrollo de un sistema diagnóstico de un ELISA indirecto con la proteína recombinante hemaglutinina neuraminidasa del virus de la Enfermedad del Ojo Azul en cerdos

Julieta Sandra Cuevas Romero<sup>1\*</sup>, José Luis Cerriteño Sánchez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, INIFAP, CP 05110. Ciudad de México, México.

Correspondencia: Julieta Sandra Cuevas Romero. Departamento de Epizootiología del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Salud Animal e Inocuidad. Km 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, CP 05110, Cuajimalpa, Ciudad de México. Tel 36 18 08 00 ext. 80322

e-mail: scuevas16@yahoo.com.mx

### Resumen

Durante la última década, el CENID-Salud Animal e Inocuidad del INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias), se ha enfocado en el desarrollo de herramientas biotecnológicas para el estudio de diferentes enfermedades de interés pecuario. En el presente trabajo, se desarrolló el método de ELISA indirecto (ELISA-I), utilizando la proteína recombinante HN del *Orthorubulavirus porcino* agente causal de la Enfermedad del Ojo Azul (EOA) que es una de las cuatro enfermedades virales que más afectan la industria porcina. Este desarrollo se plantea como un procedimiento tamiz automatizado rápido, de bajo costo con lectura objetiva de los resultados e inocuo para la detección de anticuerpos específicos contra el virus de la EOA. Esta herramienta tecnológica permitirá establecer un sistema diagnóstico factible de ser utilizado con un gran número de muestras y poder determinar el status epidemiológico de la EOA en la población porcina del país, así como poder estimar el riesgo potencial que implicaría la movilización de cerdos infectados en el proceso de comercialización a nivel nacional e internacional, situación que a la fecha es desconocida en México único país donde se ha reportado esta enfermedad en cerdos.

**Palabras Claves:** *Orthorubulavirus porcino*, PRV-LPMV, HN, Hemaglutinina neuraminidasa, recombinante.

### Abstract

During the last decade, the CENID- Salud Animal e Inocuidad of INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias), has focused on the development of biotechnological tools for the study of different diseases of interest to livestock. In the present work, the indirect ELISA method (iELISA) was developed, using the recombinant protein HN of the *Porcine Orthorubulavirus*, causal agent of Blue Eye Disease (BED), which is one of the four viral diseases that most affect the pig-industry. This development is proposed as a fast, low-cost automated screening procedure with objective reading of the results and innocuous for the detection of specific antibodies against virus. This technological tool will allow establishing a feasible diagnostic system to be used with a large number of samples and to be able to determine the epidemiological status of EOA in the pig population of the country, as well as to be able to estimate the potential risk that the mobilization of infected pigs in the country would imply. A situation that to date is unknown in Mexico, the only country where this disease has been reported in pigs.

**Key Words:** *Porcine Orthorubulavirus*, PRV-LPMV, HN, Hemagglutinin neuraminidase, recombinant.

### Introducción

Durante los últimos años, la Industria Porcina Mexicana se ha visto afectada por cuatro enfermedades virales que impactan negativamente en el costo de producción y en

el margen de utilidad de las empresas dedicadas a la crianza y venta de cerdos, como son la Diarrea Epidémica del Cerdo (DEP), el Síndrome Respiratorio y Reproductivo (PRRS), Circovirus Porcino Tipo2 (CV) y la Enfermedad del Ojo Azul

(EOA). El impacto económico se asocia a los gastos en medicamentos, mortalidad de lechones y la baja fertilidad, entre otras. En la actualidad, la biología molecular ha permitido el desarrollo de diversos campos de la ciencia, que ha dado oportunidad a un gran número de aplicaciones biotecnológicas en diversos sectores industriales con un crecimiento del 1.5% del 2015 al 2020 (Martin et al 2021). Los reportes más recientes indican que México ocupa el 8º lugar a nivel mundial en producción porcina con 1.600 toneladas de carne, representando un incremento del 4.5% con respecto al mes de abril del 2022 (Shahbandeh, M. 2023). Por su parte, la USDA mostró datos que indican que la producción porcina en México en enero y febrero del 2023 presenta una tendencia en aumento con 1,570 toneladas de carne, siendo mayor con respecto a los años anteriores (USDA 2023).

Por esta razón el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI) del INIFAP ha desarrollado dentro de sus líneas de investigación el área de Biotecnología en Salud Animal, relacionado al estudio de Enfermedades Virales de interés pecuario que afectan la ganadería nacional. Dentro de estos aspectos en particular se han desarrollado herramientas biotecnológicas para el estudio de la Enfermedad del Ojo Azul (EOA) considerada una de las cuatro enfermedades de importancia epidemiológica en México. La Enfermedad del Ojo Azul (EOA) fue reconocida desde el inicio de los 80's y continúa siendo un problema para la industria porcina del país. Desde 1997 hasta la fecha, para México la Enfermedad de Ojo Azul representa una limitante para el comercio internacional como es citado en el Reglamento de Importación de Animales y Productos de origen Animal de la Agencia de Servicios de Inspección en Salud Animal y Vegetal USDA (APHIS, 9 CFR cap 1, subcap D 1997, part 94 2005).

La EOA se caracteriza por ocasionar problemas nerviosos, respiratorios y reproductivos. Los signos clínicos varían considerablemente y dependen de la edad del cerdo. Los lechones son los más afectados, quienes presentan encefalitis, neumonía y opacidad de la córnea (Stephano et al., 1988).

El impacto negativo en los parámetros reproductivos y la mortalidad que se presenta durante un brote de esta enfermedad en granja, ocasiona considerables pérdidas económicas, las cuales se asocian a la baja en la fertilidad, incremento en el porcentaje de lechones nacidos muertos (arriba del 19%), presencia de momia (mayor al 36%), la disminución en el número total de lechones nacidos vivos (-4.1) y el incremento en la mortalidad de lechones durante las primeras semanas de vida que puede ser mayor a un 50%. (Escobar et al., 2011, Ramírez-Mendoza et al., 1997).

El *Rubulavirus Porcino*, Virus La Piedad Michoacán México (PRV-LPMV) es el agente causal de la enfermedad de "ojo azul" en cerdos, la cual, sólo ha sido reportada en México, es causada por un paramixovirus, anteriormente denominado *Rubulavirus porcino* y a partir del 2019 *Orthorubulavirus porcino* (PRV) (Rima et al, 2019). El virus ha sido caracterizado a nivel molecular (Berg et al., 1991; 1992; 1997; Linné et al. 1992; Reyes-Leyva et al., 1999; Svenda et al., 1997, Sundkvist et al., 1990; 1992), nivel celular (Hjertner et al., 1997; 1998; Reyes-Leyva et al., 1997; Wiman et al., 1998) y mediante infecciones experimentales (Allan et al., 1996; Hernández-Jauregui et al., 2004; Stephano et al; 1988; Stephano, 1999, Rivera et al., 2013, Cuevas-Romero et al., 2015). El genoma consiste en una cadena sencilla de RNA, de polaridad negativa, de aproximadamente 15 K. Los análisis filogenéticos han demostrado que el virus se relaciona más con el virus de papeas y el de los simios 5 (SV5) (Berg et al., 1991; 1992; 1997; Svenda 1997, Sundkvist et al., 1992). Sin embargo, la identidad para estos virus a nivel de aminoácidos es solo de un 40%. El virus recientemente ha sido clasificado en la subfamilia *Rubulavirinae* como *Porcine orthorubulavirus*-La Piedad Michoacán México virus (PRV-LPMV) (ICTV 2019). Existen más datos en relación al gen de la proteína hemaglutinina neuraminidasa (HN). Desde 1990 hasta la fecha, se tiene reportados aproximadamente 20 secuencias del gen HN de diferentes aislados, por ejemplo: LPMV-CI, LPMV-CII, LPMV-CIII y LPMV-CIV, entre otros. En México no existe alguna norma oficial que permita establecer programas de prevención, diagnóstico y vigilancia epidemiológica de la EOA.

Desde la aparición de la EOA (1981), la prevención y el control en las granjas infectadas se ha basado en estándares de sanidad e higiene (Correa-Girón et al., 2002; Moreno-López et al. 1986). Se reporta una seroprevalencia del *Rubulavirus porcino* (PRV) del 9% al 23.7% en los estados de Jalisco, Michoacán, Estado de México y Guanajuato, por lo que la enfermedad continua endémica principalmente en la región central y occidental de la República Mexicana (Escobar, et al., 2011).

En relación a las posibles técnicas diagnósticas, solo están disponibles las pruebas serológicas de seroneutralización y el clásico aislamiento viral (McNeilly et al., 1997; Nordengrahn et al., 1999). Sin embargo, para varios propósitos de investigación, se ha empleado la tecnología clásica de inhibición de la hemoaglutinación, aunque ésta, no es considerada una técnica oficial para el diagnóstico serológico.

Actualmente no se tiene disponible a nivel comercial una prueba de diagnóstico serológico, segura, fácil, rápida y barata que permita evaluar un gran número de muestras de cerdo y tener un diagnóstico en un corto periodo de tiempo. De tal forma que para México cobra vital importancia el desarrollar sistemas de diagnóstico y/o inmunógenos que permitan proporcionar a la Industria Porcina del país una herramienta preventiva que permita establecer programas preventivos seguro, confiable e inocuo para su aplicación y para su uso sin riesgo de transmisión y diseminación de agentes virales hacia zonas libres del país.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y estandarizar un método de diagnóstico inmunoenzimático de ELISA indirecta (ELISA-I), sensible y específica, basado en la utilización de la proteína recombinante HN del *Rubulavirus porcino*, que es una glicoproteína altamente inmunogénica, donde los anticuerpos específicos que se generan en el hospedero neutralizan el reconocimiento de los receptores a nivel celular.

## Material y Métodos

*Obtención de la Proteína HN recombinante*  
La proteína HN del *Rubulavirus porcino*, que corresponde a la glicoproteína

hemaglutinación-neuraminidasa (HN) del PRV, fue obtenida de un desarrollo previo del CENID-SAI, Laboratorio de Epizootiología. A partir de esta proteína recombinante HN (rHN-PorPV) (No. De acceso: KC928078) (Cuevas-Romero et al., 2016), altamente antigénica se generó un lote de trabajo para el desarrollo de la prueba de ELISA indirecta (ELISA-I). Brevemente, se descongeló de -70°C una alícuota de la clona de la rHN-PorPV, y se utilizó para inocular un precultivo en medio LB con kanamicina (50 µg/ml), el cual se dejó crecer durante 18 horas. Se tomó el precultivo necesario para inocular un matraz con 75 ml de medio LB bajo en sales comenzado a 0.5 DO a 600 nm, se incubó en agitación continua (250 rpm) a 37°C durante 3 horas. Posteriormente la inducción se llevó a cabo cuando el cultivo llegó a una DO 600nm de entre 0.8 y 1.5 y se agregaron 250 µl de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1M y 50 µl de L-Ramosa al 20% y nuevamente el cultivo fue colocado en agitación continua (250 rpm) durante 18 horas a 37°C. Se centrifugó el material (4000 rpm, por 10 min) para trabajar con el paquete celular (pellet), y mediante un proceso de lisis con alta presión (8000 psi) y purificación mediante una columna de afinidad (HisTrap HP His tag protein purification column), se purificó la proteína para su evaluación mediante SDS-PAGE y Western-Blot, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-histidina, específico para reconocer la proteína expresada. La proteína expresada se cuantificó utilizando el método de Bradford.

### *Estandarización de la prueba de ELISA*

Para el desarrollo de la técnica de ELISA-I, se consideraron algunos factores importantes tales como: adsorción y titulación del antígeno, controles de suero positivos (procedentes de animales vacunados), sueros negativos (animales libres), titulación de conjugado, cinética de reacción del sustrato, tiempo de incubación, temperatura, pH de las soluciones amortiguadoras, tiempo óptimo de lectura e interpretación de resultados, (Burgess, 1988; De'Ath, G. 1988; Edwards, et al., 1985; McLaren, et al., 1985).

Se estandarizó la prueba de ELISA-I, mediante la evaluación de sueros procedentes de cerdos inmunizados

experimentalmente, y sueros negativos de animales SPF, proporcionados del banco de sueros del proyecto de Rubulavirus porcino del CENID-SAI, Laboratorio de Epizootiología. Los cuales se utilizaron para determinar las concentraciones óptimas para el uso de la proteína recombinante HN, conjugado y sustrato respectivamente.

Se preparó un lote piloto de rHN-PorPV para titulación de antígeno en microplacas de fondo plano con 96 pocillos (NUNC Polysorp Surface) para su evaluación en el desarrollo de la prueba de ELISA-I. Se determinó la concentración óptima de proteína recombinante HN para sensibilizar microplacas, utilizando diluciones dobles a partir de (1:500) 50  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  hasta 400  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  con el modelo denominado "titulación por bloque" es decir; se utilizaron diferentes diluciones de antígeno frente a diferentes diluciones de conjugado a partir de una dilución de 1:5000 hasta 1:20000, fijando la dilución de los sueros controles a 1:200 en toda la placa.

La absorción del antígeno en el fondo de las placas, se realizó mediante el uso de solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M pH 9.6. En todos los ensayos se consideró un volumen de 100  $\mu\text{l}$  para cada pozo, las placas se sellaron con papel parafilm y se colocaron dentro de una cámara húmeda la cual se incubó en refrigeración a 4° C durante toda la noche. El criterio para seleccionar la dilución de antígeno se consideró en donde se obtuviera la mayor diferencia entre el suero control positivo y negativo (mínimo tres desviaciones estándar en la densidad óptica DO), y donde la reacción inespecífica (fondo) fuera menor de 0.05 DO a 450 nm.

La determinación la concentración óptima de Conjugado (anticuerpo monoclonal anti-IgG porcina), desarrollado en cabra (KPL, USA) conjugado con peroxidasa de rábano, se realizó de la siguiente forma: inicialmente para su empleo se reconstituyó el conjugado con 1 ml de una mezcla glicerol-agua 50% (V/V) agitando suavemente, se hicieron alícuotas y se almacenó a -20° C. Posteriormente, la determinación de la dilución óptima del conjugado siguiendo el modelo de "tablero de ajedrez" utilizando diluciones decimales iniciando a partir de una dilución de 1:5000

hasta 1:20000 a una dilución constante de sueros controles (1:200).

Para la determinación del tiempo de lectura del ensayo, se elaboró la curva de cinética de reacción del sustrato ABTS 0.1[2,2'-Azinobis (3-ethylbenztioline-6-Sulfonc Acid)] (ABTS 0.1N), mediante lecturas de la densidad óptica (DO) durante 30' a intervalos de 5' , en el lector de ELISA, Multiscan plus II, esto permitió determinar el tiempo de lectura del ensayo y el punto en el cual es preferible detener químicamente la prueba, donde exista mayor diferencia entre sueros positivos y sueros negativos. Se adaptó un software para lectura y estandarización de los sueros mediante porcentaje de positividad (%PP), se hicieron 10 repeticiones del mismo ensayo para determinar la variación del mismo y establecer las densidades ópticas de los sueros controles.

#### *Sueros controles de la prueba de ELISA*

Se emplearon 30 sueros provenientes de cerdos SPF negativos, libres de la infección del PRV y 30 sueros de cerdos SPF infectados experimentalmente con el PRV para la obtención del Suero control positivo fuerte (C++) anti-PRV, suero control positivo débil (C+) anti-PRV y 30 suero control negativo (C-) respectivamente. Las muestras de suero fueron proporcionadas del banco de sueros del Proyecto de Investigación de la EOA, del CENID-SAI preservadas en congelación - 20°C. La determinación de anticuerpos circulantes, específicos contra el PRV, se realizó mediante la prueba de Seroneutralización en cultivo de tejidos (SN) por el método convencional. Brevemente, para la realización de SN, se trabajaron placas de 96 pozos estériles marca "NUNC" de fondo plano, los sueros se inactivaron a 56 °C durante 30 min. y la infección se realizó con 200 TCID<sub>50</sub>/0.05ml. de PRV, utilizando la línea celular PK15, de acuerdo con la técnica descrita por Mc Neilly y colaboradores (Allan et al. 1996, Dinter Zvonimir, 1989, Mc Neilly et al. 1997).

#### *Análisis estadístico*

El análisis estadístico se realizó mediante el programa Win-Episcopy, (Frankena K & Goelma J O. 1991). Para determinar valores de sensibilidad y especificidad con los sueros controles de referencia (positivos y negativos)



en comparación con los resultados de SN, mediante una tabla de contingencia de 2 x 2 (Tabla 1). Los resultados de ambas pruebas se correlacionaron, considerando el ensayo

de SN como prueba de referencia ("Gold Estándar").

**Tabla 1.** Tabla de contingencia de 2x2 para obtener la sensibilidad y especificidad.

		SN (Prueba de oro)		Total
		SI	NO	
ELISA-Indirecta	+	A	B	A+B
	-	C	D	C+D
	Total	A+C	B+D	N

A = número de verdaderos positivos  
 B = número de falsos positivos  
 C = número de falsos negativos  
 D = número de verdaderos negativos

Sensibilidad (%) =  $100 \cdot A / (A+C)$   
 Especificidad (%) =  $100 \cdot D / (B+D)$

### *Determinación del punto de corte o "Cut-off" del ELISA.*

El punto de corte se definió como el nivel de anticuerpos en un suero el cuál discrimina entre animales positivos y negativos (Wardley & Crowther, 1981; Dierksheide, 1987). La determinación del punto de corte es punto central en cualquier ensayo serológico. La implicación de este punto de corte varía de enfermedad a enfermedad o del estado de vacunación del animal. Este puede ser usado para determinar si un animal está potencialmente infectado o no y definir la seroconversión en animales vacunados. El único método válido para determinar un punto de corte diagnóstico es probar muestras de sueros provenientes de animales positivos conocidos y negativos conocidos. Los resultados de los sueros control y los sueros de prueba se expresaron como porcentajes de positividad (%PP) de la lectura de la DO media del C++, a un tiempo de incubación del cromógeno de 20 minutos. El porcentaje de positividad se calculó mediante la siguiente formula:

$$\%PP = \frac{DO \text{ de la muestra de prueba} \times 100}{DO \text{ del control positivo fuerte C++}}$$

### *Validación de la Prueba de ELISA*

Una vez estandarizada la prueba, se procedió a la validación del inmunoensayo comparando los resultados de un núcleo de sueros

evaluados mediante la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH), (prueba rutinaria utilizada en el diagnóstico serológico del PRV) como se mencionó anteriormente, con los resultados de la prueba de ELISA-I, para esto se seleccionó una granja porcina en el estado de Guanajuato con antecedentes clínicos de la infección por el PRV y con perfil serológico conocido mediante la prueba de IH. Se seleccionaron 60 sueros de cerdos serológicamente positivos por la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación con títulos entre 1:160 y 1:320 unidades, esta prueba se basan en las características de hemoaglutinación que presenta la proteína estructural HA del PRV utilizando glóbulos rojos de pollo; brevemente, inicialmente se realizó la titulación del virus a partir de diluciones dobles del antígeno PRV de los sobrenadantes de células PK15, inoculados con la cepa de referencia. El efecto de aglutinación de glóbulos rojos de pollo, se observó a través de un microscopio de luz, donde se estableció un título de trabajo de 1:8 unidades hemoaglutinantes para la prueba de IH (Correa et al. 1988, Dinter Zvonimir, 1989, Mc Neilly et al. 1997). Adicionalmente se incluyeron 30 sueros de cerdos negativos provenientes de una zona libre de la infección por el PRV. La concordancia entre ambas pruebas se determinó mediante la prueba de KAPPA, que expresa la proporción de concordancia de que ambas pruebas

coincidan más allá del azar, cuando KAPPA tiene un valor de 0 indica que no existe concordancia entre las pruebas evaluadas; si se presenta un valor de 1.0, indica una perfecta concordancia (Thorner, et al., 1981; Taylor, 1986; Frankena, 1991).

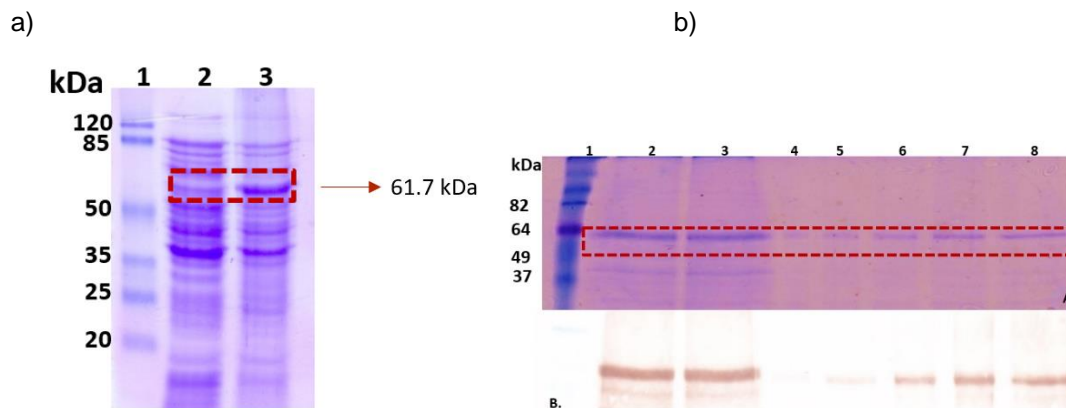
## Resultados

### *Cuantificación de la proteína HN recombinante y detección mediante SDS-Page y Western-Blot.*

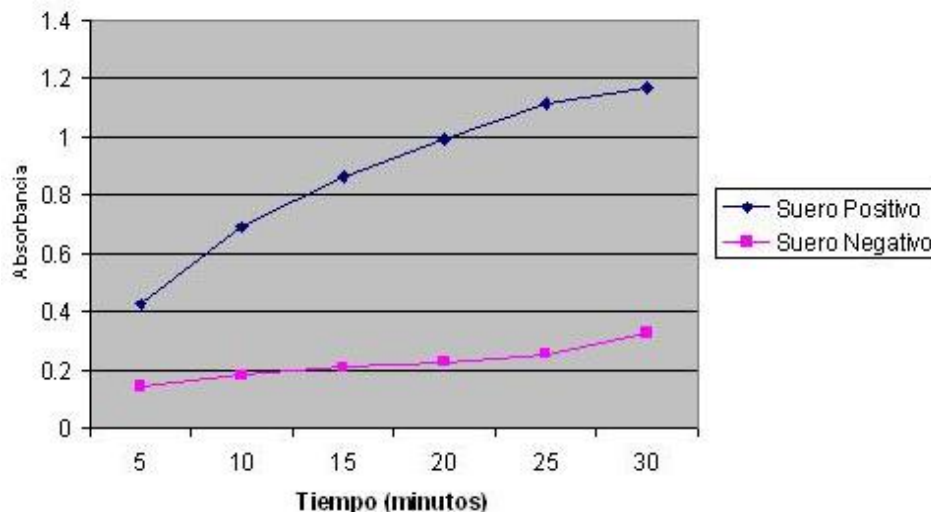
La detección de la proteína HN se observó en 61.7 kDa mediante SDS-PAGE obteniendo un lote de trabajo con una concentración de 70 µg/ml el cual se utilizó para la estandarización de las pruebas de ELISA-I. La prueba de Western-blot fue revelada con el uso de un monoclonal anti -Histidina y un segundo anticuerpo anti-mouse-HRP, marcado con peroxidasa, demostrando con esto la especificidad de la proteína para su uso en la prueba de ELISA-I (Figura 1).

### *Estandarización del ensayo de ELISA-I, con la proteína recombinante HN del PRV*

Se establecieron los tiempos de incubación para la antigenación de placas en 24 h a 4° y de 60 minutos a 37° para los anticuerpos empleados respectivamente. Se determinó la concentración óptima del antígeno (proteína recombinante HN), evaluada mediante el modelo de "titulación por bloque" indicando una concentración de 100 µg /pozo. En la titulación del conjugado (monoclonal anti-IgG porcina) utilizando los sueros controles de referencia se estableció una dilución de 1:10 000, donde se observó la mayor diferencia entre sueros positivos y negativos determinada mediante la curva de cinética de reacción del sustrato (ABTS) registrada durante 30' con intervalos de lecturas cada 5', resultando en un tiempo ideal de lectura para el inmunoensayo a 20' después de iniciada la reacción (Figura 2).



**Figura 1.** a) Expresión de la rHN-PorPV visualizada en SDS-PAGE al 12%. Carril 1. Marcador de peso molecular (Prestained Protein MV Marker (Thermo Scientific, EU Lituania)), Carril 2. Cultivo de *E. coli* BL21 transformada sin expresar, Carril 3. Cultivo de *E. coli* BL21 expresado con IPTG. b) Visualización del proceso de obtención de la rHN-PorPV en SDS-PAGE al 12% y Western Blot (revelado con anti-histidina y anti-ratón) carril 1 se encuentra el Marcador de peso molecular, en los carriles 2 y 3 se presentan los Cuerpos de inclusión-rHN y en los carriles del 4 al 8 se presentan las eluciones de la columna (proteína purificada).



**Figura 2.** Cinética de reacción del sustrato (ABTS) en presencia de sueros de referencia a diferentes tiempos.

A partir de las condiciones de trabajo establecidas, se analizaron un total de 30 sueros de porcinos, clasificados previamente como positivos o negativos por la prueba de seroneutralización (SN) del banco de sueros del CENID-SAI-INIFAP, donde los sueros de referencia positivos evaluados mediante la prueba de SN (“Gold estándar”), mostraron títulos superiores a 1:128, y los sueros negativos no mostraron actividad neutralizante. Los resultados de la prueba de ELISA-I se expresaron mediante el análisis de las lecturas de densidad óptica (DO 414nm), en porcentajes de positividad (%PP), en relación con un control fuerte positivo (C++) de referencia mediante un software para procesamiento de datos, considerando 10 repeticiones para el ensayo. Se determinó la distribución de la frecuencia de los sueros positivos o negativos en los intervalos de densidades ópticas más 1 desviación estándar (DS) con los siguientes resultados; para el suero control fuerte positivo (C++) fue de 0.88 a 1.38, para el suero control débil positivo (C+) de 0.442 a 0.774 con porcentajes de positividad mayores a 25%, y para el suero control negativo (C-) de 0.052 a 0.032 con valores de %PP menores del 5%. (Tabla 2), estableciendo un punto de corte del 20 %PP con respecto al valor de la DO del suero control negativo (+ 3DS) en relación al valor de la DO del suero control fuerte positivo (- 3DS). Se determinó la sensibilidad y especificidad del ensayo, mediante una tabla

de contingencia de 2x2; bajo estas condiciones experimentales se obtuvo una sensibilidad comparada de 100% y una especificidad comparada de 100% en relación con la prueba de SN como prueba de referencia (Tabla 3).

#### *Validación de la Prueba de ELISA-I*

Los resultados en la validación del ensayo con 90 sueros de cerdos naturalmente infectados obtenidos de una granja positiva al PRV, mostraron títulos en la prueba de IH entre 1:16 y 1:128, cuando observamos los datos del % PP de los mismos sueros en la prueba de ELISA-I, a una dilución de 1:16, las densidades ópticas observadas se detectaron con valores superiores al 25% PP indicativo a una alta concentración de material de reacción antígeno-anticuerpo. Los resultados de la comparación del ensayo de ELISA-I contra la prueba de IH, mostraron una concordancia estimada mediante el valor de KAPPA de 0.052 (Tabla 3) indicativo de un moderado nivel de concordancia, esto podría ser explicado por la baja sensibilidad que presenta la prueba de IH (Tabla 4).

# Artículos

**Tabla 2.** Comportamiento del ensayo ELISA-I en 10 repeticiones. Valores de densidad óptica (414 nm) promedio y PRUEBA DE CONCORDANCIA: RESULTADOS

PROPORCIÓN DE OBSERVADOS	0.79
PROPORCIÓN DE ESPERADOS	0.56
POSIBILIDAD DE MÍNIMO ERROR	0.23
MÁXIMA POSIBILIDAD DE CONCORDANCIA	0.44
Kappa=	0.52

RESULTADOS INGRESADOS (A, B, C, D)					
PRUEBA ESTÁNDAR					
PRUEBA	1	2	3	4	TOTAL
1	51	9	0	0	60
2	10	20	0	0	30
3	0	0	0	0	
4	0	0	0	0	
TOTAL	61	29	0	0	90

ALTERNA  
desviación estándar (DS).

SUEROS	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR
Control Fuerte Positivo C++	1.132	0.248
Control Débil Positivo C+	0.608	0.166
Control Negativo (C-)	0.044	0.012
Control Conjugado (Cc)	0.008	0.007

**Tabla 3.** Sensibilidad y Especificidad\* de ELISA-I (punto de corte al 20%) comparada con la prueba de Seroneutralización (SN) (estándar de oro) determinada en sueros de cerdos SPF infectados experimentalmente con el PRV y negativos respectivamente.

**Tabla 4.** Tabla de concordancia obtenida por el programa EPISCOPE

ELISA	SN (estándar de oro) (punto de corte 20%)		
	Positivos	Negativos	Total
Positivos	30	0	30
Negativos	0	30	30
Total	30	30	60

Sensibilidad comparada 100%; Especificidad comparada 100%

Valor predictivo: para detectar animales positivos 100%; para detectar animales negativos: 100%

\*Esta tabla de contingencia analizada con el programa Episcopo (12).

## Discusión

El primer brote reportado de la enfermedad de ojo azul en cerdos fue en los inicios de 1980. La enfermedad todavía es un problema para la industria porcina en México. Se ha

especulado que la transmisión del virus al cerdo podría ser a través de reservorios silvestres. Como soporte a esta teoría, se ha demostrado recientemente que los murciélagos hematófagos de México poseen anticuerpos dirigidos hacia el PRV (Salas-Rojas et al., 2004).

Por otro lado, no se ha comprobado formalmente que los murciélagos hematófagos sean un reservorio natural del PRV. Sin embargo, considerando que éstos son reservorio para muchos virus con potencial de diseminación a otras especies, es ciertamente posible que también sean reservorios del PRV.

Para tener la capacidad de investigar la diseminación del PRV en la naturaleza y en el cerdo, se ha desarrollado en este estudio la técnica de ELISA-I, a partir de la proteína HN recombinante del virus, que permite evitar el manejo de antígeno vivo y la diseminación del virus en áreas geográficas libres de la enfermedad. Con el fin de tener la capacidad de estudiar la situación epizootológica de la enfermedad en México, así como otros aspectos de circulación del virus en diferentes áreas porcinas del país.

La técnica de ELISA-I tiene muchas ventajas sobre otros métodos diagnósticos. Por ejemplo, la prueba tiene una alta sensibilidad, especificidad y el procedimiento limita una posible contaminación cruzada con otros virus. Para el desarrollo de esta técnica se ha usado el gen HN del PRV debido a que éste es altamente expresado (Hjertner et al., 1998) y también a que su secuencia se encuentra disponible (Berg et al., 1992).

En resumen, el desarrollo del método de ELISA-I basado en la proteína recombinante HN del PRV- LPMV, representa una alternativa idónea para la determinación de animales enfermos o libres de la enfermedad, favoreciendo el comercio a nivel nacional e internacional de productos de origen porcino. Este desarrollo tecnológico puede ser empleado en futuros estudios enfocados en diferentes cuestiones biológicas, así como epidemiológicas para el control de este virus en México.

## Conclusión

La tecnología generada en este proyecto, además de ser factible de ser protegida mediante su registro de patente, resulta una importante alternativa para el diagnóstico de la Enfermedad del Ojo Azul en México, dado que esta enfermedad representa una barrera

arancelaria para la exportación de cerdos y sus derivados, así como para la movilización de animales dentro del comercio nacional e internacional.

Además de proveer un sistema diagnóstico a la industria farmacéutica veterinaria mexicana, con la oportunidad de realizar una producción en extenso que permita una apertura en el diagnóstico y vigilancia epidemiológica de la enfermedad en México.

## Agradecimientos

El presente trabajo fue parcialmente financiado por el proyecto SEP-CONACYT-288942 y parcialmente por el proyecto: "Proyectos de apoyo a la Investigación, No. SIGI: 1259436381".

## Referencias

Allan GM, McNeilly F, Walker I, Linne T, Moreno-Lopez J, Hernandez P, Kennedy S, Carroll BP, Herron B, Foster JC, Adair B. (1996) A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection of pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J Vet Diagn Invest.* 1996 Oct;8(4):405-13.

Berg M, Hjertner B, Moreno-Lopez J, Linne T. (1992) The P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polypeptides P, V and C: the P protein mRNA is edited. *J Gen Virol.* 73:1195-200.

Berg, M., Sundqvist, A., Moreno-López, J. and Linné, T., (1991) Identification of the porcine paramyxovirus LPMV matrix protein gene: Comparative sequence analysis with other paramyxovirus. *J.Gen.Virol.* 72. pp.1045-1050.

Berg M, Bergvall AC, Svenda M, Sundqvist A, Moreno-Lopez J, Linne T. (1997) Analysis of the fusion protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: comparative analysis of paramyxovirus F proteins. *Virus Genes.* 14(1):55-61.

Burgess, G. W. (1988) Basic principles in ELISA and variations configuration In: ELISA

Technology in Diagnosis and Research Ed. G. W. Burgess, Queensland, Australia, 27.

Correa, P., Pérez, J., Martínez, A., Coba, A., Córdova, D. 1998. Encuesta Nacional para detectar cerdos seropositivos a Rubulavirus porcino mediante la prueba de inhibición de la Hemaglutinación. Memorias XXXIII Congreso AMVEC. 1998. pp.198-199.

Correa-Girón, P., Martínez, A., Pérez, J., Coba, M. A., Solís, M., Morilla, A., & Zimmerman, J. J. (2002). Vaccination against blue eye disease. Trends in Emerging Viral Infections of Swine, 65-69.

Cuevas-Romero, J. S., Blomström, A. L., & Berg, M. (2015). Molecular and epidemiological studies of Porcine rubulavirus infection—an overview. Infection ecology & epidemiology, 5(1), 29602.

Cuevas-Romero, J.S.; Rivera-Benítez, J.F.; Hernández-Baumgarten, E.; Hernández-Jauregui, P.; Blomström, A-L.; Berg, M.; Baule, C. (2016). Cloning, expression and characterization of potential immunogenic recombinant hemagglutinin-neuraminidase protein of Porcine rubulavirus. Protein Expr Purif. 2016, 128, 1-7. doi: 10.1016/j.pep.2016.08.002. Cuevas-Romero 2016 proteina

De'Ath, G. (1988) ELISA as a Measurement Process: Some statistical Considerations In: ELISA Technology in Diagnosis and Research; Burgess, G. W. (ed.) Graduate School of Tropical Veterinary Science, James Cook University of North Queensland, Townsville, Australia, 120.

Dinter Zvonimir. in Diagnostic Virology J. Moreno-López ED. (1989) Swedish University of Agricultural Sciences, National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden and Swedish International Developing Authority. pp. 30.

Dierksheide, W. C. (1987) Medical Decisions: Interpreting clinical tests; Am. Soc. Mic. News, 53.

Edwards, S., Bushnell S., Jones P. C. and Perry, C. T. (1985) Establishment of statistical base for use of ELISA in diagnostic serology for infectious bovine rhinotracheitis. J. Biol. Standardisation, 13: 243.

Frankena K, Goelma J O. (1991) Programa EPISCOPE. Agricultural University, Dep. of Animal Husbandry, P.O. Box 338, 6700 AH Wageningen, The Netherlands.

Hernández-Jauregui P, Ramirez Mendoza H, Mercado Garcia C, Moreno-Lopez J, Kennedy S. (2004) Experimental porcine rubulavirus (La Piedad-Michoacán virus) infection in pregnant gilts. J Comp Pathol. 130(1):1-6.

Hernández-Jauregui P, Yacoub A, Kennedy S, Curran B, Tellez C, Svenda M, Ljung L, Moreno-Lopez J.(2001) Uptake of porcine rubulavirus (LPMV) by PK-15 cells. Arch Med Res. 32(5):400-9.

Hjertner B, Linne T, Moreno-Lopez J.(1997) Establishment and characterization of a porcine rubulavirus (LPMV) persistent infection in porcine kidney cells. Acta Vet Scand. 38(3):213-24.

Hjertner B, Wiman AC, Svenda M, Berg M, Moreno-Lopez J, Linne T. (1998) Multiple factors including subgenomic RNAs and reduced viral protein expression are associated with a persistent infection by porcine rubulavirus (LPMV). Arch Virol. 143(3):425-39.

Linné T, Berg M, Bergvall AC, Hjertner B, Moreno-Lopez J. (1992) The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. Vet Microbiol. 33(1-4):263-73.

Martin, D. K., Vicente, O., Beccari, T., Kellermayer, M., Koller, M., Lal, R. & Dundar, M. (2021). A brief overview of global biotechnology. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 35(sup1), S5-S14.

McLaren, M. L., Lillywhite, J.E. and Au, A. C. S. (1981) Indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): practical aspects of standardisation and quality control. Med. Lab. Sci. 38: 245.

Mc Neilly, F., Walker, I., Allan, M., Foreste, C., Linné, T., Merza, M., Henandez, J.P., Kennedy, S. and Adai, B. (1997) A comparative study on the use of virus and antibody detection techniques for the diagnosis of La Piedad Michoacan

paramyxovirus (LPMV) infection in pigs. *J. Vy col. Diagn. Invest.* 9: 3-9.

Moreno-López J., Correa, G. P., Martínez, A. and Ericsson, A. (1986) Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. *Archives of Virology* . 91 pp. 221-231.

Nordengrahs, A., Svenda, M., Morenolópez, J., Bergvall, A., Hernandez-Jáuregui, P., Mc. Neilly, F., Allen G., Merza M. (1999) Development of a blocking ELISA for screening antibodies to porcine rubulavirus. *La Piedad Michoacán virus. J. Vy col. Diagn. Invest.* 11 pp 319-323.

Ramírez-Mendoza, H., Hernández, J.P., Reyes, L.J., Zenteno, E., Moreno, L.J. and Kennedy, S. (1997) Lesions in the Reproductive Tract of Boars Experimentally Infected with Porcine Rubulavirus. *J. Comp. Path. Vol. 117* pp. 237-252.

Rima, B., Balkema-Buschmann, A., Dundon, W. G., Duprex, P., Easton, A., Fouchier, R., ... & Consortium, I. R. (2019). ICTV virus taxonomy profile: Paramyxoviridae. *The Journal of general virology*, 100(12), 1593.

Rivera-Benitez, J. F., Martínez-Bautista, R., Pérez-Torres, A., del Carmen García-Contreras, A., Reyes-Leyva, J., Hernández, J., & Ramírez-Mendoza, H. (2013). Persistence of porcine rubulavirus in experimentally infected boars. *Veterinary microbiology*, 162(2), 491-498.

Reyes-Leyva J, Espinosa B, Hernandez J, Zenteno R, Vallejo V, Hernández-Jauregui P, Zenteno E. (1997) NeuAc alpha 2,3gal-glycoconjugate expression determines cell susceptibility to the porcine rubulavirus LPMV. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 118(2):327-32.

Reyes-Leyva J, Espinosa B, Santos G, Zenteno R, Hernandez J, Vallejo V, Zenteno E. (1999) Purification and characterization of the hemagglutinin-neuraminidase of Porcine rubulavirus LPMV. *Glycoconj J.* 16(9):517-22.

Salas-Rojas M, Sánchez-Hernández C, Romero-Almaraz Md Mde L, Schnell GD, Schmid RK, Aguilar-Setien A. (2004)

Prevalence of rabies and LPM paramyxovirus antibody in non-hematophagous bats captured in the Central Pacific coast of Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 98(10):577-84.

Shahbandeh M. Global pork production 2022 y 2023 by country. Abril 2023. <https://www.statista.com/statistics/273232/net-pork-production-worldwide-by-country/>

Stephano, H.A., Gay, G.M., Ramírez T.C. (1988) Encephalitis, reproductive, failure and corneal opacity (blue eyes) in pigs, associated with a paramyxovirus infection in pigs in Mexico *The Veterinary Record.* 122. 6-10.

Stephano, H.A. (1999) Blue Eye Disease. In: *Diseases of swine*, pp 103-112. 8th Edition. Edited by Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W. L. & Taylor, D. J. Ames, Iowa Iowa, State University Press.

Sundqvist A, Berg M, Hernández-Jauregui P, Linne T, Moreno-Lopez J. (1990) The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *J Gen Virol.* 71: 609-13.

Sundqvist A, Berg M, Moreno-Lopez J, Linne T. (1992) The haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other paramyxoviruses revealed the closest relationship to simian virus 5 and mumps virus. *Arch Virol.* 122(3-4):331-40.

Svenda M, Berg M, Moreno-Lopez J, Linne T. (1997) Analysis of the large (L) protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: identification of possible functional domains. *Virus Res.* 48(1):57-70.  
The Code of federal regulations (CFR). Título 9, Cap. 1 Subcap. D. 1997. APHIS. USDA.

Svenda M, Hjertner B, Linne T, Berg M. (2002) Both the P and V proteins of the porcine rubulavirus LPMV interact with the NP protein via their respective C-terminal unique parts. *Virus Res.* 83(1-2):31-41.

Thorner, R.M., Romoin, Q.R. (1981) *Principles and Procedures in the Evaluation of Screening*

# Artículos

for Disease. Public Health Monograph. 67. U.S.A.

Tommy-Linné, Berg, M., Bergvall, A.C., Hjetner, B., Moreno-L. (1992) The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. *Veterinary Microbiology*, 33 pp 263-273.

Taylor, R.N. (1986) Quality Control in Immunoserology In: *Manual of Clinical Laboratory Immunology*; Rose, N.R., Friedman, H. and Fahey, J. L. (eds). Am. Soc. for Microbiol. Washington, D. C., 951.

USDA, United States Department of Agriculture.  
[https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/ivestock\\_poultry.pdf](https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/ivestock_poultry.pdf)

Wardley, R. C. and Crowther, J. R. (1981) *The ELISA in Veterinary Research and Diagnosis*, Martinus Nijhoff, The Hague, The Netherlands.

Wiman AC, Hjertner B, Linne T, Herron B, Allan G, McNeilly F, Adair B, Moreno-Lopez J, Berg M. (1998) Porcine rubulavirus LPMV RNA persists in the central nervous system of pigs after recovery from acute infection. *J Neurovirol.* 5:545-52.

Wright, P.F., Nilsson, E. Van Rooij, E.M.A., Lelenta, M., Jeggo, M.H. (1993) Standardisation and validation of ELISA for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 12 (2), 435-450.



## Importancia del diagnóstico molecular en las enfermedades que afectan a las abejas melíferas

Marisela Leal-Hernández \*<sup>1</sup>, Karla Itzel Alcalá Escamilla<sup>2</sup>, Fernando Cerón Téllez<sup>1</sup>.

1. CENID SAI (Palo alto), <sup>2</sup> CENID FISILOGIA Y MEJORAMIENTO ANIMAL.

<sup>1</sup>. Carretera México Toluca Km 15.5 col Palo Alto Cuajimalpa CDMX. CP 05110, México.

<sup>2</sup>. Km1 Carretera a Colón, Ajuchitlán, Colón, Querétaro, CP: 76280. México

leal.marisela@inifap.gob.mx y gopherus@yahoo.com

### Resumen

El impacto de las abejas y de la apicultura radica en los beneficios que estas generan al medio ambiente y en la cadena productiva de alimentos. Como cualquier organismo, las abejas son afectadas por agentes patógenos. Algunos síntomas de las enfermedades pueden ser detectados en campo; sin embargo las evaluaciones clínicas iniciales basadas en los signos visibles a menudo resultan insuficientes, siendo necesarios análisis de laboratorio para su confirmación. Las técnicas de biología molecular se han vuelto herramientas eficientes en el diagnóstico de las enfermedades y se pueden realizar a partir de diferentes tipos de muestras ante la sospecha de patógenos. Con la amplificación de genes de interés a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa es posible la detección específica, aún en muestras de abejas asintomáticas.

**Palabras Claves:** Abejas, Enfermedades, Diagnostico

### Abstract

The impact of bees and beekeeping lies in the benefits they generate for the environment and the food production chain. Like any organism, bees are affected by pathogens. Some disease symptoms can be detected in the field; however, initial clinical evaluations based on visible signs are often insufficient, and laboratory analysis is necessary for confirmation. Molecular biology techniques have become efficient tools in disease diagnosis and can be performed on different types of samples. The amplification of genes of interest through the Polymerase Chain Reaction makes specific detection of suspected pathogens possible, even in asymptomatic bee samples.

**Key Words:** Abejas melíferas, enfermedades, diagnóstico, honey bees, diseases, diagnostic

### Introducción

Las abejas (*Apis mellifera* L.) son insectos considerados económica y ecológicamente importantes por los beneficios que proporcionan, al ser los principales polinizadores permiten conservar y mantener la biodiversidad de numerosas especies de plantas silvestres y cultivadas, además de

ayudan en el mantenimiento y la regeneración de los ecosistemas (Le Conte 2008, Nanetti 2021).

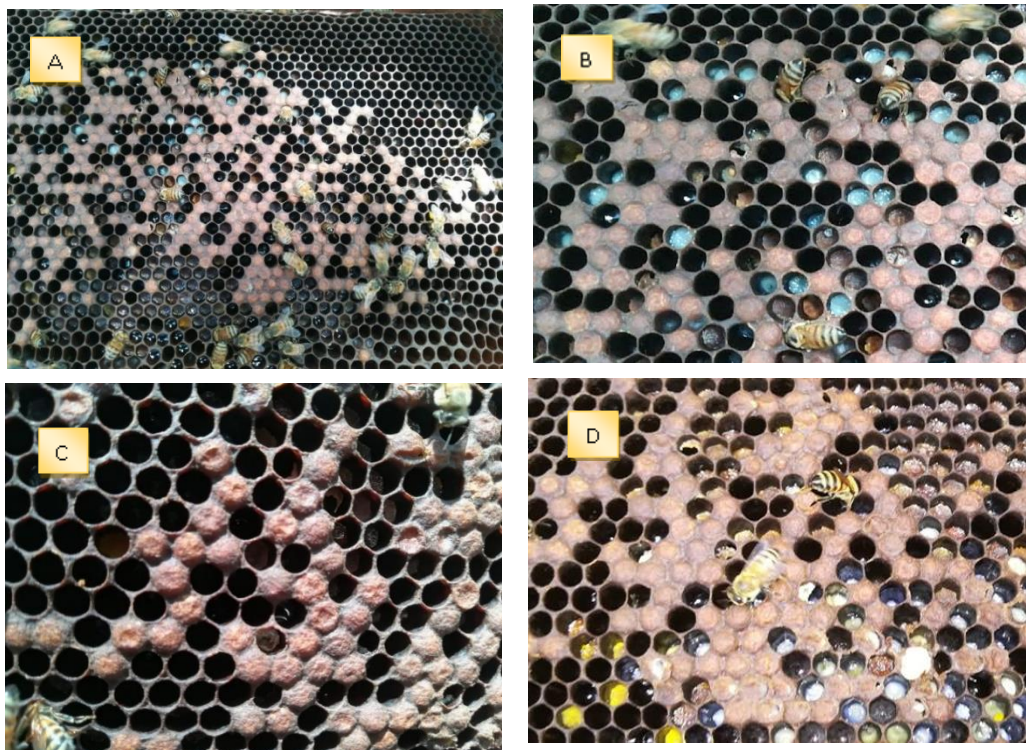
En México la actividad apícola es considerada importante por el impacto que genera principalmente la producción de miel. En el año 2022, nuestro país se ubicó en el quinto lugar como exportador y a nivel mundial ocupó el noveno lugar como

# Artículos

productor de miel con 62,079 toneladas (Panorama Agroalimentario 2022).

De forma habitual, en el apiario se debe realizar una revisión rutinaria para la detección temprana de enfermedades, siendo clave para evitar el contagio y la dispersión entre las colonias. Durante estas revisiones solo se puede realizar un diagnóstico presuntivo inicial basado en la presencia de signos, dentro de los que podemos observar, en el caso de enfermedades de la cría: Panales con un patrón salteado de postura, opérculos oscuros hundidos, perforados o con aspecto grasiento, cambios de coloración en las crías, restos de larvas o escamas café oscuro o negras y quebradizas, restos viscosos o de

consistencia elástica que carecen de forma, puede haber presencia de olores diferentes ácidos o agrios (figura 1) (Garrido 2013, Espinosa 2016, OIE 2018). En las abejas adultas se pueden identificar: abejas que presentan temblor de alas, abejas con parálisis, o con incapacidad para volar (arrastrándose) cerca de la entrada de la colmena, desprovistas de vellosidades, con coloración negruzca y abejas muertas o en el caso de infecciones ocasionadas por virus suelen ser asintomáticos y cuando llegan a observarse signos, estos son compartidos con otras enfermedades (Figura 2) (SADER 2019). Desafortunadamente, varios de los signos que se pueden identificar en campo también pueden ser un indicador de otros problemas, como una reina vieja o intoxicación de las abejas, consumo de alimento fermentado, etc.,



**Figura 1.** Principales signos en el caso de enfermedades de la cría, a) patrón de cría salteado con gran cantidad de celdas vacías, b) crías afectadas con cambios de coloración, c) opérculos oscuros hundidos, perforados, d) restos de larvas o escamas café oscuro o negras Fotos Leal Hernández Marisela.

# Artículos



**Figura 2.** Algunos signos en el caso de enfermedades de las abejas adultas: abejas desprovistas de vellosidades, abejas con coloración negruzca, abejas más pequeñas. Fotos Leal Hernández Marisela.

por lo que es necesario realizar un diagnóstico detallado.

Ante la sospecha de enfermedad, tras la identificación de los signos en la colonia, es necesario realizar su confirmación con un análisis de laboratorio rápido y específico de forma más certera hacia el patógeno de interés y así establecer un diagnóstico definitivo y posteriormente elaborar un plan de control y prevención de enfermedades, por lo que el objetivo de este artículo fue realizar una revisión de literatura sobre la importancia, metodologías y efectividad de realizar un diagnóstico a nivel molecular en algunas enfermedades que afectan a la abeja *Apis mellifera* L.

En la actualidad, las técnicas de biología molecular se han vuelto herramientas eficientes, de gran ayuda en el diagnóstico de las enfermedades para muchas especies animales productivas, incluyendo las abejas. El diagnóstico de enfermedades en una colonia se puede realizar a partir de diferentes tipos de muestras y productos apícolas como: larvas (cría), abejas (insecto adulto), miel o polen. Pruebas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que se basan en la amplificación y análisis de uno o más genes o segmentos genómicos, que permiten detectar, identificar

y cuantificar de forma certera con alta sensibilidad y especificidad la presencia de algún patógeno, incluso pudiendo detectarlos aún sin la presencia de signos clínicos de la enfermedad, también permite realizar análisis de co-infecciones, descripción de nuevas especies, determinar asociaciones entre genotipos y fenotipos y se pueden realizar estudios de estructura poblacional (Rivière 2013, OIE, 2018; Galajda *et al.*, 2021, Lannutti 2022). Desde que se empezó a emplear este tipo de herramientas se han diseñado una gran cantidad de PCR's para la detección de las diferentes enfermedades (Antúnez 2004, Rivière 2013).

Las enfermedades que afectan a las abejas que son consideradas de mayor importancia e impacto, porque pueden representar una amenaza para su salud y productividad, se dividen en 4 grupos, las producidas por bacterias: Loque europea, Loque americana; las producidas por parásitos: varroosis, acariosis; las producidas por hongos: Aspergilosis, Cría de piedra, Vairimorphosis (Nosemosis) y las producidas por virus: Virus de las alas deformes, Virus de las celdas reales negras, Virus de la parálisis aguda, Virus de la parálisis aguda Israelí, Virus de la cría ensacada y Virus de Cachemira son los más importantes por el grado de daño que pueden llegar a ocasionar. También están las

plagas que afectan a las abejas como son polilla de la cera, aethinosis y hormigas (Al Naggar 2020). Patologías como la varroosis y las plagas, se pueden identificar y diagnosticar a simple vista, por lo que el desarrollo de los diagnósticos moleculares se ha enfocado en las enfermedades más complejas de diagnosticar.

## **Principales enfermedades ocasionadas por bacterias**

La loque americana (American foulbrood AFB) producida por la bacteria *Paenibacillus larvae*; y la loque europea (European Foulbrood EFB), producida por *Melissococcus plutonius*, son enfermedades que se encuentran extendidas en todo el mundo y las cuales propician la disminución de las colonias. Ambas infectan a las larvas a través de la vía oral, por el consumo de alimento contaminado con las bacterias ofrecido por las abejas adultas quienes pueden ser portadoras asintomáticas pasivas o activas. En el caso de Loque americana, las esporas al ser consumidas se desarrollan en el intestino; la infección debe suceder dentro de las primeras horas después de la eclosión del huevo, matando a la cría en la etapa de prepupa o pupa, *P. larvae* tiene la capacidad de producir millones de esporas en cada larva infectada y con tan solo la ingesta de diez o menos esporas en el alimento es suficiente para iniciar una infección mortal (Chan 2009). Las larvas aumentan su resistencia a medida que se desarrollan y después de 53 horas de haber eclosionado las larvas no pueden ser infectadas. Las abejas adultas no son susceptibles a la Loque americana, pero las esporas pueden permanecer en su tracto digestivo por más de dos meses, favoreciendo su diseminación al momento de alimentar a la cría (Ribièrre 2007, Genersch 2010, Shimanuki 2010, OIE 2018). Respecto a Loque europea, la enfermedad se manifiesta sin importar la etapa de desarrollo de la cría. (Dainat 2018, OIE 2018).

El diagnóstico de estas enfermedades bacterianas se basa en la presencia de

signos clínicos, así como en la identificación del agente etiológico, su identificación se puede realizar a partir del aislamiento tanto de *P. larvae* y *M. plutonius* y su posterior identificación mediante la técnica de PCR o qPCR, que puede ser realizada a partir de cultivos bacterianos puros, larvas o miel (Bakonyi 2003, OIE 2018, Truong 2023). En el caso de *M. plutonius* su cultivo resulta complejo debido a los requerimientos nutricionales de la bacteria, además de que pueden crecer en el cultivo las bacterias secundarias asociadas a la Loque europea, bacterias presentes debido a que las larvas infectadas tienen una microflora variada que incluye diferentes tipos de bacterias saprófitas como el *Bacillus alvei*, *Bacillus laterosporus* y *Achromobacter eurydice*, estas bacterias no forman parte del ciclo infeccioso y se han reportado de manera normal en larvas aparentemente sanas (Sánchez- Esgua 2023).

Dainat, *et al.*, en 2018 diseñaron una qPCR triple para la detección de Loque europea y Loque americana (incluyendo ERIC tipo I a IV) y un gen específico de la abeja como control de la PCR, con la finalidad de obtener un diagnóstico precoz, utilizando herramientas de detección precisas, rápidas, baratas y fáciles de manejar. Los autores reportan que en 2008 cuando Roetschi y colaboradores implementaron el primer sistema de PCR en tiempo real aumentó drásticamente la prevalencia de Loque europea en la última década, pues pudieron detectar la enfermedad de forma precisa, demostrando la necesidad de tener herramientas adecuadas de diagnóstico para poder tener un resultado más certero y a tiempo para establecer métodos de control adecuados.

En México, a partir del año 2014 nuestro grupo de trabajo diseñó una PCR en punto final para cada uno de los diferentes patógenos, en el caso de Loque europea se logró la detección de *M. plutonius* mediante PCR en abejas adultas asintomáticas logrando amplificar un fragmento de 399 pb

en 61.9 % (179 de 293) del total de las muestras analizadas, demostrando la importancia de realizar un diagnóstico a nivel de laboratorio y el impacto que tiene la

presencia de la bacteria en las abejas adultas, a pesar de no presentar la enfermedad (Tabla 1). Si alguna cría afectada por las bacterias logra sobrevivir hasta la etapa adulta, puede transmitir las bacterias a las crías continuando el ciclo de infección.

**Tabla 1.** Prevalencias reportadas en diferentes estudios con el uso de PCR

Enfermedad	Prevalencia	Número de muestras	Referencia
Loque europea	61.9 %	179/293	Datos no publicados
(Vairimorphosis) Nosemosis	91.7 %	102/111	Elizalde 2014
Virus de las alas deformes	51.21 %	169/330	Leal 2021
Virus de la parálisis aguda israelí	7.8 %	39/501	Leal 2016
Virus de la cría ensacada	0.68 %		Leal 2016
Virus de las celdas reales negras	34.9 %	74/212	Leal 2015

### **Principales enfermedades ocasionadas por parásitos**

La acariosis, conocida también como acarapisosis, acariasis, traqueítis acariana, acarinosis o enfermedad de la isla de Wight es una enfermedad causada por el ácaro *Acarapis woodi* Rennie, endoparásito obligado del sistema respiratorio que se alimenta de la hemolinfa del hospedador y que afecta a los adultos de las tres castas de abejas. El ácaro se propaga por contacto directo, aunque solamente son susceptibles las abejas jóvenes que tienen menos de 10 días de emergidas. Los ácaros se encuentran principalmente en las tráqueas protorácicas y en ocasiones en los sacos aéreos de la cabeza, tórax y abdomen (Villa, 2007; OIE, 2018). El diagnóstico se debe de realizar en laboratorio mediante un examen microscópico de las tráqueas en abejas adultas. Para realizarlo se toma una muestra de abejas adultas en el interior de la colonia y se realiza una disección para exponer el primer par de tráqueas y posteriormente observar en el microscopio estereoscópico lesiones de queratinización y/o melanización,

estas lesiones son realizadas por el ácaro al momento de alimentarse y son consideradas típicas a la presencia del *A. woodi*; en ocasiones también se puede observar la presencia de los ácaros en el interior de las tráqueas (OIE, 2018).

La metodología de PCR ha demostrado ser una técnica rápida, eficaz y sensible en comparación con el examen microscópico. Kojima en 2011, para la detección de *Acarapis*, estableció una PCR para amplificar cuatro porciones de la subunidad I del citocromo oxidasa mitocondrial de las especies de *A. woodi*, *A. dorsalis* y *A. externus*, con base a las secuencias de ADN registradas en el Genbank, mientras que Quintana *et al.*, en 2019 con el uso de qPCR obtuvieron una sensibilidad del 100%, una especificidad del 91.67% y una precisión del 91.89%; demostrando que el uso de pruebas basadas en la tecnología molecular son una herramienta efectiva para el diagnóstico de la enfermedad.

## **Principales enfermedades ocasionadas por hongos**

La *Vairimorphosis* conocida como nosemosis, nosemiasis o enfermedad de la desaparición espontánea, es causada por los recientemente reclasificados microsporidios: *Vairimorpha apis* y *V. ceranae* (Tokarev 2020, OIE, 2018). Estos hongos poseen la capacidad de esporular, por lo que la enfermedad puede estar presente durante todo el año en la colonia. *Vairimorpha* spp. afecta a las tres castas de abejas adultas, produce una enfermedad intestinal, invasiva y contagiosa que se localizan y desarrollan en el interior de las células epiteliales del intestino medio de las abejas, ocasionando un debilitamiento progresivo, el acortamiento de la vida del hospedador y de no controlarse, la pérdida de la colonia (Formato *et al.*, 2022; Iorizzo *et al.*, 2022, Tokarev 2020). Para determinar la presencia de la enfermedad se deben de tomar muestras de abejas adultas en la entrada de la colmena y recurrir al diagnóstico de laboratorio a través del método Cantwell, en el que se utiliza una muestra de abdómenes macerados de abejas, con la finalidad de observar las esporas del patógeno bajo el microscopio, sin embargo; con este método no es posible distinguir entre los dos tipos de *Vairimorpha* y puede no detectar bajos niveles de infestación (Prendas-Rojas *et al.*, 2018). El uso de la PCR ha demostrado ser una prueba muy sensible que permite detectar el parásito aún en niveles muy bajos de infección.

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2018), describe el uso de una de PCR múltiple para identificar a *V. apis* y *V. ceranae* al mismo tiempo, amplificando fragmentos del gen 16S ARNr (=ARNr SSu) obteniendo un producto de 143 bp para *V. ceranae* y 224 bp para *V. apis*. Elizalde *et al.*, en 2014 ejecutaron la detección e identificación de *V. ceranae* y *V. apis* en colonias de abejas melíferas donde de manera previa realizaron un análisis por microscopía encontrando el 83.8% (93/111) de las muestras positivo a *Vairimorpha* spp y tras realizar la

comparación de los resultados que se obtuvieron, con la técnica de PCR en donde se identificó el 91.7% (102/111) de las muestras como positivas (Tabla 1), de las cuales 66.6% fueron a *V. ceranae*, 56.7% fue *V. apis* y el 31.5% presentaron co-infección con ambas especies de microsporidios, en este estudio demuestra que con la técnica de PCR se logró detectar un mayor número de muestras positivas al ser más sensible que la microscopía.

## **Principales enfermedades ocasionadas por virus**

Estas enfermedades se encuentran muy extendidas tanto en las abejas manejadas como en colonias silvestres, usualmente las infecciones virales en abejas no se asocian a los signos clínicos, en ciertos casos puede ocasionar una enfermedad seria o ser mortal en algunas abejas o colapsar las colonias enteras. Todo esto se ha documentado como un importante promotor en las pérdidas de colonias de abejas melíferas, algunos estudios reportan que se pueden compartir los virus de abejas melíferas con poblaciones de abejas silvestres y abejorros, particularmente cuando son transmitidas por el ácaro *Varroa destructor* el cual actúa como vector de los virus, (Berényi *et al.*, 2006, Dalmon *et al.*, 2021; Fearon and Tibbetts 2021). El ácaro se alimenta de la hemolinfa o del cuerpo graso de las abejas aumentando su capacidad para actuar como vector de varios virus, lo que da lugar a una ruta de transmisión viral, ayudando a la propagación y resurgimiento de varios virus de abejas (Chen and Siede 2007). Entre los virus que se han visto implicados en la disminución de colonias se encuentran el virus de cachemira (VC) (Johnson *et al.*, 2009), el virus de la parálisis lenta (VPL) (Neumann and Carreck 2010), el virus de la parálisis aguda israelí (VPAI) (Cox-Foster *et al.*, 2007), el virus de la parálisis aguda (VPA) (Genersch *et al.*, 2010) y el Virus de las alas deformes (VAD) (Francis, Nielsen, and Kryger 2013).

En el caso de las enfermedades virales se cuenta con el establecimiento de diferentes

PCR's para poder detectar y cuantificar virus. La mayoría de estas detectan solo una pequeña porción del genoma viral o las proteínas de la cápside. Los métodos para la detección del virus de las abejas melíferas se basan en la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) ya que todos los virus que afectan a las abejas son de tipo ARN. Varios autores han establecido RT-PCR o qRT-PCR para detectar en muestras de abejas asintomáticas los virus KBV, SBPV, IAPV, ABPV, DWV, (Tentcheva 2004, Gauthier 2007, Molineri en 2017). En 2021 Huang y colaboradores establecen una RT-PCR empleando como muestra hemolinfa para la detección viral.

En 2015 Leal, *et al.*, detectaron en dos regiones apícolas de México, el virus de las celdas reales negras (VCRN) por medio de RT-PCR en abejas obreras aparentemente sanas. El 34.9% (74/212) de las muestras de abejas obreras adultas estudiadas fueron positivas (Tabla 1) y comprobados mediante secuenciación y tras realizar el análisis se encontró un 95 % de similitud con las secuencias del VCRN reportadas en el Genbank. El VCRN afecta principalmente a las crías de las abejas reina y este estudio fue realizado en abejas obreras, quienes podrían actuar como portadoras y transmisoras del virus diseminando la enfermedad, al momento de alimentar a las crías de las reinas y de ahí la importancia de la detección del VCRN en estas abejas.

Leal, *et al.*, en 2016, desarrollaron una PCR para detectar VPAI y determinaron una prevalencia del 7.8% de un total de 501 muestras de abejas melíferas adultas asintomáticas con un porcentaje de similitud del 99% con las secuencias reportadas para el VPAI. En el mismo año, el grupo de trabajo también realizó la detección de virus de la cría ensacada en abejas melíferas en dos regiones apícolas de México, empleando la técnica de RT-PCR obteniendo una prevalencia del 0.68% para la región de la Península y del 6.2% para el Altiplano siendo relativamente baja en ambas regiones

(Tabla 1). La enfermedad de la cría ensacada rara vez adquiere carácter epizootico y por lo común presenta un curso inofensivo, así como lo observaron en este trabajo.

En 2021 Leal, *et al.*, detectaron mediante RT-PCR la presencia del virus de las alas deformes en abejas adultas asintomáticas y buscaron su relación con *Varroa destructor*, determinando primeramente los niveles infestación de varroa encontrando una prevalencia del 65.75% del total (330) de las muestras evaluadas, mientras que VAD se logró detectar por RT-PCR en el 51.21 % (169 de 330) del total de las muestras, de las cuales solo el 37.9% presento algún grado de infestación con varroa y el 13.6 % (145) fue negativo al ácaro pero positivo al virus y el 26.66% de muestras negativas al virus fueron positivas a varroa con algún grado de infestación (Tabla 1). Este tipo de estudios muestra la importancia de realizar un diagnóstico integral a nivel de laboratorio y también que no porque varroa esté presente necesariamente van a estar infectadas con el virus. Sin embargo; es necesario siempre mantener los niveles de infestación del parásito lo más bajo posible, ya que a niveles elevados aumenta la probabilidad de transmisión de enfermedades a las colonias de abejas débiles, pues es considerado el principal factor predisponente para los virus ya por su forma de alimentarse aumenta su capacidad para actuar como vector ayudando a la propagación de diferentes virus (Berényi *et al.*, 2006, Chen and Siede 2007, Dalmon *et al.*, 2021; Fearon and Tibbetts 2021).

## Conclusiones

Los resultados obtenidos en México y en otras partes del mundo permiten confirmar que el diagnóstico molecular a través de las técnicas de PCR son una potente herramienta no solo para diagnosticar enfermedades, sino también para investigar los agentes patógenos, generar información para conocer y entender mejor las diferentes enfermedades y el fenómeno de la pérdida

de colmenas (Antúnez 2004, Rivière 2013). Este tipo de análisis permite diseñar medidas de control oportunas para diferentes patologías, sin importar si se trata de virus, bacterias o parásitos.

Siempre será mejor realizar un manejo preventivo, el cual incluye mantener colonias sanas, fuertes y bien alimentadas, además de realizar de manera periódica muestreos al azar en al menos el 10% de las colonias aparentemente sanas que conforman un apiario, para conocer el estatus sanitario de la unidad de producción. Es muy importante tomar en cuenta los posibles vectores y transmisores de las diferentes enfermedades, como pueden ser las abejas adultas asintomáticas y el ácaro *V. destructor*. Otra recomendación es fomentar la vinculación entre productores e instituciones gubernamentales y de educación para apoyarlos en los manejos preventivos, diagnóstico y control de las enfermedades, esto con la finalidad de mantener sanas a las abejas y mejorar los niveles de producción.

## Referencias

Le Conte, Y., & Navajas, M. (2008). Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 27(2), 499-510.

Nanetti, A.; Bortolotti, L.; Cilia, G. (2021), Pathogens Spillover from honey bees to other Arthropods. *Pathogens*, 10, 1044. <https://doi.org/10.3390/pathogens10081044>.

Panorama Agroalimentario 2022. *Panorama\_Agroalimentario\_2022.pdf*-GoogleDrive <https://drive.google.com/file/d/1jVWS4EFKK7HGwQOBpGeIjUyaDT8X8lyz/view>

Garrido-Bailón E, Higes M, Martínez-Salvador A, Antúnez K, Botías C, Meana A, Prieto L, Martín-Hernández R. The prevalence of the honeybee brood *pathogens Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae* and

*Melissococcus plutonius* in Spanish apiaries determined with a new multiplex PCR assay. *Microb Biotechnol*. 2013 Nov;6(6):731-9. doi: 10.1111/1751-7915.12070.

Espinosa-Montaña LG. (2013). CRÍA ENSACADA En: Leal-Hernández M y Arechavaleta VME. Principales Enfermedades de las Abejas en México. Ed. INIFAP. 90-95.

OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. Chapter 3.2.1. Acarapisosis de las abejas melíferas (Infestación de las abejas melíferas por *Acarapis woodi*) In: OIE Terrestrial Manual 2018.

OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. Chapter 3.2.4. Nosemosis de las abejas melíferas. In: OIE Terrestrial Manual 2018.

OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. Chapter 3.2.2. Loque americana de las abejas melíferas (infección de las abejas melíferas por *Paenibacillus larvae*) In: OIE Terrestrial Manual 2018.

OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. Chapter 3.2.3. Loque europea de las abejas melíferas (infección de las abejas melíferas por *Melissococcus plutonius*) In: OIE Terrestrial Manual 2018.

SADER. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. Manual de Buenas prácticas pecuarias en la producción de miel. 4a Edición, 2019.

Al Naggar Y, Paxton RJ. Mode of transmission determines the virulence of Black Queen Cell virus in adult honey bees, posing a future threat to bees and apiculture. *Viruses*. 2020;12(5):535.

Sánchez-Esgua M, Veloz-Rendón JS, García Barrera LJ, Peralta CMC, Cruz-Nicolás G, Detección e Identificación mediante PCR de *Melissococcus plutonius* agente causal de la Loque europea en larvas de abeja. 29 Congreso Internacional de Actualización Apícola. 2023.



- Rivière MP, Ribière M, Chauzat MP. 2013. Recent molecular biology methods for foulbrood and noseosis diagnosis. *Rev Sci Tech.* Dec;32(3):885-92. doi: 10.20506/rst.32.2.2207.
- Galajda R, Valencakova A, Sucik M & Kandrácová P (2021) Nosema disease of european honey bees. *J. Fungi.* 7,714.
- Lannutti L, Gonzales FN, Dus Santos MJ, Florin-Christensen M, Schnittger L. Molecular Detection and Differentiation of Arthropod, Fungal, Protozoan, Bacterial and Viral Pathogens of Honeybees. *Vet Sci.* 2022 May 2; 9(5): 221. doi: 10.3390/vetsci9050221.
- Antúnez K, D'Alessandro B, Piccini C, Corbella E, Zunino P. Presencia de esporas de la bacteria causante de Loque americana en mieles de Uruguay. INIA URUGUAY. 2004: 335. Disponible en: [http://www.inia.org.ur/publicaciones/documentos/le/ad/2004/ad\\_335.pdf](http://www.inia.org.ur/publicaciones/documentos/le/ad/2004/ad_335.pdf).
- Bakonyi T, Derakhshifar I, Grabensteiner E, and Nowotny N. Development and Evaluation of PCR Assays for the Detection of *Paenibacillus* larvae in Honey Samples: Comparison with Isolation and Biochemical Characterization. *Appl Environ Microbiol.* 2003: 1504-1510.
- Truong AT, Yoo MS, Seo SK, Hwang TJ, Yoon SS, Cho YS. Prevalence of honey bee pathogens and parasites in South Korea: A five-year surveillance study from 2017 to 2021. *Heliyon.* 2023 Feb 4;9(2): e13494. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e13494.
- Dainat B, Grossar D, Ecoffey B, Haldemann C. (2018). Triplex real-time PCR method for the qualitative detection of European and American foulbrood in honeybee. *J Microbiol Methods.* Mar; 146:61-63. doi: 10.1016/j.mimet.2018.01.018.
- Formato G, Rivera-Gomis J, Bubnic J, Martín-Hernández R, Milito M, Cropp S & Higes M (2022) Nosemosis Prevention and Control. *Appl. Sci.* 12, 783.
- Elizalde SM, Leal HM, Arechavaleta VME, Tenorio GVR, Martínez PJF, Nieto LS. Detección e identificación de *Nosema ceranae* y *Nosema apis* en colonias de abejas de Yucatán y Campeche. *L Reunión Nacional De Investigación Pecuaria.*
- Prendas-Rojas JP, Figueroa-Mata G, Ramírez-Montero M, Calderón-Fallas RA, Ramírez-Bogantes M & Travieso-González CM (2018). Diagnóstico automático de infección por nosemosis en abejas melíferas mediante procesamiento de imágenes. *Tecnología en Marcha.* 31(2).
- Villa JD. (2007) Influence of worker age on the infestation of resistant and susceptible honey bees (*Apis mellifera*) with tracheal mites (*Acarapis woodi*). *Apidologie* 38: 573-578.
- Kojima Y, Yoshiyama M, Kimura K & Kadowaki T (2011) PCR-based detection of a tracheal mite of the honey bee *Acarapis woodi*. *J. Invertebr. Pathol.* 108: 135-137.
- Berényi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Köglberger H and Nowotny N. Occurrence of Six Honeybee Viruses in Diseased Austrian Apiaries. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. 72:4:2414- 2420.
- Dalmon, Anne, Virgine Diévert, Maxime Thomasson, Romain Fouque, Bernard E. Vaissière, Laurent Guilbaud, Yves le Conte, and Mickaël Henry. 2021. 'Possible Spillover of Pathogens between Bee Communities Foraging on the Same Floral Resource'. *Insects* 12(2):122. doi: 10.3390/insects12020122.
- Iorizzo M, Letizia F, Ganassi S, Testa B, Petrarca S, Albanese G, Di Criscio D & De Cristofaro A (2022) Recent Advances in Biocontrol of Nosemosis in Honey Beer (*Apis mellifera* L.). *J. Fungi.* 8, 424.
- Fearon, Michelle L., and Elizabeth A. Tibbetts. 2021. 'Pollinator Community Species Richness Dilutes Prevalence of Multiple Viruses within Multiple Host Species. *Ecology* 102(5). doi: 10.1002/ecy.3305.

- Alippi AM, López AC and Aguilar OM. A PCR-based method that permits specific detection of *Paenibacillus* larvae subsp. larvae, the cause of American Foulbrood of honey bees, at the subspecies level. *Lett Appl Microbiol*. 2004; (39): 25–33.
- Chen YP y Siede R. Honey Bee Viruses, *Advances in Virus Research* 2007; 70: 33-80.
- Johnson, Reed M., Jay D. Evans, Gene E. Robinson, and May R. Berenbaum. 2009. 'Changes in Transcript Abundance Relating to Colony Collapse Disorder in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(35):14790–95. doi: 10.1073/pnas.0906970106.
- Neumann, Peter, and Norman L. Carreck. 2010. 'Honey Bee Colony Losses'. *Journal of Apicultural Research* 49(1):1–6. doi: 10.3896/IBRA.1.49.1.01.
- Cox-Foster, Diana L., Sean Conlan, Edward C. Holmes, Gustavo Palacios, Jay D. Evans, Nancy A. Moran, Phenix-Lan Quan, Thomas Briese, Mady Hornig, David M. Geiser, Vince Martinson, Dennis vanEngelsdorp, Abby L. Kalkstein, Andrew Drysdale, Jeffrey Hui, Junhui Zhai, Liwang Cui, Stephen K. Hutchison, Jan Fredrik Simons, Michael Egholm, Jeffery S. Pettis, and W. Ian Lipkin. 2007. 'A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder'. *Science* 318(5848):283–87. doi: 10.1126/science.1146498.
- Genersch, Elke, Werner von der Ohe, Hannes Kaatz, Annette Schroeder, Christoph Otten, Ralph Bückler, Stefan Berg, Wolfgang Ritter, Werner Mühlen, Sebastian Gisder, Marina Meixner, Gerhard Liebig, and Peter Rosenkranz. 2010. 'The German Bee Monitoring Project: A Long Term Study to Understand Periodically High Winter Losses of honey bee Colonies'. *Apidologie* 41(3):332–52. doi: 10.1051/apido/2010014.
- Francis, Roy M., Steen L. Nielsen, and Per Kryger. 2013. 'Varroa-Virus Interaction in Collapsing Honey Bee Colonies'. *PLoS ONE* 8(3): e57540. doi: 10.1371/journal.pone.0057540.
- Tentcheva D., Gauthier L., Zappulla N., Dainat B., Cousserans F., Colin M.E., Bergoin M. 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl Environ Microbiol.*; 70: 7185-7191.
- Gauthier L., Tentcheva D., Tournaire M., Dainat B., Cousserans F., Colin M.E., Bergoin M. Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. *Apidologie*. 2007; 38: 426-436.
- Molineri AI, Pacini Adriana, Giacobino Agostina, Bulacio-Cagnolo Natalia, Aignasse Andrea, Zago Luis, Fondevila Norberto, Ferrufino Cecilia, Merke Julieta, Orellano Emanuel, Bertozzi Ezequiel, Pietronave Hernán, Signorini Marcelo. (2017) Prevalence of honey bee (*Apis mellifera*) viruses in temperate and subtropical regions from Argentina. *Rev Argent Microbiol* 49(2):166-173.
- Huang S, Li J, Zhang Y, Li Z, Evans JD, Rose R, Gilligan TM, LeBrun A, He N, Zheng T, Zhang T, Hamilton M, Chen YP. 2021. A novel method for the detection and diagnosis of virus infections in honey bees. *J Virol Methods*. 293:114163. doi: 10.1016/j.jviromet.2021.114163.
- Leal HM, Elizalde SM, Dainat B, Arechavaleta VME, Tenorio GVR, Carrillo ML. Detección del Virus de las Celdas Reales Negras en *Apis mellifera* en dos regiones apícolas de México. 22º Congreso Internacional de Actualización Apícola, Puebla del 27 al 29 de mayo de 2015.
- Leal HM, Elizalde SM, Arechavaleta VME, Dainat B. Detección del virus de la parálisis aguda israelí en abejas melíferas en México. 23º Congreso Internacional de Actualización Apícola, Mérida. 8 al 10 junio de 2016.

# Artículos

Leal HM, Elizalde SM, Arechavaleta VME, Dainat B. Detección del virus *Morator aetatulas* en abejas melíferas en dos regiones apícolas de México. Reunión Internacional de Ciencias Veterinarias FMVZ-UNAM. 1 al 3 de junio de 2016.

Leal-Hernández M, Cerón-Téllez Fernando, Vivas-Rodríguez Jorge Ariel, Moguel-Ordoñez Yolanda Beatriz, Soto-Ruíz Lilia, Arechavaleta-Velasco Miguel Enrique, Córdova-López Dionisio.

Virus de las alas deformes y su relación con varroa en colmenas de abejas melíferas. LVI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Memoria. Ciudad de México, 10-12 de nov. 2021.

Tokarev Y.S., Huang W.-F., Solter L.F., Malysh J.M., Becnel J.J., Vossbrinck C.R. (2020). A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics. *Journal of Invertebrate Pathology* 169107279. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107279>.



[www.smbb.com.mx](http://www.smbb.com.mx)