

Identificación molecular de aislados de *Anaplasma marginale* en México mediante el gen *msp1a*

Molecular identification of *Anaplasma marginale* isolates in Mexico using the *msp1a* gene.

Elizabeth Salinas Estrella¹, Mayra Elizeth Cobaxin Cárdenas¹, Alex Sebastian Hernández Álvaro¹, Itzel Amaro Estrada¹, Jesús Francisco Preciado de la Torre¹, Sergio D. Rodríguez Camarillo¹.

¹ Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Carretera Cuernavaca-Cuatla 8534, Col. Progreso, Jiutepec, Mor. C.P. 62574.

Resumen

La anaplasmosis bovina es una enfermedad, conocida coloquialmente como vaca amarilla, que ocasiona grandes pérdidas económicas a las unidades de producción bovina en zonas donde la enfermedad es endémica, debido principalmente a la dificultad de introducir ganado mejorado en estas regiones. Esta enfermedad es causada por un patógeno del orden de los Rickettsiales que infecta los eritrocitos de los bovinos originando anemia y, con ello, disminución o pérdida de la producción de carne y leche; puede ocasionar la muerte a los animales adultos a la primoinfección y generar disminución de la capacidad reproductiva por la dificultad para eliminar la bacteria del organismo. Por ello, en los animales que sobreviven la primera infección, pueden generarse ciclos de rickettsemia que contribuyen a la dificultad de mantener al hato en buen estado de salud. En México no existen vacunas comerciales para esta enfermedad, debido a que el patógeno causante, *Anaplasma marginale*, es un organismo con una diversidad genética muy grande que produce a su vez una gran variabilidad antigénica. Se ha demostrado en el país y en el mundo que existe una gran cantidad de cepas circulantes en los hatos bovinos, mediante la caracterización molecular del gen *msp1a*, el cual codifica para una proteína de membrana con un fragmento altamente variable caracterizada por la presencia de repetidos de aminoácidos en tándem. En este trabajo se realizó la identificación molecular de diferentes aislados y se encontraron repetidos muy diversos a los anteriormente reportados en México y en el mundo.

Palabras Claves: *Biología Pecuaria, vaca amarilla, Respuesta inmune, Vacunas, Diagnóstico, Bovinos.*

Abstract

Bovine anaplasmosis is a disease that causes great economic losses to cattle production units in areas where the disease is endemic, mainly due to the difficulty of introducing improved cattle in these regions. This disease is caused by a pathogen of the Rickettsial order that infects the erythrocytes of cattle, causing anemia and, with it, a decrease or loss of meat and milk production; it can cause the death of adult animals upon primary infection and generate a decrease in reproductive capacity due to the difficulty in eliminating the bacteria from the organism. Therefore, in animals that survive the first infection, cycles of rickettsemia can be generated that contribute to the difficulty of maintaining the herd in good health. In Mexico, there are no commercial vaccines for this disease, due to the fact that the causative pathogen, *Anaplasma marginale*, is an organism with a great genetic diversity that produces a great antigenic variability. It has been demonstrated in the country and in the world that there is a great amount of circulating strains in bovine herds, through the molecular characterization of the *msp1a* gene, which codes for a membrane protein with a highly variable fragment characterized by the presence of amino acid repeats in tandem. In this work, the molecular identification of different isolates was carried out and very different repeats were found from the previous ones.

Key Words: Livestock biotechnology, yellow cow, immune response, vaccines, diagnostics, cattle

Introducción

Anaplasma marginale es una bacteria intraeritrocítica obligada, causante de la anaplasmosis bovina, una de las enfermedades de mayor prevalencia en el trópico mexicano y que afecta gravemente la producción ganadera. Su importancia se debe a las pérdidas en el área pecuaria a diferentes niveles, desde el impedimento de la importación de ganado genéticamente superior al nativo de regiones tropicales, pérdidas económicas por elevados costos de tratamiento, baja producción de carne y leche, y por la muerte, principalmente, de los animales adultos infectados en las unidades productivas (Bautista-Garfias et al., 2021; Salinas-Estrella et al., 2022).

Esta enfermedad es transmitida principalmente por garrapatas (*Rhipicephalus microplus* o *Dermacentor spp.*) (Kocan et al., 2008), las cuales representan el vector biológico de este patógeno; otra forma de transmisión son las moscas (*Stomoxys calcitrans*, *Haematobia irritans*) (Bautista-Garfias et al., 2021) y tábanos (*Tabanus bovinus*) que actúan como vectores mecánicos; finalmente, este patógeno puede ser transmitido de forma vertical, de una hembra gestante a la cría, y de manera iatrogénica, mediante el uso de instrumental contaminado.

El cuadro clínico cursa con una anemia severa, ictericia, fiebre, pérdida de la producción de carne y leche, puede generar abortos en el tercer tercio de la gestación y, más frecuentemente en animales adultos, la muerte. Las medidas más importantes de control están enfocadas en los vectores (Amaro et al., 2020) y a la insistencia en buenas prácticas de manejo, entre las que destacan el uso de una aguja por animal, así como la limpieza y esterilización de equipo quirúrgico para evitar la diseminación de sangre contaminada entre bovinos susceptibles.

El acceso a vacunas comerciales aún no es posible en México, puesto que las vacunas usadas en otros países incluyen el uso de una cepa viva de *A. centrale* (un patógeno similar, con una patogenicidad menor) (Kocan et al., 2008), organismo exótico en el país. El diseño de vacunas que están basadas en la información genómica de los organismos

patógenos, cultivables y no cultivables *in vitro* (Cobaxin-Cárdenas et al., 2019), es una alternativa segura y eficaz para identificar los péptidos o proteínas que tienen el potencial antigénico e inmunogénico predicho para ser considerados como posibles candidatos vacunales (Guadarrama-Albarrán et al., 2024). Entre las proteínas que se han usado como blancos vacunales se encuentra MSP1a, que está codificada por el gen *msp1a* (Allred et al., 1990). El fragmento variable de esta proteína se encuentra expuesto sobre la membrana de la bacteria y se sabe que tiene propiedades de ligando o adhesina hacia un receptor aún no identificado en los eritrocitos del bovino, y células de ciertas garrapatas como *Dermacentor variabilis* e *Ixodes scapularis* (McGarey et al., 1994; Garcia-Garcia et al., 2004).

Debido a que la diversidad genética de *A. marginale* es muy amplia, es necesario continuar realizando trabajos de caracterización molecular y secuenciación genómica, con la finalidad de encontrar secuencias que sean conservadas entre cepas y que permitan el reconocimiento por el sistema inmune de forma que se pueda bloquear la infección a los eritrocitos o la replicación de los cuerpos iniciales de la bacteria (Salinas-Estrella et al., 2022).

A la fecha se tienen bajo resguardo (INIFAP-CENID SAI) 25 aislados de los cuales se han secuenciado 7 genomas. Por ello, en este trabajo se llevó a cabo la caracterización molecular de 8 aislados con base en la secuencia del gen *msp1a*, el cual ha servido anteriormente para caracterizar 17 de los aislados bajo resguardo (Jiménez-Ocampo et al., 2012).

Materiales y Métodos

A partir de sangre de bovino infectada recuperada de diferentes casos clínicos confirmados de anaplasmosis, se realizó la extracción de ADN (Favorgen®, Ping Tung, Taiwan); se corroboró su integridad en gel de agarosa al 1% y se cuantificó (NABI, Microdigital Co. Korea). Posteriormente, se llevó a cabo la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) anidado del gen *msp5* (Amaro-Estrada et al., 2020) utilizando el material genómico extraído y una mezcla de reacción comercial (PCR Master Mix, Promega®, Madison, WI, USA) para

Artículos

determinar la presencia del ADN del patógeno en cada una de las muestras. A continuación, a partir de las muestras positivas, se usaron de 5 a 10 µl de ADN (dependiendo la concentración de cada muestra) para realizar PCR punto final para la amplificación del gen *msp1a* (Jiménez-Ocampo et al., 2012).

Luego de realizar la electroforesis para la observación de los fragmentos amplificados, estos fueron cortados a partir del gel de agarosa y purificados utilizando un paquete comercial (Promega®, Wisconsin, EEUU). El ADN resultante fue cuantificado y se corroboró su integridad en gel de agarosa. Dos alícuotas de ADN de 120ng por muestra fueron enviadas a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT-UNAM, Cuernavaca).

Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando las plataformas BioEdit® Sequence Alignment Editor; después de obtener la secuencia consenso se realizaron alineamientos con la secuencia de la cepa St.

Maries (>AF293062.1, NCBI) utilizando Clustal Omega®, y posteriormente, cada una de las secuencias de los aislados fueron traducidas a proteína (Emboss Transeq) para identificar secuencias aminoacídicas de repetidos utilizando la plataforma en línea Tandem Repeat Finder®.

Resultados

Se obtuvieron 13 muestras de ADN aislados provenientes de diferentes lugares de la México, localizados en zonas enzoóticas de anaplasmosis, de acuerdo con Rodríguez et al., (2009), que tienen las condiciones climáticas para permitir la supervivencia de los vectores biológicos y por ende el mantenimiento de diferentes cepas de *A. marginale* en los hatos bovinos. De esas 13 muestras, 8 se pudieron analizar por PCR y secuenciación. El patrón de bandas del amplicón resultante de la PCR para el gen *msp1a* fue diferente para cada aislado, observando bandas desde 500 pb hasta 900 pb (Figura 1).

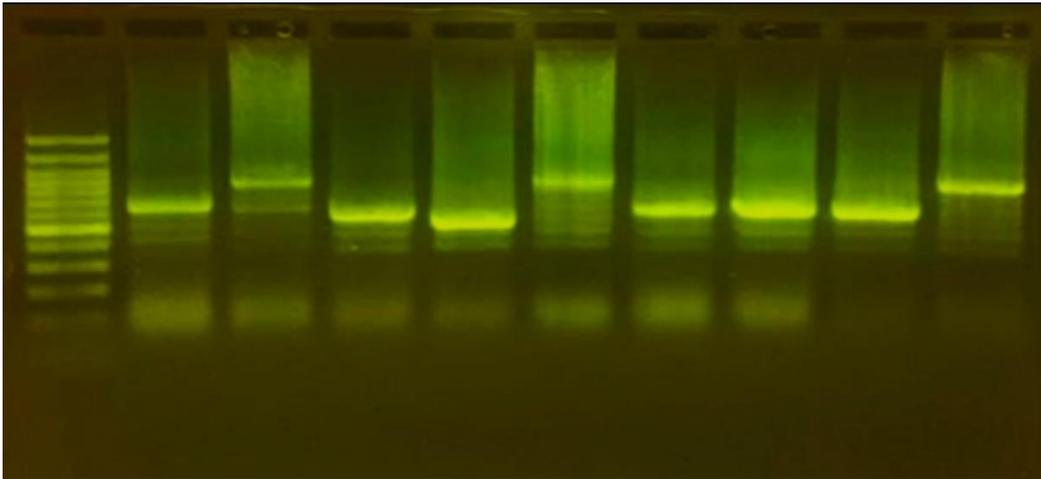


Figura 1. Resultados de electroforesis de los DNA amplificados (PCR). Carril 1 Marcador de tamaño molecular (1kb, PROMEGA). Carril 2: Palenque. Carril 3: Yucatán. Carril 4: Mapastepec. Carril 5: Ticul. Carril 6: Tepic. Carril 7: Guyaboso. Carril 8: SLM Zamora. Carril 9: Jalisco. Carril 10: Control positivo Tizimín.

Los análisis de las secuencias de ADN revelaron la presencia de 29 repetidos diferentes, de los cuales no hay ningún repetido que coincida con los reportados anteriormente por De la Fuente et al., (2007) o por Jiménez-Ocampo et al., (2012), esto puede explicarse principalmente por dos razones: 1) que los amplicones secuenciados en este trabajo son muy diferentes a los anteriormente reportados en México; o 2) que la purificación del ADN producto de la PCR (a

partir de gel) sea menos eficiente que las técnicas empleadas en otros trabajos (Jiménez-Ocampo et al., 2012) por lo que el material resulte menos óptimo para la secuenciación y debido a esto los resultados obtenidos sean tan diferentes.

De los repetidos encontrados se observó 1 repetido con longitud de 20 aa, 2 repetidos de 27 aa, 2 de 28 aa, 13 de 29 aa, 5 de 30 aa, 2 de 31 aa y 4 de 32 aa. Estos resultados

Artículos

conducen con lo reportado para la proteína MSP1a, la cual se conforma de un dominio conservado y un dominio variable compuesto de uno o varios polipéptidos, conocidos como repeticiones, cada uno de 23 a 31 aminoácidos, muy parecidos, y de los que se

pueden encontrar hasta 11 secuencias en tándem que pueden ser iguales o diferentes (Allred et al, 1990). El patrón de repetidos de cada aislado analizado se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Patrón de repetidos en tándem de la proteína MSP1a por cada aislado

Estado	Aislado	Patrón de repetidos					
Chiapas	Palenque	1	2	2	3	3.5	
	Mapastepec	4	4	5	6		
Jalisco	Jalisco	7	7	8	9		
Nayarit	Tepic	10	11	12	11	13	14
Tamaulipas	Guayaboso	15	16	17	18		
	Zamora	19	20	19	21		
Yucatán	Ticul	22	23	24			
	Yucatán	25	26	27	27	26	27

Asimismo, se encontraron conjuntos o motivos de aminoácidos que coincidían entre los repetidos de los diferentes aislados, los

cuales se muestran a continuación (Figura 2, agrupados por color).

	Identificación de repetidos	Secuencia	Aminoácidos por repetido																														# de AA por repetido				
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30		31	32		
De la Fuente 2007	A	DDSSASGQQQESSVSSQSE-ASTSSQLG-	D	D	S	S	S	A	S	G	Q	Q	Q	E	S	S	V	S	S	Q	S	E	-	A	S	T	S	S	Q	L	G	29					
Chiapas	Palenque	1	EWCVISKWSGQYIVSIRN**LVSG*SAARE	E	W	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	N	**	L	V	S	G	*	S	A	A	R	E	30				
		2	WCVISKWSGQYIVSIRN**LVSG*SAARE	W	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	N	**	L	V	S	G	*	S	A	A	R	E	29					
		2	WCVISKWSGQYIVSIRN**LVSG*SAARE	W	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	N	**	L	V	S	G	*	S	A	A	R	E	29					
	Mapastepec	3	WCVISKWSGQYIVSIRD**LVSEWSAARE*	W	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	D	**	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	30				
		3.5	CVISKWSGQYIVSIRS*CAA	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	S	*	C	A	A	20													
		4	*LVSEWSAARE*CVISKWSGQYIVSIRSW	*	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	S	W	27				
Jalisco	Jalisco	4	*LVSEWSAARE*CVISKWSGQYIVSIRSW	*	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	S	W	27				
		5	*LVSEWSAARE*CVISK*SQYIVSIRKL	*	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	*	S	Q	Y	I	V	S	I	R	K	L	27					
	Tepic	6	LIARQRVVSSKRVVCYLKVVRPVHRLN*D*CR	L	I	A	R	Q	R	V	V	S	S	K	R	V	V	C	Y	L	K	V	V	R	P	V	H	R	L	N	*	D	*	C	R	29	
		7	LVSEWSAARE*CVISK*SQYIVSIRD**	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	*	S	Q	Y	I	V	S	I	R	D	**	29						
Nayarit	Tepic	7	LVSEWSAARE*CVISK*SQYIVSIRD**	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	*	S	Q	Y	I	V	S	I	R	D	**	29						
		8	LVSEWSAARE*CVISK*SQYIVSIRD**	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	*	S	Q	Y	I	V	S	I	R	D	**	29						
		9	LVSEWSAARE*CVISK*SQYIVSIRTKL	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	*	S	Q	Y	I	V	S	I	R	T	K	L	29					
	Tepic	10	*LVREWSAARE*CVISKWSGQYIVSMN**	*	L	V	R	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	M	N	**	30					
		11	LVSE*SAAREQCVISKWSGQYIVSIRS**	L	V	S	E	*	S	A	A	R	E	Q	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	S	**	29					
		12	LVREWSAARE*CVISKWSGQYIVSIRN**	L	V	R	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	N	**	29					
Tamaulipas	Guayaboso	11	LVSE*SAAREQCVISKWSGQYIVSIRS**	L	V	S	E	*	S	A	A	R	E	Q	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	S	**	29					
		13	LVSEWSAAREQCVISKWSGQYIVSIRG**	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	Q	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	G	**	29					
	Zamora	14	LVSEWSAAREQCVISKWSGQYIVSTRS*LAAX	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	Q	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	T	R	S	*	L	A	A	X	32	
		15	N**LVSEWSAARE*CVISKWSGQYIVSIRS**	N	**	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	S	**	32			
Yucatán	Ticul	16	LVSEWSAARE*CVISKWSGQYIVSIRN**	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	N	**	28					
		17	*LVSEWSAARE*CVISK*SQYIVSIRN**	*	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	*	S	Q	Y	I	V	S	I	R	N	**	30					
		18	LVSEWSAARE*CVISK*SQYIVSIRT*	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	*	S	Q	Y	I	V	S	I	R	T	*	28						
	Yucatán	19	LIARQRVVSSKRVVCYLKVVRPVHRLN*E	L	I	A	R	Q	R	V	V	S	S	K	R	V	V	C	Y	L	K	V	V	R	P	V	H	R	L	N	*	E	29				
		20	LIARQRVVSSKRVVCYLKVVRPVHRLN*E	L	I	A	R	Q	R	V	V	S	S	K	R	V	V	C	Y	L	K	V	V	R	P	V	H	R	L	N	*	E	29				
		19	LIARQRVVSSKRVVCYLKVVRPVHRLN*E	L	I	A	R	Q	R	V	V	S	S	K	R	V	V	C	Y	L	K	V	V	R	P	V	H	R	L	N	*	E	29				
Yucatán	Ticul	21	LIARQRVVSSKRVVCYLKVVRPVHRLN*GLV	L	I	A	R	Q	R	V	V	S	S	K	R	V	V	C	Y	L	K	V	V	R	P	V	H	R	L	N	*	G	L	V	31		
		22	LIARQRVVSSKRVVCHLKVVRPVHRLN*E	L	I	A	R	Q	R	V	V	S	S	K	R	V	V	C	H	L	K	V	V	R	P	V	H	R	L	N	*	E	29				
		23	LIARQRVVSSKRVVCHLKVVRPVHRLN*E	L	I	A	R	Q	R	V	V	S	S	K	R	V	V	C	H	L	K	V	V	R	P	V	H	R	L	N	*	E	29				
	Yucatán	Ticul	24	LIARQRVVSSKRVVCHLKVVRPVHRLN*GLMR	L	I	A	R	Q	R	V	V	S	S	K	R	V	V	C	H	L	K	V	V	R	P	V	H	R	L	N	*	G	L	M	R	32
			25	SW*LVTVGWSAARE*RVISK*SGQYIVSTRS**	S	W	*	L	V	T	V	G	W	S	A	A	R	E	*	R	V	I	S	K	*	S	G	Q	Y	I	V	S	T	R	S	**	32
			26	LVSGWSAARE*CVISKWSGQYIVSIRS**	L	V	S	G	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	S	**	29				
		Yucatán	27	LVSGWSAARE*CVISK*SQYIVSIRS**	L	V	S	G	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	*	S	Q	Y	I	V	S	I	R	S	**	29					
			27	LVSGWSAARE*CVISK*SQYIVSIRS**	L	V	S	G	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	*	S	Q	Y	I	V	S	I	R	S	**	29					
			26	LVSGWSAARE*CVISKWSGQYIVSIRS**	L	V	S	G	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	S	**	29				
			27	LVSGWSAARE*CVISK*SQYIVSIRS**	L	V	S	G	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	*	S	Q	Y	I	V	S	I	R	S	**	29					
28	LVSGWSAA*E*CVISKWSGQYIVSIRD*LX	L	V	S	G	W	S	A	A	*	E	*	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	D	*	L	X	30					

Figura 2. Análisis de las secuencias de repetidos de aminoácidos encontradas por el programa Tandem Repeat Finder.

A pesar de no coincidir con los repetidos ya publicados en la literatura, se observa la permanencia del motivo SGQ (Serina, Glicina, Glutamina) localizado en las posiciones 7, 8 y 9 (Figura 17) del repetido A (De la Fuente et al., 2007) en todos los repetidos encontrados de cinco aislados (Palenque, Yucatán, Tepic, Guayaboso y Jalisco), aunque en posiciones diferentes (la más común 18, 19 y 20). Mientras que en el aislado Zamora, solamente el primer y tercer repetido presentan la Glutamina (Q), en la posición 18, y en los repetidos 2 y 4 de este aislado, este motivo de tres aminoácidos (SGQ) se encuentra ausente tal como en los repetidos del aislado Ticul, los cuales comparten, en su lugar, la mayor parte del segundo repetido del aislado Zamora: LIARQRVVSSKRVVCYLKVVVRPVHRLN*E con ligeras modificaciones: en Ticul, la Tirosina (Y) cambia por Histidina (H) y los últimos aminoácidos después de la Asparagina (N) son diferentes en los tres repetidos del aislado Ticul. Asimismo, el segundo repetido del aislado Zamora, mencionado arriba es muy similar al cuarto repetido encontrado en el aislado Mapastepec, salvo por la ausencia de la Leucina (L) inicial y la diferencia en los aminoácidos finales después de la Asparagina.

Estudios de caracterización molecular de aislados geográficos de *A. marginale* usando el gen *msp1a*, demuestran alta diversidad, misma que se observa en los resultados aquí obtenidos, lo cual reafirma la estrecha relación entre los procesos de adaptación natural y la presión ejercida sobre la bacteria *A. marginale* con la movilización del ganado para su comercialización (De la Fuente et al., 2004; 2007). Esta diversidad, observada a su vez en la proteína es importante, ya que afecta de manera directa el diseño y desarrollo de inmunógenos que pudieran tener un amplio espectro en la protección ofrecida contra esta enfermedad (De la Fuente et al., 2002; Salinas-Estrella et al., 2022).

Conclusiones

Mediante el uso de biología molecular y bioinformática, se llevó a cabo la caracterización molecular de 8 aislados de *A. marginale*, en los cuales se encontraron de 3 a 7 diferentes patrones de repetidos aminoacídicos para cada aislado, en cuyas secuencias se observaron algunos motivos de

aminoácidos coincidentes entre aislados. Resulta interesante lo reportado en este trabajo, ya que se encontraron nuevos hallazgos respecto a la diversidad genética de *A. marginale* en México, lo cual resalta la importancia de la caracterización molecular de los diferentes aislados, debido a que la diversidad genética es uno de los principales obstáculos en la generación de una vacuna eficiente contra la anaplasmosis bovina en México.

Agradecimientos

Banco de Germoplasma, Unidad de Anaplasmosis, CENID-SAI INIFAP. Proyecto Fiscal 1162734713.

Referencias

Albarrán, C. F. G., Estrella, E. S., Cárdenas, M. E. C., & Camarillo, S. D. R. (2024). Identificación de péptidos lineales como prospectos inmunogénicos *in silico* contra *Anaplasma marginale*. *Inventio*, 1-7.

Allred DR, McGuire TC, Palmer GH, Leib SR, Harkins TM, McElwain TF, Barbet AF. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87(8):3220-4.

Amaro Estrada I, et al. (2020), Transmission of *Anaplasma marginale* by unfed *Rhipicephalus microplus* tick larvae under experimental conditions. *Rev. mex. de cienc. pecuarias*. vol.11, n.1 pp.116-131.

Bautista-Garfias, C. R., Castañeda-Ramirez, G. S., Torres-Acosta, J. F. J., Salinas-Estrella, E., Moshin, M., Aguilar-Marcelino, L. (2021). Fly borne diseases in animals. In: Abbas RZ and Khan A, editors. *Veterinary Pathobiology and Public Health*. 114-127.

Cobaxin-Cardenas, M. E., Díaz, H. A., Avelino, P. O., Salinas-Estrella, E., Preciado-de la Torre, J. F., Quiroz-Castañeda, R. E., ... & Rodríguez-Camarillo, S. (2019). Primer abordaje para la propagación de *Anaplasma marginale* (MEX-31-096) en células de garrapata Rm-sus. *Revista del Centro de Investigación de la Universidad la Salle*, 13(51), 67-80.

Artículos

De la Fuente, J., Van Den Bussche, R. A., Garcia-Garcia, J. C., Rodríguez, S. D., García, M. A., Guglielmone, A. A., ... & Kocan, K. M. (2002). Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. *Veterinary microbiology*, 88(3), 275-285.

De La Fuente, J., Passos, L. M., Van Den Bussche, R. A., Ribeiro, M. F., Facury-Filho, E. J., & Kocan, K. M. (2004). Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Veterinary parasitology*, 121(3-4), 307-316.

De la Fuente, J., Ruybal, P., Mtshali, M. S., Naranjo, V., Shuqing, L., Mangold, A. J., ... & Kocan, K. M. (2007). Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. *Veterinary Microbiology*, 119(2-4), 382-390.

Garcia-Garcia, J. C., de la Fuente, J., Bell-Eunice, G., Blouin, E. F., & Kocan, K. M. (2004). Glycosylation of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and its putative role in adhesion to tick cells. *Infection and immunity*, 72(5), 3022-3030.

Jiménez-Ocampo R, et al. (2012) Genetic diversity of the *msp1a* gene variable region and *msp4* gene of *Anaplasma marginale* strains from Mexico. *Rev Mex Cienc Pecu*; 3:373-387.

Kocan KM et al, (2008) The Natural History of *Anaplasma marginale*, *Veterinary Parasitology*, doi:10.1016/j.vetpar.2009.09.012

McGarey, D. J., & Allred, D. R. (1994). Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. *Infection and immunity*, 62(10), 4587-4593.

Rodríguez, S. D., Ortiz, M. A. G., Ocampo, R. J., & y Murguía, C. A. V. (2009). Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1092-1101.

Salinas-Estrella, E., Amaro-Estrada, I., Cobaxin-Cárdenas, M. E., Preciado de la Torre, J. F., & Rodríguez, S. D. (2022). Bovine Anaplasmosis: Will there ever be an almighty effective vaccine? *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 946545.