



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

DIVERSIDAD GENÉTICA EN CEPAS DE *Babesia bovis*
TRANSMITIDAS NATURALMENTE.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

KARLA DANIELA CERECERES MARTÍNEZ

TUTOR: JUAN JOEL MOSQUEDA GUALITO

COMITÉ TUTORAL: GUILLERMINA ÁVILA RAMÍREZ

ALFREDO SAHAGÚN RUÍZ

MÉXICO D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis padres y hermano:

Por creer en mí, por la confianza y el amor demostrado a lo largo de los años. Esto es por ustedes, lo más importante.

A Roberto Soriano:

Por el apoyo incondicional en los momentos difíciles, respeto de mis ideales y metas, por ayudarme a entender que la vida no sería la misma sin ti, mi mejor amigo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Juan Mosqueda por creer en mí, compartir sus conocimientos y haberme dado la oportunidad de ser parte de este proyecto. Gracias!

A mis viejitos hermosos, los doctores Alfonso Falcón y Alberto Ramos por su ayuda, tolerancia, conocimientos y amistad incondicional.

A Rodrigo Vichido por su apoyo desmedido, por ser un buen amigo y compañero de trabajo, gracias por ser la persona de quien pude aprender lo mejor en esta travesía.

A mi chamulita Gabriela Aguilar Tipacamu por ser una gran amiga y colega, por todos esos ratos de tanta alegría.

A todos ellos, mis amigos y mentores gracias, lo logramos!

RESUMEN

Babesia bovis posee 5 glicoproteínas en su superficie que pertenecen a la familia de antígenos variables de la superficie del merozoito (por sus siglas en inglés VMSEA: Variable Merozoite Surface Antigen): el antígeno de superficie del merozoito 1 (MSA-1); el MSA-2a1; el MSA-2a2; el MSA-2b y el MSA-2c. La proteína MSA-1 se ha propuesto para su incorporación en vacunas recombinantes en contra de *B. bovis*, sin embargo cuenta con cierto grado de polimorfismo entre aislados de diferentes regiones geográficas, lo que resulta en un reto para la elaboración de las mismas. Se desconoce a la fecha si existe diversidad de alelos de MSA-1 en poblaciones de bovinos en el campo. El objetivo de este trabajo fue el determinar la diversidad de genotipos de *msa-1* de *Babesia bovis* dentro de un mismo hato, como también determinar la existencia de variantes alélicas de *msa-1* de *Babesia bovis* en animales de campo crónicamente infectados a través del tiempo. El análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas revelaron 9 genotipos diferentes; los datos demuestran que dentro de poblaciones de bovinos se encuentra presente más de un genotipo. La variación génica a lo largo del tiempo evaluada mediante el análisis de secuencias nucleotídicas de diferentes muestreos, determinó que al menos en un animal de cada hato evaluado (Jalisco y Nayarit) conservaron el mismo genotipo durante el transcurso de 6 meses, tiempo estimado que hubo entre cada muestreo. El análisis filogenético sugiere que las secuencias de *Babesia bovis* americanas pudieron originarse a partir de aislados australianos. Los resultados generados deben tomarse en cuenta al diseñar vacunas o métodos de diagnóstico contra este parásito utilizando MSA-1 en bovinos en situaciones de campo.

Palabras clave: *msa-1*, *Babesia bovis*, antígenos variables de la superficie del merozoito, babesiosis bovina.

ABSTRACT

Merozoites of *Babesia bovis*, a causative agent of Bovine Babesiosis, have five glycoproteins in their cell membrane; these proteins are members of the VMSA family (variable merozoite surface antigens). Members of this gene family include the MSA-1, MSA-2a1, MSA-2a2, MSA-2b and MSA-2c. MSA-1 has been proposed for its incorporation in recombinant vaccines against *B. bovis*, however MSA-1 antigenic polymorphism between strains impede its use in the manufacture of protective vaccines. At the present time we ignore if there are distinct alleles of the *msa-1* gene encoding variant proteins in animals under field conditions. Therefore, the goal of this work was to determine the genotype diversity of *B. bovis msa-1* within herds kept in the field, and to determine the existence of variant alleles of *msa-1* in animals chronically infected through time. Comparative analysis of the *msa-1* nucleotide sequences revealed nine different genotypes showing that more than one genotype is present within a population of cattle under field conditions. To analyze the existence of antigenic variation through time, an analysis of *msa-1* nucleotide sequences from the same herd at different times was performed. The data revealed that at least one animal in each of the two herds analyzed; Nayarit and Jalisco, kept the same genotype during the course of six months, the time estimated between each sampling. Finally, phylogenetic analyses revealed a related link between the alleles found here and those from Australian strains, suggesting a common origin. The results generated here provide valuable information that must be taken into account when developing immune protective vaccines or diagnostic tests for *B. bovis* in cattle chronically infected in the field.

Key words: *msa-1*, *Babesia bovis*, variable merozoite surface antigens, bovine babesiosis.

ÍNDICE

Resumen	
Abstract	
1. Marco Teórico	1
1.1. Definición.....	1
1.2. Distribución.....	1
1.3. Taxonomía.....	2
1.4. Agente etiológico.....	2
1.5. Signología.....	3
1.6. Importancia económica.....	3
1.7. Métodos de diagnóstico.....	4
1.7.1. Directo.....	4
1.7.1.1. Detección microscópica.....	4
1.7.1.2. Detección de ácidos nucleicos.....	5
1.7.2. Indirecto.....	6
1.7.2.1. Inmunofluorescencia indirecta.....	6
1.7.2.2. Ensayo inmunoenzimático.....	6
1.8. Ciclo de vida.....	7
1.8.1. Eventos en la garrapata vector.....	7
1.8.2. Eventos en el hospedero bovino.....	8
1.8.3. Invasión celular en el hospedero bovino.....	8
1.9. Antígenos de superficie de <i>Babesia bovis</i>	10
1.10. Características de los miembros de la familia VMSA.....	11

1.11. Antígeno de superficie del merozoito 1 (MSA-1).....	11
1.12. Control inmune de la Babesiosis.....	12
1.13. Antígeno de <i>Babesia bovis</i> como agente vacunal.....	12
1.14. Variación antigénica.....	14
1.15. Evasión inmune.....	15
1.15.1. Variación antigénica.....	15
1.15.2. Adhesión y secuestro.....	16
1.16. Análisis filogenético.....	17
2. Planteamiento del problema.....	18
3. Justificación.....	21
4. Hipótesis.....	23
5. Objetivos.....	23
6. Límites y alcances.....	24
7. Metodología.....	26
7.1. Materiales y Métodos.....	26
7.1.1. Muestras biológicas.....	26
7.1.2. Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).....	26
7.1.3. Extracción de DNA genómico.....	27
7.1.4. Amplificación del gen <i>msa-1</i> de <i>Babesia bovis</i>	29
7.1.5. Purificación de productos de PCR.....	31
7.1.6. Clonación del gen <i>msa-1</i> de <i>Babesia bovis</i>	32
7.1.7. Purificación de DNA plasmídico.....	33
7.1.8. Cuantificación de DNA plasmídico.....	34

7.1.9. Secuenciación del gen <i>msa-1</i> de <i>Babesia bovis</i>	34
7.1.10. Alineamiento de secuencias del gen <i>msa-1</i>	35
7.1.11. Identificación de genotipos del gen <i>msa-1</i>	36
7.1.12. Generación de secuencias predichas de aminoácidos de MSA-1	36
7.1.13. Análisis filogenético de los genotipos de <i>msa-1</i>	37
8. Resultados	39
8.1. Selección de animales infectados naturalmente con <i>Babesia bovis</i> por medio de la técnica de IFI.....	39
8.2. Amplificación del gen <i>msa-1</i> de <i>Babesia bovis</i> mediante PCR.....	40
8.3. Clonación del gen <i>msa-1</i>	43
8.4. Generación de las secuencias consenso.....	44
8.5. Alineamiento múltiple de secuencias.....	44
8.6. Alineamiento múltiple de los genotipos.....	54
8.7. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de MSA-1 de <i>Babesia bovis</i>	59
8.8. Análisis filogenético.....	61
9. Discusión y conclusiones	66
10. Perspectivas	74
11. Bibliografía	75

MARCO TEÓRICO

Definición

La babesiosis bovina es una enfermedad causada por un protozoario intraeritrocítico del género *Babesia* que es transmitido por garrapatas del género *Boophilus*. Tiene como sinónimos: Fiebre de Texas, piroplasmosis, fiebre de la garrapata, agua roja, ranilla, tristeza (McCosker, 1981).

Distribución

La enfermedad es distribuida mundialmente de acuerdo a la presencia del vector garrapata (Góes *et al.*, 2007). A nivel mundial, los principales vectores de la *Babesia* son: *Boophilus microplus*, *B. decoloratus* y *B. annulatus*. Las condiciones óptimas de humedad y temperatura para el desarrollo del vector (De Waal *et al.*, 2006) se encuentran en países con clima tropical y subtropical (Nevils, 2000) que se localizan entre las coordenadas 32° Sur y 40° Norte con respecto al ecuador (McCosker, 1981). Las especies de *Babesia* más importantes por las pérdidas que generan a la ganadería a nivel mundial son: *Babesia divergens* que es transmitida por *Ixodes ricinus* en la parte Oeste y Central de Europa, *Babesia major* transmitida por *Haemaphysalis punctata* en la parte Este de Europa y *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* transmitidas por *Boophilus microplus* y *B. annulatus* que se encuentran en África, Australia y América (Homer *et al.*, 2000; Bock *et al.*, 2000; Uilenberg, 2006). Cabe mencionar que adicionalmente se encuentran algunas especies como *B. microti* y *B. divergens* que también ocasionan pérdidas a nivel mundial debido a su carácter como enfermedades zoonóticas en Europa (Zintl, 2003). En México la babesiosis es considerada como una limitante para la introducción de ganado especializado para la producción de carne y para la producción de leche en zonas que son endémicas de la enfermedad (Fernández *et al.*, 1995).

Taxonomía

Babesia bovis es un patógeno del ganado bovino transmitido por la garrapata. Se encuentra clasificado de la siguiente manera:

Reino: *Protista*,
Subreino: *Protozoa*,
Phylum: *Apicomplexa*,
Clase: *Piroplasma*,
Subclase: Piroplasmia,
Orden: Piroplasmida,
Familia: *Babesiidae*,
Género: *Babesia*.

(Levine *et al.*, 1980; Homer *et al.*, 2000; Bock *et al.*, 2004).

Agente Etiológico

En México se han identificado dos especies causantes de la babesiosis bovina: *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*, siendo esta última la especie que provoca los cursos más agudos y severos de la enfermedad (Solis, 1991).

B. bovis es considerada como una babesia pequeña las formas piriformes intraeritrocíticas miden aproximadamente 2 μm X 1.5 μm . Tiene como sinónimos: *Babesia argentina*, *Babesia berbera* y *Babesia colchica*. *Babesia bovis* se transmite transovaricamente a la progenie. El estadio larval es quien transmite enfermedad al hospedero bovino (Purnell, 1981).

B. bigemina es considerada como una babesia grande y cuyas formas piriformes miden aproximadamente 4-5 X 2 μm . Ambas especies comparten el mismo vector por lo que se les puede encontrar dentro de las mismas áreas geográficas (Purnell, 1981).

Signología

La babesiosis por *B. bovis* cursa de manera aguda durante 3 a 7 días, la temperatura rectal aumenta paralelamente al incremento de la parasitemia, causando fiebre mayor a los 40°C durante un periodo prolongado. En el bovino infectado se observa un periodo de inapetencia, depresión, aumento de la frecuencia respiratoria, debilidad e incapacidad para moverse, las heces son secas y con estrías de sangre. En casos muy severos, se presenta anemia, hemoglobinemia, seguido de ictericia, ataxia, temores musculares, alteraciones en células rojas como deformación y rigidez y daño a células del endotelio, llevando a un edema pulmonar y disfunción cerebral, coma o muerte (Purnell, 1981; Bock *et al.*, 2004; Góes *et al.*, 2007). Los signos observados en *B. bigemina* se encuentran relacionados a una rápida hemólisis intravascular que en algunas ocasiones puede ser masiva (Kahl, 1984). También podemos encontrar hemoglobinuria y un rápido desarrollo de anemia severa, ictericia y muerte. A diferencia de la signología mostrada por *B. bovis*, las infecciones por *B. bigemina* no provocan lesiones cerebrales (Callow, 1993).

Importancia Económica

La prevalencia de babesiosis y garrapatas es uno de los factores más importantes en el ganado de mayor productividad (Góes *et al.*, 2007). Se estima que 1.2 billones de bovinos se encuentra expuestos a la babesiosis (McCosker, 1981). Razas de ganado que son nativas de zonas endémicas tienen resistencia natural contra la enfermedad y no existen consecuencias graves debido a la infección como cuando ganado exótico, usualmente del tipo *Bos Taurus*, es introducido (Bock *et al.*, 2004). Las pérdidas económicas debido a la babesiosis provienen de la mortalidad, abortos, infertilidad temporal de machos como resultado de la fiebre, pérdidas en la producción de leche y carne y debido también a las medidas de control como acaricidas, tratamiento terapéutico y vacunas. Sin

embargo, el mayor impacto a la economía del comercio internacional es el impedimento de la importación de ganado a zonas endémicas para el mejoramiento genético (Solorio y Rodríguez, 1997).

Métodos de diagnóstico

Directo

El diagnóstico consiste en identificar al parásito de forma directa en cualquier tejido del hospedero o vector. La manera de identificarlo puede ser por observación al microscopio o por la detección del ADN de la *Babesia*.

Detección microscópica. Consiste en detectar al parásito en una muestra de sangre extendida en un portaobjetos y teñido posteriormente con colorante de Giemsa (Mosqueda *et al.*, 2007). Existen dos tipos de frotis para hacer esto:

1. Frotis sanguíneo delgado. Las laminillas son observadas al microscopio con una lente 100X y aceite de inmersión. La sensibilidad de esta prueba tiene un rango de observación de un parásito por cada 10^{5-6} eritrocitos. La ventaja de esta técnica es la posibilidad de identificar al parásito por su morfología (Böse *et al.*, 1995).
2. Frotis sanguíneo grueso. Este frotis a diferencia del frotis delgado es que la sangre no es extendida a todo lo largo del portaobjetos y es fijada a 100°C antes de ser teñida con Giemsa al 10%. La observación al microscopio puede ser con una lente 40x ó con una lente 100x , se demora aproximadamente entre 15-20 y 25-30 min respectivamente. La sensibilidad de la técnica es de 1-10 parásitos por cada microlitro de sangre (Böse *et al.*, 1995).

Para un mejor resultado los frotis sanguíneos deberán prepararse de sangre obtenida de capilares, como por ejemplo de la punta de la cola o del margen de la oreja (Callow, 1993).

Detección de ácidos nucleicos. Las técnicas que identifican directamente al DNA del parásito son técnicas de detección molecular con alta sensibilidad, ya que determinan la presencia de cantidades mínimas de DNA del parásito (Zintl *et al.*, 2003).

1. Sondas de DNA. Esta técnica puede ser utilizada para la detección de DNA del parásito en sangre, tejidos, u órganos de garrapata. Está basada en la hibridación específica de un fragmento clonado de DNA y que es dirigido a un DNA blanco. La sensibilidad de la prueba depende de la cantidad de DNA presente en la muestra, en promedio puede detectar parasitemias de 10^{-5-6} . Es una herramienta útil para la diferenciación entre especies de *Babesia* (Wu *et al.*, 1997; Petchpoo *et al.*, 1992; Jasmer *et al.*, 1990).
2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta prueba se basa en la amplificación de un fragmento específico de DNA obtenido del parásito. Con esta técnica es posible identificar hasta 10 eritrocitos infectados en 1 ml de sangre (Pipano *et al.*, 2002). Las pruebas de PCR para *Babesia* que han sido desarrolladas pueden detectar parasitemias de 10^{-9} , lo que significa que es 100 veces más sensible que la detección microscópica (Fahrimal *et al.*, 1992). Con la alta sensibilidad de la técnica es posible diferenciar entre varias especies de *Babesia* infectando en un mismo animal (Figuerola *et al.*, 1992; Oliveira-Sequeira *et al.*, 2005). Su alta especificidad la hace una prueba útil para la validación de resultados de otras técnicas de diagnóstico (Bock *et al.*, 2000; Oliveira-Sequeira *et al.*, 2005; Costa-Junior *et al.*, 2006).

Indirecto

Las pruebas permiten identificar de manera indirecta en el suero de los animales la presencia del parásito por los anticuerpos que se generan contra el (Lew *et al.*, 2005).

1. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). En la microscopia de fluorescencia las células que expresan un antígeno específico, pueden ser detectadas con un anticuerpo específico para ese antígeno y posteriormente, el anticuerpo es detectado con un segundo anticuerpo anti-inmunoglobulina conjugado con fluoresceína (u otro fluorocromo) utilizado como marcador (Abbas *et al.*, 2004), y que al ser excitado , luz con cierta longitud de onda, emite una luz de otra longitud de onda y que es visible al microscopio de fluorescencia. El antígeno puede provenir de frotis tisulares, un corte histológico o un cultivo de células extendidas sobre un portaobjetos (Tizard, 2000). Una de las desventajas de las pruebas, es que la técnica debido a que la serología es indirecta, no necesariamente distingue entre una exposición pasada o infecciones presentes (Fahrimal *et al.*, 1992).
2. Ensayo Inmunoenzimatico (ELISA). Este método requiere de la preparación de un antígeno conocido para poder estandarizar el ensayo para la detección de anticuerpos anti-*Babesia* (Goncalves *et al.*, 1999). El antígeno se encuentra unido a las paredes de la placa, donde se realizará la interacción con el anticuerpo primario. Posteriormente se adiciona el segundo anticuerpo que lleva unida una enzima la cual será unida químicamente al anticuerpo anti-inmunoglobulina (secundario). El anticuerpo secundario se unirá al anticuerpo primario unido al antígeno. Con ello se realizará la estimulación de la enzima para generar una reacción que puede ser cuantificable (Janeway, 2005). La técnica de ELISA cuenta con una alta especificidad y sensibilidad en comparación con otras pruebas cuando ya

ha sido estandarizada (Goncalves *et al.*, 1999). Estudios realizados con muestras de campo de *B. bovis* de zonas endémicas muestran que el ensayo inmunoenzimático tiene una especificidad del 100% y una sensibilidad del 91.1%, lo que se traduce en un valor predictivo del 100% bajo cualquier circunstancia. Sin embargo la exactitud y fiabilidad del ensayo aún necesita ser determinada en la aplicación de grandes cantidades de muestras colectadas de zonas endémicas (Goff *et al.*, 2006). La técnica de ELISA utilizada para la determinación de *B. bovis* en pruebas de investigación ha probado ser una herramienta útil para su evaluación (Barros *et al.*, 2005).

Ciclo de vida

Eventos en la garrapata vector

La garrapata se contagia cuando ingiere los eritrocitos infectados del bovino. Cambios debidos a factores como temperatura, tensión de oxígeno o factores en el intestino de la garrapata ayudan a inducir el desarrollo de gametocitos (Weber y Friedhoff, 1977). El desarrollo más notable la aparición de un organelo de la parte anterior de la babesia en forma de punta de flecha, a esta fase se le llama strahlenkörper o cuerpo rayado (Friedhoff, 1981). Estas formas dan lugar a agregados multinucleares dando como resultado a gametos que se fusionan en pares (singamia) y para formar una célula esférica llamada cigoto (Mehlhorn y Schein, 1984). Posteriormente el cigoto penetra en las células epiteliales del intestino de la garrapata para dar inicio a la división asexual para la formación de quinetos (Young y Morzaria, 1986). Los quinetos recién formados escapan de las células epiteliales hacia la hemolinfa e invaden diferentes órganos y tejidos, como fibras musculares, ovarios y oocitos (Howell *et al.*, 2007). En estas células los ciclos de multiplicación continúan en la garrapata hembra durante los periodos de ovoposición hasta que la garrapata muere (Young y Morzaria, 1986).

La hembra adulta transmite los quinetos de *B. bovis* transováricamente a las larvas. En el estado de larva, los parásitos se dirigen a las glándulas salivales a través de la hemolinfa, cuando comienza el proceso de alimentación sobre un bovino susceptible (Howell *et al.*, 2007). Los quinetos sufren una diferenciación y se transforman en esquizontes para posteriormente dar lugar a los esporozoitos (Potgieter y Els, 1976) infectivos debido al estímulo de la alimentación y la temperatura corporal del bovino (Young y Morzaria, 1986).

Eventos en el hospedero bovino.

Los esporozoitos son inyectados junto con la saliva del vector, en el momento en que la larva se encuentra alimentando sobre el bovino y estos pueden invadir directamente a los eritrocitos (Homer, 2000). Después de parasitar a su célula blanco, el esporozoito sufre un cambio y se forma el siguiente estadio llamado trofozoito. El trofozoito lleva a cabo una reproducción asexual por fisión binaria dando como resultado a dos células hijas (Potgieter y Els, 1977). Algunos trofozoitos no se reproducen en esta etapa y se dedican sólo a incrementar su tamaño para que puedan desarrollarse en gametos previamente a que escapen del eritrocito en el intestino de la garrapata (Homer *et al.*, 2000). Las dos células hijas resultantes se nombran merozoitos, los cuales posteriormente a su formación, escapan del eritrocito para invadir nuevos eritrocitos (Potgieter y Els, 1977). Esta reproducción continúa hasta que una garrapata se alimenta de los eritrocitos infectados, continuando de esta manera con el ciclo de vida del parásito (Callow, 1968).

Invasión celular en el hospedero bovino

La internalización de los esporozoitos/merozoitos en las células eritrocíticas del hospedero bovino sigue un esquema muy conservado en la babesiosis (Dubremetz *et al.*, 1998). Lo que hace de la adhesión de los zoitos de *babesia* en

las células rojas del hospedero un paso crítico para el establecimiento de una infección (Cooke *et al.*, 2005).

La penetración de los parásitos es un proceso activo que requiere de 5 pasos:

1. Unión. Etapa inicial donde el esporozoito/merozoito tiene contacto con el eritrocito, con el desencadenamiento de los eventos de reconocimiento, esta unión es al azar, sin embargo se ve facilitada por la abundancia de células rojas en el hospedero y cualquier parte de la superficie del zoito y del eritrocito pueden estar involucradas.
2. Re-orientación. La orientación es un paso activo e independiente, el zoito lleva a cabo el proceso por si solo donde dirige su parte apical en posición cercana con la membrana del eritrocito.
3. Unión firme. La fuerte interacción celular hace de esta etapa un evento irreversible. Un sitio de unión fuerte es formado y un recubrimiento de la membrana del eritrocito puede observarse en este momento.
4. Invasión. Organelos especializados del complejo apical del parásito conocidos como roptrías y micronemas descargan un mezcla de proteínas como proteasas, fosfolipasas y lípidos, dando inicio a cambios estructurales en la membrana del eritrocito como la falta de rigidez e invaginación de la misma.
5. Internalización. El zoito es cubierto por una membrana plasmática quedando en una vacuola llamada parasitófora. El parásito sufre una diferenciación donde pierde sus organelos especializados y la membrana que lo cubría, y es cuando recibe el nombre de trofozoito.

(Young y Morzaria, 1986; Dubremetz *et al.*, 1998; Zintl *et al.*, 2003; Cooke *et al.*, 2005).

Antígenos de superficie de *Babesia bovis*.

Las proteínas de superficie son importantes en la patogenia de la babesiosis debido a la relación con el reconocimiento del parásito, unión y penetración de los eritrocitos del hospedero bovino (Goff *et al.*, 1988). Los apicomplexos utilizan varias moléculas de superficie que sirven como ligandos en el proceso de invasión. Durante el proceso moléculas de superficie de los merozoitos funcionan como factores de reconocimiento de receptores localizados en la superficie de los eritrocitos, mientras que los productos de las roptrías y micronemas ayudan a preparar la internalización del parásito hacia el interior del eritrocito (Preiser *et al.*, 2000; Sam-Yellowe, 1996). Algunas moléculas de *B. bovis* que se cree intervienen en el proceso de invasión pertenecen a la familia de antígenos de superficie variables del merozoito (por sus siglas en inglés VMSA: Variable Merozoite Surface Antigen) (Florin-Christensen *et al.*, 2002; Hines *et al.*, 1989).

Babesia bovis posee 5 glicoproteínas en su superficie descritas a la fecha y estas moléculas de superficie de la familia VMSA (Florin-Christensen *et al.*, 2002; Hines *et al.*, 1989) que interesantemente se expresan no sólo en merozoitos sino también en esporozoitos (Goff *et al.*, 1988; Hines *et al.*, 1989; Palmer *et al.*, 1991; Jasmer *et al.*, 1992; Mosqueda *et al.*, 2002 a,b). Los miembros de la familia VMSA consisten en el antígeno de superficie del merozoito 1 (MSA-1), el MSA-2a1, el MSA-2a2, el MSA-2b y el MSA-2c, que se caracterizan por su secuencia señal amino-terminal hidrofóbica, una región central hidrofílica y una región conservada carboxi-terminal conteniendo un glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (Hines *et al.*, 1992; Florin-Christensen *et al.*, 2002).

Características de los miembros de la familia VMSA

La familia de VMSA consta de 5 genes, una única copia del gen *msa-1* y cuatro copias de manera contigua de los genes relacionados *msa-2*. Las proteínas MSA-1 y MSA-2 comparten 22 aminoácidos en el extremo carboxi-terminal. Esto es una característica de estas proteínas que sirve como secuencia señal (Hines, 1992; Suárez *et al.*, 2000; Florin-Christensen *et al.*, 2002). Existe una región en el extremo carboxi-terminal que es idéntica entre MSA-1, MSA-2a1 y MSA2a2 que no es conservado entre los otros dos miembros de la familia MSA-2. Análisis filogenéticos de los genes *msa* sugieren que el gen *msa-1* tiene una relación ancestral con los genes de *msa-2* (Florin-Christensen *et al.*, 2002).

Antígeno de superficie del merozoito 1 (MSA-1)

Por medio del análisis genómico del locus MSA-1 de *Babesia bovis* se pudo identificar que el gen *msa-1* tiene una longitud de 960 pb y se identificaron 3 marcos de lectura abiertos que flanquean al locus *msa-1* (Suarez *et al.*, 2000). La presencia de RNA mensajero de *msa-1* en merozoitos y esporozoitos de *Babesia bovis* demostró que el gen se transcribe en estos estadios (Hines *et al.*, 1989; Mosqueda *et al.*, 2002). También se ha confirmado la expresión de la proteína en merozoitos y esporozoitos de *Babesia bovis*. (McElwain *et al.*, 1988; Mosqueda *et al.*, 2002). La molécula de MSA-1 se divide en 4 diferentes regiones: la secuencia líder, el cuerpo, la región hipervariable y la secuencia señal que codifica a una inserción de un GPI. La secuencia líder y la señal GPI, son las únicas regiones altamente conservadas de la proteína. El cuerpo de la molécula es menos conservado pero cuenta con pequeñas islas de completa identidad (LeRoith *et al.*, 2006), contiene un bloque de 34 residuos que es una de las regiones más hidrofílicas de la molécula y presenta tres regiones que son altamente conservadas YYK, VKFCND y SPFM (Hines *et al.*, 1989) a diferencia de la región hipervariable que es rica en prolina y cuenta con motivos semiconservados en diferentes

aislados. Anticuerpos monoclonales contra la región hipervariable se unieron a la superficie del merozoito. Con base en estos hallazgos se puede decir que esta región está involucrada en el proceso de interacción entre los merozoitos y los eritrocitos durante la invasión (Berens *et al.*, 2005).

Control inmune de la babesiosis

Los mecanismos de la inmunidad contra la babesiosis requieren respuestas de la inmunidad innata y adquirida que incluye a las células T CD4⁺ y anticuerpos neutralizantes. La respuesta inmune innata inicia con la activación de monocitos y macrófagos vía interferón gamma (IFN- γ) y por medio de la fagocitosis y la producción de metabolitos tóxicos dan muerte a los organismos. Los macrófagos estimulan la producción de citocinas como la IL-1, IL-12, factor de necrosis tumoral (TNF α) y óxido nítrico (NO) (Shoda *et al.*, 2000). La IL-12 activa a las células linfocíticas naturales (NK) y contribuye al desarrollo de la inmunidad adquirida mediante la activación de las células T CD4⁺ efectoras que secretan IFN- γ y ayudan a la producción de anticuerpos protectores y células fagocíticas mediante la activación de células Th1 y Th2 (Brown y Palmer, 1999; Shoda *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2001; Bock *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2006; Goff *et al.*, 2006).

Antígeno de *Babesia bovis* como agente vacunal

Una de las consideraciones para emplear a MSA-1 como agente vacunal es la habilidad que anticuerpos específicos contra la proteína puedan neutralizar la adhesión e invasión a los esporozoitos y merozoitos (Hines *et al.*, 1992, 1995; Suarez *et al.*, 2000; Mosqueda *et al.*, 2002 a, b). MSA-1 ha mostrado ser un antígeno inmunodominante en animales que manifestaron protección en contra de *Babesia bovis*. Aún cuando los epítopes inmunodominantes presentes en MSA-1 de *Babesia bovis* varíen entre aislados, la única región de la molécula que es semiconservada entre aislados vacunales y sus aislados de brote, se encuentran

en la región central conteniendo el motivo YYK (Berens *et al.*, 2005). Un motivo similar al anterior que de igual manera se encuentra localizado en la región central es YFK de proteínas de MSA-1 que fueron analizadas a partir de muestras australianas y americanas conservando la forma estructural de la molécula, lo que sugiere que es esencial para el funcionamiento correcto de la proteína (LeRoith *et al.*, 2005).

La habilidad de anticuerpos monoclonales anti-HVR (hypervariable region) de inhibir la invasión *in vitro* señala también que la región es indispensable para el parásito en el proceso de invasión (LeRoith *et al.*, 2006).

Las vacunas que actualmente son utilizadas contra *B. bovis* son elaboradas de parásitos vivos atenuados, y son hasta ahora las que confieren mejor protección en contra de desafíos (Goff *et al.*, 1988), sin embargo existen algunas desventajas que incluyen una corta vida de anaquel, variación en dosis infectiva, reversión a virulencia y la posibilidad de contaminación con agentes patógenos (Callow, 1977; Rogers *et al.*, 1988).

Las proteínas de la familia VMSA, como MSA-1 que se han propuesto para la incorporación en vacunas recombinantes en contra de *B. bovis*, cuentan con cierto grado de polimorfismo entre aislados de diferentes regiones geográficas, lo que es un reto para la elaboración de las mismas. Pero en virtud de que estas proteínas reaccionaron con suero inmune bovino y la suposición de que los miembros de VMSA tienen una habilidad limitada de tolerancia en polimorfismos de sus secuencias de aminoácidos y en epítopes críticos, razón por la que siguen siendo candidatos vacunales (Dalrymple, 1993).

Variación antigénica

Los parásitos de *B. bovis* han adoptado exitosamente estrategias para poder evadir la respuesta inmune del hospedero bovino de manera que puedan incrementar las posibilidades de sobrevivencia (Brown y Palmer, 1999), utilizando la variación antigénica para cambiar sus proteínas expuestas en la superficie de eritrocitos infectados y así escapar al reconocimiento del sistema inmune (Calderwood *et al.*, 2003). Dentro del hospedero bovino, *B. bovis* es accesible al sistema inmune únicamente en forma de esporozoito o en la etapa de merozoito, previo a la invasión de los eritrocitos nuevos (Allred *et al.*, 1994).

La existencia de antígenos de superficie en los estadios del parásito anteriormente mencionados, tiene una función importante dentro del mecanismo de evasión inmune por la capacidad de éstos de expresar diferentes formas antigénicas en las moléculas de superficie y variar con el tiempo, siendo esta la forma de prolongar su supervivencia y establecerse como una infección crónica (Biggs *et al.*, 1991; Allred *et al.*, 1993 a,b, 1994).

Los parásitos que muestran variantes de antígenos de superficie tienen una fuerte ventaja selectiva, ya que debido a que la superficie de los eritrocitos infectados es la interface entre el parásito y el sistema inmune del hospedero, siendo la zona con mayor vigilancia inmune; razón por la que se piensa que las variantes de antígenos surgen de manera rápida en un hospedero inmunológicamente competente; dos mecanismos de evasión inmune contribuyen a esta selección:

(1) Falta de reconocimiento de las variantes antigénicas de eritrocitos infectados por parte de los anticuerpos séricos evitando su destrucción.

(2) Epítopes invariantes de antígenos de superficie que sobresalen sobre formas variables pueden dominar la respuesta inmune contra ese antígeno debido exposiciones previas, sin embargo si los epítopes invariantes no son

suficientemente neutralizantes el resultado sería una pobre respuesta protectora en contra de las variantes (Good *et al.*, 1993; Jacobson *et al.*, 1993; Allred *et al.*, 1994).

Evasión inmune

La habilidad de los organismos patógenos de evitar ser eliminados por la respuesta inmune tiene como resultado una infección persistente y de larga duración. Un aspecto importante de este proceso es la capacidad del parásito de alterar las moléculas de superficie expuestas al sistema inmune, conocido también como variación antigénica, al cual el parásito dedica porciones de su genoma para su realización y crear nuevas variantes antigénicas durante su expresión (Gupta, 2005; Dzikowski *et al.*, 2006).

Variación antigénica. Una característica de los antígenos de superficie es que estas proteínas son codificadas por familias multigénicas permitiendo la generación de variantes por medio de la recombinación (Dzikowski *et al.*, 2006). La variación antigénica en *B. bovis* ocurre por segmentación, un mecanismo donde secuencias son duplicadas de las copias de genes del donador en variantes de transcritos activos de antígenos de superficie. La repetición de este tipo de recombinaciones provoca que el transcrito activo sea progresivamente alterado de su original, donde las copias del donador permanecen inalteradas (Deitsch *et al.*, 1997; Allred y Al-Khedery, 2004, 2005; Dzikowski *et al.*, 2006).

El término secuestro es utilizado para referirse a la adhesión y acumulación de eritrocitos infectados en endotelios a través de interacciones específicas, evitando que los eritrocitos infectados sean eliminados vía esplénica o por mecanismos del sistema inmune (Shetters y Eling, 1999; O'Connor y Allred, 2000).

Una característica importante de *B. bovis* es la capacidad de secuestro en la microvasculatura a través uniones específicas de los eritrocitos infectados con capilares endoteliales por medio de protrusiones de la membrana eritrocítica (Hutchings *et al.*, 2007). Las uniones específicas (adhesiones) y el secuestro, son la causa de la forma cerebral severa de la babesiosis bovina (Allred, 2003). Durante el desarrollo de los trofozoitos y merozoitos con este tipo de comportamiento, el parásito adquiere fenotipos citoadherentes y así la habilidad de expresar ligandos que median la adhesión a endotelios y las modificaciones estructurales de la membrana eritrocítica facilitando el secuestro (Allred, 1995; Allred y Al-Khedery, 2004).

Adhesión y secuestro. En infecciones de *B. bovis* el secuestro conlleva al daño de órganos como el bazo y la musculatura cardíaca resultante de los cambios anóxicos en la musculatura endotelial (Wright *et al.*, 1988). La adhesión y secuestro se observan cuando eritrocitos infectados con trofozoitos o merozoitos expresan moléculas de superficie que son capaces de adherirse al endotelio de capilares venosos mientras que las formas no adhesivas se mantienen en circulación periférica y son eliminados vía esplénica. Los parásitos adheridos madurarán en la microvasculatura y liberarán las formas maduras. Otra línea de eritrocitos infectados expresarán diferentes moléculas de adhesión y podrán fijarse a diferentes receptores y a otras células endoteliales. Los anticuerpos (Ac) pueden ser capaces de prevenir la citoadhesión o de provocar el desprendimiento de eritrocitos ya fijados al endotelio; cuando esta situación ocurre, las células son entonces susceptibles a la eliminación por vía esplénica (Allred, 1995, 2003).

Análisis filogenético

Estos tipos de análisis estiman la relación entre los genes o fragmentos de estos, infiriendo la historia común entre ellos. Para la investigación de la evolución y la relación entre genes y/o organismos, diferentes clases de información pueden ser utilizadas como las secuencias de nucleótidos o aminoácidos y así poder inferir relaciones filogenéticas basadas en los conceptos de selección natural o evolución neutral. De acuerdo a la teoría de evolución todos los organismos evolucionaron de un ancestro común (Darwin, 1859), y mecanismos como las mutaciones, duplicación de genes, reorganización de genomas y recombinación han dado como resultado a la biodiversidad. De todo lo anterior únicamente las mutaciones pueden ser utilizadas por los diferentes métodos filogenéticos para inferir relaciones entre genes. Para su evaluación se considera la similitud de los genes asumiendo que son homólogos.

Las relaciones evolutivas pueden ser ilustradas por medio de árboles filogenéticos, llamados de esta manera porque los diagramas empleados para la descripción de estas relaciones semejan la estructura de un árbol (Anne-Mieke Vandamme, 2003).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La babesiosis bovina es una enfermedad intraeritrocítica causada por parásitos del género *Babesia*. La enfermedad es transmitida y distribuida mundialmente por garrapatas del género *Boophilus* (Bock *et al.*, 2004).

En México, aproximadamente el 70% de cabezas de bovinos se encuentran en zonas subtropicales y tropicales donde el vector y por tanto de la enfermedad son endémicas, siendo *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, las especies existentes en el país (Estadística Agropecuaria, 2004). El mayor impacto económico causado a la ganadería mexicana por la babesiosis, es la obstaculización de la introducción de ganado genéticamente mejorado a zonas de alto riesgo (Bock *et al.*, 2004; McCosker, 1981).

En la actualidad, la elaboración de vacunas vivas atenuadas se ha convertido en una de las mejores alternativas como control inmunológico de la babesiosis bovina (Toro *et al.*, 1990) ya que se ha observado que el ganado que sobrevive a la infección por *Babesia bovis* desarrolla inmunidad de larga duración (Bock *et al.*, 2004). La respuesta inmune desarrollada contra la babesiosis bovina involucra la inmunidad innata y la inmunidad adquirida; basadas en la activación de macrófagos y la respuesta de las células T CD4+ (Brown *et al.*, 2006), la inmunidad efectiva y duradera, es la razón de la importancia del desarrollo de vacunas que generen anticuerpos y respuestas de tipo Th1. A la fecha no existen vacunas efectivas que confieran total protección contra la babesiosis (Brown *et al.*, 2006).

Dentro de las desventajas de las vacunas vivas elaboradas a base de eritrocitos, se encuentra el riesgo de reacciones o contaminación con organismos patógenos, sensibilización contra grupos sanguíneos, la necesidad de cadena fría para su transporte (Rogers *et al.*, 1988), y la reversión a la virulencia de las

mismas (Rodríguez *et al.*, 1983). Una de las bases para el desarrollo de una vacuna segura, es el estudio de candidatos vacunales que estimulen el sistema inmune (Brown *et al.*, 2006).

El gen *msa-1* (por sus siglas en inglés: merozoite surface antigen 1) es una glicoproteína de membrana de 42 kDa; se encuentra clasificado dentro de la familia de los antígenos variables de la superficie del merozoito (VMSA, Variable Merozoite Surface Antigen) de *B. bovis*, los que incluyen a los genes *BabR* originalmente descritos en cepas Australianas de *B. bovis* que se distinguen por su marcado polimorfismo (Hines *et al.*, 1992), y los genes *msa-1* y *msa-2*. La existencia de regiones en el gen *msa-1* con reducida variación de aminoácidos sugiere que las secuencias conservadas son esenciales para su estructura y función (Hines *et al.*, 1992).

Se ha observado que anticuerpos policlonales anti-MSA-1 neutralizan la invasión de merozoitos de *B. bovis* a eritrocitos *in vitro*, lo que sugiere un papel en el proceso de invasión a la célula blanco y la sobrevivencia del parásito, así como en la estimulación del sistema inmune (Hines *et al.*, 1992). Se ha identificado polimorfismo entre aislados de diferentes zonas geográficas que sugiere ser resultado de rearrreglos genéticos (Hines *et al.*, 1992; Hines *et al.*, 1995).

Estudios recientes proponen que el polimorfismo es limitado dentro una región geográfica que es compatible con el lento índice de variación antigénica, así como también puede ser por la presencia de variantes del gen *msa-1* (McElwain *et al.*, 1998). Estudios realizados en otro patógeno intraeritrocítico, *Anaplasma marginale*, han reportado la presencia y transmisión de múltiples genotipos del gen *msp1 α* (Por sus siglas en inglés: Major Surface Protein 1 alpha) dentro de hatos que se encuentran en regiones endémicas de la enfermedad. En estos animales se identificó una superinfección al analizar el gen, confirmando la presencia de variantes génicas de *A. marginale* (Palmer *et al.*, 2004).

En un estudio similar, el resultado del análisis del repertorio de pseudogenes *msp-2* de *A. marginale*, se observó que en una segunda cepa infectante el repertorio de pseudogenes de *msp-2* era totalmente diferente, así las variantes de MSP-2 pueden escapar al sistema inmune, mantenerse y ser capaces de establecerse como superinfección (Rodríguez *et al.*, 2005). Si esto ocurre en otros agentes patógenos como *Babesia bovis*, se desconoce a la fecha.

Aún cuando no se han analizado los diferentes genotipos existentes de *B. bovis* en un hato de bovinos a través del tiempo, esta claro que las diferencias de secuencias de las diversas cepas de *B. bovis* localizadas en regiones geográficas distintas, se traducen en una falta de reacción cruzada al utilizar algunos anticuerpos monoclonales específicos de MSA-1 (LeRoith *et al.*, 2005).

Sin embargo la evaluación de la secuencia de MSA-1 de cepas vacunales australianas mostró mayor similitud con la secuencias obtenidas de la clona mexicana Mo7 y cepas argentinas, que cuando se compararon con secuencias obtenidas de aislados de brotes de las cepas vacunales. La lisina del motivo YFK y los aminoácidos 9 y 12 conservados en todas las cepas estudiadas, sugiere que posiblemente contribuyan con los epítopes a la inducción de anticuerpos de reacción cruzada, lo que hace al gen *msa-1* un candidato para la producción de vacunas (LeRoith *et al.*, 2005).

Considerando que los genes *msp1 α* y los pseudogenes *msp-2* de *A. marginale*, así como el gen *msa-1* de *B. bovis*, son genes de superficie, y están involucrados en la adhesión a las células blanco, se puede pensar que *msa-1* podría llevar a cabo la misma acción de superinfección y ser así como evade al sistema inmune.

Por todo lo anterior, se propone que en infecciones por *Babesia bovis* al igual que *A. marginale* existen distintos genotipos en relación al gen *msa-1*.

JUSTIFICACIÓN

Mediante el análisis de antígenos fraccionados de merozoitos en inmunizaciones y desafíos, se logró identificar a MSA-1 como una proteína estimuladora de células T específicas contra *B. bovis* (Brown y Palmer, 1999). MSA-1 se expresa en esporozoitos y merozoitos de *B. bovis* y anticuerpos específicos contra MSA-1 inhiben la adhesión de merozoitos y esporozoitos a los eritrocitos y esto incrementa la posibilidad de una vacunación efectiva contra *Babesia bovis*, utilizando estos antígenos por lo que se propone al gen *msa-1* como candidato vacunal (Hines *et al.*, 1992; Mosqueda *et al.*, 2002). Sin embargo, las bases genéticas del polimorfismo para *msa-1* no han sido investigadas ampliamente y la variación antigénica es un reto para su uso en la vacunación (Palmer *et al.*, 1991).

En análisis recientes de las secuencias de aminoácidos de *msa-1* de varias cepas vacunales australianas y sus aislados de brotes, así como de la clona mexicana Mo7 de *B. bovis*, se han observado variaciones, sin embargo como familia, los genes *vmsa* comparten identidad en las regiones amino-terminal y carboxilo-terminal y pequeños fragmentos fuera de estas regiones (Hines *et al.*, 1992; LeRoith *et al.*, 2005). El dominio más hidrofílico corresponde al motivo YFK estrictamente conservado en todos los *msa-1* de los aislados evaluados (LeRoith *et al.*, 2005). La región hipervariable (por sus siglas en inglés: HVR, Hypervariable Region) de MSA-1 contiene tres motivos de prolina que son conservados. Se ha descrito que anticuerpos monoclonales contra la HVR inhiben la invasión de merozoitos *in vitro*, lo que indica la importancia de esta región dentro del proceso de invasión al eritrocito (LeRoith *et al.*, 2006).

La variación de la secuencia de MSA-1 de *B. bovis* dentro de una región endémica implica la variación a nivel génico (Allred y Al-Khedery, 2004). Las secuencias identificadas de *msa-1* de aislados de brotes fueron totalmente diferentes de la cepa vacunal de la cual provenían (LeRoith *et al.*, 2005) por lo cual se ha propuesto que la presión inmunológica ejercida sobre *msa-1* puede ser una de las razones por las que se generan variantes de MSA-1 y es considerada un factor determinante para la elaboración de vacunas. Debido a que una vez que se establece una respuesta específica contra epítopes de un determinado MSA-1, la respuesta inmune generada anteriormente no será compartida con los epítopes de una nueva variante de MSA-1 (LeRoith *et al.*, 2005).

A la fecha, no es conocida la variación génica presente en un hato bovino en situaciones de campo, como tampoco los factores que contribuyen a la presencia de polimorfismos, ni la frecuencia con que se presentan (McElwain *et al.*, 1998).

En la actualidad no existen estudios que indiquen cual es el comportamiento ni la frecuencia de la variabilidad del gen *msa-1* dentro de poblaciones de *B. bovis* ya establecidas dentro de zonas endémicas a través del tiempo. Los conocimientos generados de tales estudios permitirán conocer como es el comportamiento de la variación de *msa-1* en hatos de bovinos en situaciones de campo, para poder identificar aquellas variantes que sean importantes para el parásito y poder proponerlas para desarrollar herramientas de control como vacunas mejoradas.

HIPÓTESIS 1

Existe diversidad de genotipos de *msa-1* de *Babesia bovis* dentro de un mismo hato.

HIPÓTESIS 2

Existe generación de variantes alélicas de *msa-1* de *Babesia bovis* en animales de campo crónicamente infectados a través del tiempo.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del proyecto es determinar si existe diversidad de genotipos de *msa-1* de *Babesia bovis* dentro de un misma población de bovinos, y si existe la generación de variantes alélicas de *msa-1* dentro de un mismo bovino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos que se plantean para el desarrollo del proyecto son los siguientes:

1. Seleccionar animales infectados naturalmente con *Babesia bovis* por serología (IFI) en dos ranchos localizados en zonas endémicas.
2. Purificar el DNA y amplificar mediante PCR el gen *msa-1* de *B. bovis* de eritrocitos de los bovinos seleccionados.
3. Determinar el genotipo de cada una las poblaciones de *Babesia bovis* mediante la secuenciación y el análisis del gen *msa-1*.
4. Comparar los genotipos del gen *msa-1* en un mismo hato
5. Comparar los genotipos del gen *msa-1* en un mismo animal y evaluar su variación a través del tiempo.

LÍMITES Y ALCANCES

Para la realización del proyecto de investigación se muestrearán vaquillas en dos ranchos de regiones endémicas de babesiosis. Los ranchos son: el Sitio Experimental “Verdineño”, localizado en el municipio de Santiago Ixcuintla en Nayarit, y el Rancho “La Joya”, localizado en el municipio de Tapalpa en Jalisco. Se realizarán dos muestreos con intervalos de 6 meses aproximadamente en ambos ranchos.

Se seleccionarán vaquillas en edades promedio de 1.5 a 4 años y con un número máximo de 100 animales por área. La cantidad de animales dependerá del manejo apropiado de los mismos, ya que los animales se encuentran a campo abierto en las instalaciones y esto dificultaría su localización y manejo. La toma de muestras será realizada en colaboración con trabajadores propios de los ranchos y miembros del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP.

La primera etapa para realizar el proyecto de investigación, es la indentificación de animales infectados con *Babesia bovis*, para esto se utilizará la prueba serológica de Inmunofluorescencia Indirecta. Aquí se determinará cuales animales serán los seleccionados para éste estudio, ya que sólo se tomarán en cuenta aquellos que resulten positivos a la prueba. En esta etapa podemos encontrar la limitante de encontrar altos números de animales falsos positivos debido a que los animales son expuestos periódicamente a la infección de Babesia por garrapatas, y como consecuencia que los bovinos presenten títulos de anticuerpos contra Babesia y no necesariamente se encuentren infectados. Otro punto importante a mencionar es la posibilidad de los falsos negativos, debido a que los animales no hayan generado anticuerpos el momento de la toma de muestra.

La etapa de amplificación por PCR del gen *msa-1* de las muestras seleccionadas, permitirá comprobar que las muestras seleccionadas por serología sean realmente positivas a *Babesia bovis* y que la cantidad de DNA purificado de las muestras sea suficiente para su amplificación, debido a que se trabajará con animales infectados crónicamente y el porcentaje tan bajo de parasitemia que presentan los animales de campo puede ser una limitante para este fin.

Si se confirma la hipótesis de este proyecto de que existe diversidad de genotipos de *msa-1* de *B. bovis* dentro de un mismo hato, se podrá suponer que la presencia de diferentes aislados en una misma población de bovinos provee al parásito una manera potencial para su transmisión. De igual manera si se confirma que existe generación de variantes alélicas de *msa-1* de *B. bovis* en animales de campo crónicamente infectados a través del tiempo se podrá confirmar que al igual que otros parásitos como *Plasmodium*, *Babesia bovis* utiliza esta clase de mecanismo para la evasión del sistema inmune evitando su eliminación y así facilitar su supervivencia en el individuo hospedero.

El análisis de proteínas de superficie como MSA-1 es de suma importancia debido a que contienen epítopes que inducen una respuesta inmune, por lo anterior *msa-1* se propone como candidato vacunal. Es importante señalar que para el desarrollo de una vacuna contra este antígeno se deben analizar los epítopes de células B y T presentes en la región hipervariable y GPI donde existen segmentos conservados, que sean sensibles a la neutralización. Hasta el momento no hay estudios respecto a la variabilidad que pueda presentar este gen en una población donde un aislado se encuentre establecido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras biológicas

La selección de los bovinos fue realizada de la siguiente manera: un número total de 400 vaquillas se muestrearon en dos ranchos localizados en regiones endémicas de la babesiosis en el país. Los ranchos son: el Sitio Experimental “Verdineño”, localizado en el municipio de Santiago Ixcuintla en Nayarit, y el Rancho “La Joya”, localizado en el municipio de Tapalpa en Jalisco. Se realizaron dos muestreos de cada rancho con un intervalo de 6 meses aproximadamente, el primer muestreo fue llevado a cabo en el mes de mayo y el segundo en el mes de noviembre del 2006. Las vaquillas se muestrearon para obtención de sangre completa utilizando tubos con EDTA y tubos sin anticoagulante. Los eritrocitos y el suero se congelaron a -20°C hasta su uso.

Selección de animales infectados naturalmente con *Babesia bovis* por serología mediante la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

Identificación de animales serológicamente positivos a *Babesia bovis*.

En un primer análisis enfocado a seleccionar bovinos con mayor probabilidad de estar infectados a *Babesia bovis*, se realizó un tamizado serológico mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para identificar merozoitos de *B. bovis* a partir de sangre infectada como ya se ha reportado antes (Weiland y Reiter, 1988) y es utilizada de forma rutinaria en el CENID-PAVET. Brevemente las laminillas con el antígeno (eritrocitos de bovino infectados con merozoitos de *B. bovis*) se desecaron en cloruro de calcio al vacío durante media hora. Las laminillas fueron fijadas en acetona al 100% durante 5 minutos. Al término de la fijación, se dibujaron con un lápiz graso pequeños círculos sobre la laminilla del antígeno donde posteriormente se colocaron los sueros de los 400

animales a analizar. Como paso siguiente se realizaron las diluciones 1:80 de los sueros de animales problema en PBS 1x (NaH₂PO₄ 0.23 gr, Na₂HPO₄ 1.15 gr, NaCl 9 gr a pH 7.2), se colocaron sobre el antígeno y se incubaron por 30 minutos a 37°C en la cámara húmeda. Se realizaron dos lavados en la caja de coplin con PBS 1x de 5 minutos cada uno, posteriormente se hizo un tercer lavado con agua destilada, todos los lavados se hicieron sobre el agitador a temperatura ambiente. Las laminillas se dejaron secar y posteriormente se colocó el anticuerpo secundario (conejo anti-bovino, unido a FITC, por sus siglas en inglés: Fluoresceine Isothiocyanate) en dilución 1:100. Posteriormente se incubó en la cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos. Las preparaciones se lavaron nuevamente como se indicó anteriormente y se dejaron secar las laminillas. Al momento de observar las preparaciones al microscopio de fluorescencia con filtros específicos, se colocó una gota de glicerina fosfatada en cada círculo y se observaron con el objetivo de 100x y con un filtro doble. Como controles positivos fueron utilizados sueros de bovinos infectados con *B. bovis* y como controles negativos se utilizaron sueros de bovinos no infectados y PBS.

Extracción de DNA y amplificación mediante PCR del gen *msa-1* de los bovinos seleccionados.

Extracción de DNA genómico.

Aquellos bovinos con serología positiva para *Babesia bovis* mediante la prueba de inmunofluorescencia fueron seleccionados para la extracción y purificación de DNA. Se seleccionaron 174 muestras de sangre del rancho experimental el Verdineño, Nayarit y 90 muestras del rancho La Joya, Jalisco, dando un total de 264 animales. Seguido a esto se lavaron las muestras de sangre con PBS 1X y se centrifugó a 14,000 rpm durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante y se trabajó con la pastilla obtenida. Para la purificación de DNA genómico se utilizó el kit comercial de aislamiento de DNA (Gentra Systems ®),

realizando una adaptación del protocolo para la purificación de DNA a partir de sangre completa. Como primer paso, a cada volumen de eritrocitos infectados se le añadieron 6 volúmenes de PBS 1x, esto con la finalidad de lavar las células. Las muestras se homogenizaron y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante y se mantuvo la pastilla. Posteriormente a cada volumen de eritrocitos se le adicionaron 3 volúmenes de la solución de lisis RBC (Por sus siglas en inglés: Red Blood Cells). Se invirtieron gentilmente los tubos (Phenix research products ® 1.5ml boilproof microtubes) por 10 ocasiones y se incubó durante un minuto a temperatura ambiente (TA). Transcurrido el tiempo se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos, removiendo el sobrenadante dejando atrás la pastilla visible y se agitó vigorosamente. Se adicionaron 450 µl de la solución de lisis celular para resuspender las células y 50 µl de proteinasa K (2 mg/ml, Fermentas ®) y se incubaron durante una hora a 37 °C. Se dejaron enfriar , para posteriormente adicionar 200 µl de la solución de precipitación de proteína. Se homogenizaron y se agitó vigorosamente durante 20 segundos, se centrifugó durante 3 minutos a 14,000 rpm. Paralelamente se adicionaron 500 µl de isopropanol y 50 µl de glicógeno (20 mg/ml, Roche ®) en tubos nuevos de 1.5 ml y se le adicionó el sobrenadante, y se centrifugó durante 5 minutos a 14,000 rpm. Se decantó el sobrenadante previniendo no perder la pastilla. Se adicionaron 500 µl de etanol al 70% y se invirtieron los tubos en varias ocasiones para el lavado de la pastilla de DNA y se centrifugó durante 2 minutos a 14,000 rpm. Se removió el sobrenadante y se dejaron secar los tubos hasta que el etanol se evaporó por completo. Finalmente se adicionaron 30 µl de la solución de hidratación de DNA y se dejaron reposar durante toda la noche. El procedimiento de extracción de DNA genómico se realizó tres veces para el máximo aprovechamiento de las 264 muestras sanguíneas, dando un total de 792 extracciones de DNA. Las muestras se mantuvieron a una temperatura de -20 °C hasta su uso.

Amplificación por PCR del gen *msa-1* de *Babesia bovis*.

Para la amplificación del gen *msa-1*, se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron oligonucleótidos específicos para *msa-1* diseñados con el programa VECTOR NTI ADVANCE 10TM (Invitrogen). La secuencia de *msa-1* utilizada para el diseño de los oligonucleótidos corresponde a la reportada en el GenBank con número de acceso AF275908. Se diseñaron tres pares de oligonucleótidos como se muestra en el cuadro 1.

PCR	Oligonucleótido	Secuencia
Primario	msa-1F (sentido)	5'-CTT TGT TCA ATG GAA TCT G-3'
	msa-1 R(antisentido)	5'-GCA TTG GAG TGA ACC AAC AGT AGA AC-3'
Anidado	msa-1 F	5'-AGA CGT TGC ACA GCA ACA CAA G -3'
	msa-1 R	5'- GCT GGT ATT CTG TCA CAA TGA CG-3'
2do anidado	msa-1 F	5'-ATT CGT GTC AAC AAT CTG CAT AAG G-3'
	msa-1 R	5'-TTA AAA TGC AGA GAG AAC GAA GTA GCA-3'

Cuadro 1. Relación de oligonucleótidos específicos de *msa-1* de *B. bovis*, diseñados con el programa VECTOR NTI ADVANCE 10TM (Invitrogen) para la realización del PCR primario, PCR anidado y para un segundo PCR anidado.

Con los oligonucleótidos utilizados para la realización del PCR primario se obtiene un fragmento de 1498 pb (pares de bases), con los oligonucleótidos utilizados para la realización del PCR anidado se obtiene un fragmento de 1381 bp y finalmente con los oligonucleótidos utilizados para un segundo PCR anidado se obtiene un fragmento de 1216 pb. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Whatman Biometra ®. El programa de ciclado utilizado fué diseñado específicamente para la amplificación de *msa-1* con los oligonucleótidos descritos arriba y se usa de forma rutinaria en el Instituto de Patología y Microbiología

Veterinaria de la Universidad del Estado de Washington, el cual se lleva a cabo de la siguiente manera: La reacción de PCR se realizó a un volumen final de 25 μ l, para ello se emplearon los siguientes reactivos: solución amortiguadora de PCR 10x, cloruro de magnesio $MgCl_2$ 50 mM, Taq Polimerasa 500 u (Invitrogen $\text{\textcircled{R}}$), 10mM de cada uno de los 4 deoxinucleótidos (Invitrogen $\text{\textcircled{R}}$), 10 mM Tris-HCl, 40 ng aproximadamente de DNA genómico y 200 nM de los oligonucleótidos *msa-1* F y, *msa-1* R.

Protocolo de ciclado

Se realizó una desnaturalización inicial a 96°C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos de una fase de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos; una fase de alineamiento de los oligonucleótidos a 55°C durante 30 segundos, y una fase de elongación a 72°C durante un minuto. Seguidos de una elongación final a 72°C durante 15 minutos. Posteriormente la muestra se mantuvo a 10°C por tiempo indefinido hasta su análisis (protocolo diseñado por Shawn Berens, 2006) (figura 1).

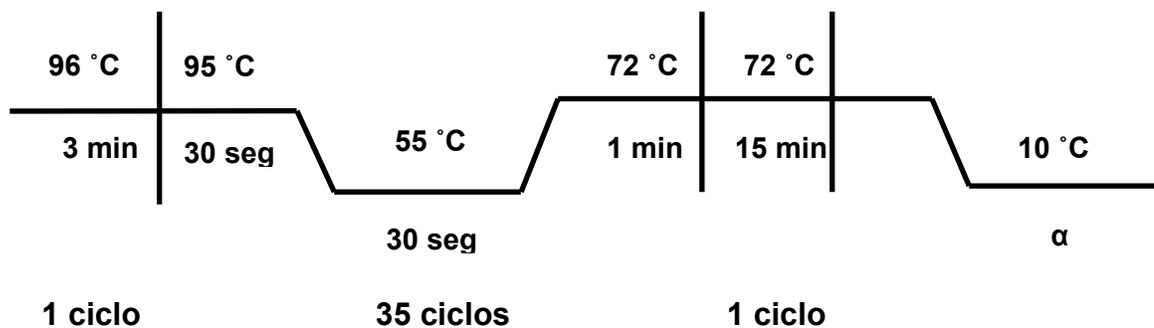


Figura 1. Protocolo de ciclado de PCR específico para *msa-1* de *B. Bovis*.

En la etapa para la amplificación del gen *msa-1*, el procedimiento para el PCR primario se repitió en tres ocasiones a partir de las 792 muestras de DNA genómico.

Purificación de productos de PCR

El DNA amplificado por PCR fue visualizado en un gel de agarosa al 1%. Se utilizó este porcentaje porque permite realizar un corte en el gel a nivel del tamaño esperado del amplicón, y tomando como base el control positivo, se procedió a realizar las incisiones en los geles de agarosa debido a la imposibilidad de visualizar una banda del amplicón de cada una de las muestras obtenidas a partir de los PCR primarios.

A partir del fragmento escindido se realizó el aislamiento de DNA con el kit de purificación de productos de PCR por Roche ®. Para el uso de este kit se determinó el peso del gel, primeramente se realizó el pesaje de un tubo de 1.5ml vacío y después se repitió el pesaje del tubo con el pedazo de gel escindido. Se adicionaron 300 µl de solución amortiguadora de Unión por cada 100 mg de gel escindido y se agitó en el vortex durante 30 segundos y se incubó durante 10 minutos a una temperatura de 56°C. Se adicionaron 150 µl de isopropanol por cada 100 mg de gel escindido y se agitó vigorosamente. El contenido se cambió a columnas y se centrifugó durante 60 segundos a 15,000 rpm. Se desechó el filtrado y se adicionaron 500 µl de la solución de lavado y se centrifugó durante 1 minuto a 15,000 rpm. Se desechó de nuevo el filtrado y se repitió el paso anterior pero en esta ocasión se adicionaron únicamente 200 µl de la solución de lavado. Se desechó el filtrado y se cambió la columna a un nuevo tubo. Como paso final se adicionaron 50 µl de la solución de elusión y se centrifugó durante 1 minuto a 15,000 rpm.

Posteriormente se realizó el PCR con el juego de oligonucleótidos para la PCR anidado con el programa de ciclado antes mencionado obteniendo fragmentos de tamaño esperado de 1381 bp. Se llevó a cabo un segundo PCR anidado se dejó a consideración para las muestras que resultaron negativas al primer PCR anidado en el análisis del gel de agarosa 1%, se emplearon las mismas condiciones de ciclado, con lo que se obtuvieron fragmentos esperados de 1216 bp.

Clonación del gen *msa-1* de *Babesia bovis*.

La clonación de los 36 productos amplificados exitosamente se realizaron de acuerdo al protocolo del kit TOPO TA Cloning para secuenciación (pCR[®] 4-TOPO Invitrogen). Para el montaje de las reacciones de clonación se tomaron 4 µl del producto fresco de PCR, 1 µl de la solución salina y 1 µl del vector pCR[®] 4-TOPO con un volumen final de 6 µl. Se mezcló y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se mantuvo en hielo. Para la transformación y análisis se prosiguió con el descongelamiento en hielo de las células *E. coli* TOP10 químicamente competente (Invitrogen[®]). Se adicionaron 2 µl de la reacción de clonación a cada vial de *E. coli*, se mezcló y se incubó en hielo durante 30 minutos. El choque térmico de las células se realizó en baño maría durante 30 segundos a una temperatura de 42°C. Se adicionaron 250 µl de medio S.O.C para después mantener los viales en agitación a 200 rpm durante una hora a 37°C. Al término del tiempo se esparcieron 100 y 150 µl de la suspensión de las células transformadas en placas de LB agar/ carbenicilina (50 mg/ml) conteniendo X-gal (40 mg/ml) y se incubaron a 37 °C toda la noche.

Se realizó la selección de 8 colonias de cada una de las 72 placas, se estriaron en medio sólido LB agar/carbenicilina/X-gal y se incubaron a 37°C. Paralelamente se colocaron los palillos de madera con los que se estriaron las colonias en placas de cultivo de 96 pozos, proporcionadas por el Kit de purificación

de DNA plasmídico Wizard SV 96 plasmid DNA purification system por Promega®, conteniendo 800µl de medio LB líquido, y éstas fueron incubadas durante toda la noche a 37°C con una agitación de 250 rpm.

Purificación de DNA plasmídico

La purificación del DNA plasmídico se realizó según el protocolo de lisis alcalina del kit Wizard SV 96 plasmid DNA purification system por Promega®. Las placas adicionadas con medio LB líquido se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos, se decantó el sobrenadante. Se adicionaron 250 µl de la solución de resuspensión celular a cada uno de los pozos. Se adicionaron 250 de la solución de lisis celular y, se colocó una malla sobre la placa para su agitación por vortex. Se adicionaron 350 µl de la solución de neutralización a cada pozo y se mezcló por vortex. Se transfirieron las muestras de la placa de cultivo hacia una placa de filtración.

Las siguientes etapas de la purificación se realizaron en un aparato de vacío múltiple Vac-Man® 96. La placa de filtrado se colocó en la parte superior y una placa de unión del DNA fue colocada en la parte inferior del aparato de vacío. Ya teniendo ambas placas instaladas, se utilizó vacío hasta que el líquido se filtró por completo y la placa de filtrado se desechó. Se adicionaron 500 µl de solución de neutralización a cada uno de los pozos de la placa de unión de DNA y se aplicó vacío durante un minuto. Se adicionó 1ml de solución de lavado a cada pozo y se aplicó vacío durante un minuto. Este mismo paso se repitió por una segunda vez, solo que en esta ocasión el vacío fué durante 10 minutos. En esta etapa la placa de unión se colocó en la parte superior y una placa nueva de elución en la parte inferior. Se adicionaron 100 µl de agua libre de nucleasas a cada pozo, se dejó reposar durante un minuto y posteriormente se aplicó vacío por un minuto. Se removió la placa de elución, se le colocó una malla selladora y se almacenó el DNA a -20°C hasta su uso.

Cuantificación de DNA plasmídico

La cuantificación de la concentración del DNA plasmídico se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260nm. Para verificar si el inserto efectivamente existía se realizó una digestión enzimática con la enzima *Eco RI* (Invitrogen ®) durante 1 hora en baño maría a 37°C. La mezcla contenía los siguientes reactivos: 2µl de Buffer 10x, 2µl de la enzima Eco-RI (10 U/µl), 4µl de DNA plasmídico y 12µl de agua libre de nucleasas a un volumen final de 20 µl. Y finalmente para la visualización de los fragmentos de DNA, se corrieron las muestras en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio, para posteriormente observarlos con un transiluminador (Sambrook *et al.*, 2001).

Secuenciación del gen *msa-1* de *Babesia bovis*.

La secuenciación se realizó de forma comercial por el Instituto de Bioinformática de la Universidad del Estado de Washington. Para esta etapa se utilizó el DNA plasmídico de 2 clonas de cada una de las 36 muestras obtenidas. Para el montaje de las reacciones se utilizaron 5.8 µl del DNA, 0.2 µl de oligonucleótidos M13F 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' y M13R 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3', provistos por el kit TOPO TA Cloning®, 4 µl de Big Dye Mix terminador v3.1 (Applied Biosystems®) en un volumen final de 10 µl. La purificación de las muestras para el envío se hizo de acuerdo al protocolo Edge BioSystems, Performa® DTR Gel Filtration Cartridges llevada a cabo de la siguiente manera: las columnas de filtrado se centrifugaron durante 3 minutos a 14,000 rpm para la eliminación de exceso de líquido de las mismas. Posteriormente las columnas fueron transferidas a tubos nuevos de 1.5 ml y se les adicionó a cada columna el producto de PCR fresco y se centrifugó durante 3 minutos a 14,000 rpm. Se eliminaron las columnas y, el filtrado fue deshidratado en una centrífuga de vacío para su posterior envío a secuenciación.

El protocolo de ciclado consistió en 25 ciclos conformados cada uno por una desnaturalización a 96°C durante 10 segundos, una fase de alineamiento a 50°C durante 15 segundos y una fase de elongación a 60°C durante 4 minutos (Figura 2).

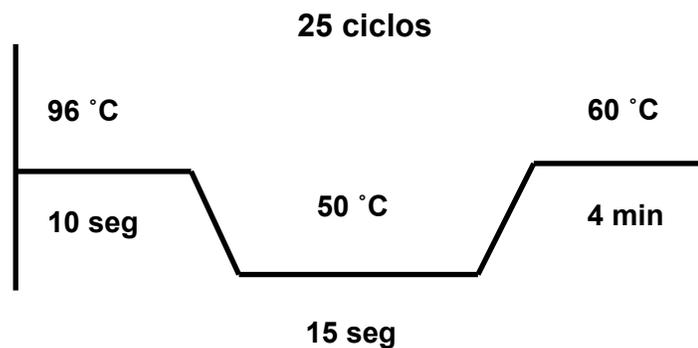


Figura 2. Protocolo de ciclado de PCR para la secuenciación del gen *msa-1* de *B. bovis* utilizado de forma rutinaria por el Instituto de Bioinformática de la Universidad del Estado de Washington.

Alineamiento de secuencias del gen *msa-1*.

Las secuencias de *msa-1* que se obtuvieron de las muestras de cada bovino, se emplearon para realizar el alineamiento. Los archivos de cada una de las secuencias fueron abiertos con el programa de Chromas lite 2.01 para el análisis de los electroferogramas. Para el alineamiento de las secuencias se utilizó el programa VECTOR NTI ADVANCE 10TM (Invitrogen). El alineamiento de las secuencias sirve para identificar las regiones variables de *msa-1*. El programa permite obtener la identidad que existe entre las secuencias.

Identificación de genotipos del gen *msa-1*.

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas de *msa-1* dio como resultado el agrupamiento de las secuencias en 9 genotipos diferentes, esto basado en el porcentaje de identidad entre las mismas secuencias como se detalla en la sección de Resultados. El agrupamiento de las secuencias en genotipos permitió realizar un análisis de la variabilidad del gen dentro de los hatos y entre los hatos.

Generación de secuencias predichas de aminoácidos de MSA-1

Las secuencias de las proteínas predichas fueron obtenidas con base en los alineamientos nucleotídicos realizados en la fase anterior de los cuales dió como resultado 8 proteínas predichas apartir de los 9 genotipos. Los análisis fueron realizados con el programa VECTOR NTI ADVANCE 10TM (Invitrogen). Para la creación de las proteínas predichas, se analizaron 9 moléculas de DNA generadas anteriormente (secuencias nucleotídicas) con el programa. Las moléculas son seleccionadas y se abren los archivos uno por uno de la ventana de exploración de la base de datos local de VECTOR NTI. Posteriormente en la ventana principal que ha sido abierta, se selecciona la secuencia nucleotídica de interés y en la aplicación de análisis se elige la opción de traducción, y crear nueva proteína de forma directa. Aparecerá una nueva ventana donde se ajusta la información referente a la proteína que se desea crear, y a consecutivamente será abierta la ventana donde aparece la nueva proteína predicha de interés.

Análisis filogenético de los genotipos de *msa-1*.

Los cambios que se producen en el DNA como las mutaciones, deleciones, inserciones etcétera, pueden darnos información (hipótesis o inferencia) sobre cuál es la función de una proteína o para establecer las relaciones de parentesco entre organismos. Los métodos de reconstrucciones filogenéticas elaboran árboles filogenéticos, diagramas donde es mostrado el objeto a estudiar y ancestros comunes de éste (inferidos). La construcción del árbol filogenético puede realizarse a partir en este caso, de secuencias de genes o proteínas en forma de un alineamiento múltiple (Page y Holmes, 1998).

Los métodos de recostrucción filogenético basados en distancias (UPGMA y Neighbor joining) utilizan los alineamientos múltiples para calcular las distancias evolutivas entre las secuencias para después elaborar el árbol filogenético. El método UPGMA (por sus siglas en inglés: Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic means), utiliza un algoritmo de agrupamiento de abajo hacia arriba donde son unidos los dos grupos más cercanos y calculan distancias y así sucesivamente con el resto del grupo total que ha sido alineado; este proceso de agrupamiento asume que el rango evolutivo es el mismo en todas las ramas, lo que sugiere que ningún linaje ha acumulado mutaciones más rápido que cualquier otro (Nei y Kumar, 2000). El método neighbor joining también agrupa de abajo hacia arriba y es basado en un principio de evolución mínima y un concepto de vecinos que están más cercanos entre sí y apartados del resto (Sullivan *et al.*, 2005).

Los métodos anteriores, basados en caracteres, utilizan la información de cada sitio y posición de los alineamientos múltiples para elaboración del árbol filogenético. El método de máxima parsimonia se basa en el principio de que el árbol más probable (parsimonioso) es el que tiene un menor número de cambios, similar al principio de la evolución mínima (Rzhetsky y Nei, 1992).

Para la realización de esta etapa se construyeron diferentes árboles filogenéticos empleando las secuencias de nucleótidos obtenidas previamente con el programa VECTOR NTI ADVANCE 10TM (Invitrogen) y se realizó por medio de los diferentes métodos antes mencionados (Máxima parsimonia, Mínima evolución, Neighbor joining, y UPGMA) proporcionados por el programa filogenético MEGA 4, disponible en la página de Internet www.megasoftware.net. Se produjeron conjuntos de datos múltiples por medio del método de remuestreo (Bootstrap), es decir, que los alineamientos se muestrearon en repetidas ocasiones (1000 veces) con un reemplazamiento para buscar el mejor árbol filogenético.

El análisis de remuestreo es proporcionado por el programa empleado. Se obtuvieron filogramas del gen *msa-1* de las secuencias de los aislados de Nayarit y Jalisco, así como también de secuencias ya reportadas en la base de datos GenBank (Genis *et al.*, 2008; Borgonio *et al.*, 2008).

RESULTADOS

Selección de animales infectados naturalmente con *Babesia bovis* por medio de la técnica de Inmunofluorescencia indirecta.

Un total de 200 muestras séricas obtenidas de animales del rancho el Verdineño en Nayarit, se colectaron con un intervalo de 6 meses entre cada muestreo. Utilizando el mismo esquema de muestreo, 200 sueros obtenidos de animales del rancho la Joya en Jalisco se utilizaron para realizar las pruebas serológicas.

Las muestras de los sueros obtenidos de los animales del rancho el Verdineño se analizaron con la prueba de Inmunofluorescencia indirecta; 91 animales resultaron positivos del primer muestreo y 83 animales positivos para el segundo muestreo. Los sueros obtenidos del rancho la Joya se evaluaron de la misma manera y de los 200 sueros analizados el resultado fue de 45 animales positivos del primer muestreo y 45 animales positivos del segundo muestreo (Cuadro 2).

	1er Muestreo Número total	Positivos a IFI	2do Muestreo Número total	Positivos a IFI
Rancho El Verdineño, Nayarit	100	91	100	83
Rancho La Joya, Jalisco	100	45	100	45

Cuadro 2. Resultados del análisis a la infección por *Babesia bovis* mediante la inmunofluorescencia indirecta. Se muestra el número de animales analizados y el número de animales positivos a la prueba de inmunofluorescencia indirecta.

Amplificación del gen *msa-1* de *Babesia bovis* mediante PCR.

Para la amplificación del gen *msa-1* se utilizaron las muestras de DNA genómico extraído a partir de las muestras de sangre obtenidas de animales seleccionados en el primer análisis como se indicó en la sección anterior. El DNA genómico se amplificó con un PCR primario con el uso de los oligonucleótidos específicos (cuadro 1) como se describió en Materiales y Métodos. Al no poder visualizar ningún amplicón en esta primera etapa, se decidió realizar una purificación de los productos de PCR primario mediante el corte del gel de agarosa 1%, a nivel del tamaño esperado del amplicón (Figura 3).

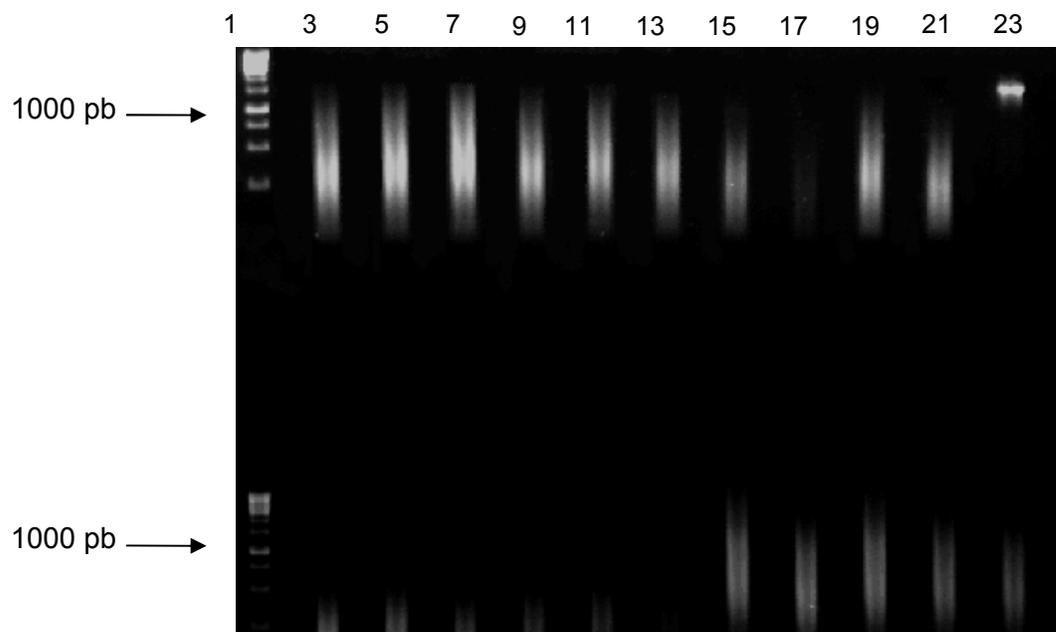


Figura 3. Amplificación del gen *msa-1* por el PCR primario de 21 muestras de Nayarit. En la figura se muestra que el producto del PCR primario no fue suficiente para la amplificación del gen *msa-1* de *Babesia bovis*. El control positivo se encuentra en el carril 23 con un fragmento esperado de 1498 pb y el marcador de peso molecular se muestra en el carril 1 de la parte superior e inferior. Se utilizó un carril de separación entre cada muestra para evitar contaminación.

Como se mencionó anteriormente, de las muestras que no se observaron bandas positivas, se realizó la extracción de DNA mediante la purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa 1% para su posterior amplificación con un PCR anidado con el uso de los oligonucleótidos específicos (cuadro 1). El producto fué analizado en un gel de agarosa 1% , con lo que se obtuvo un amplicón esperado de 1381 bp y (Figura 4).

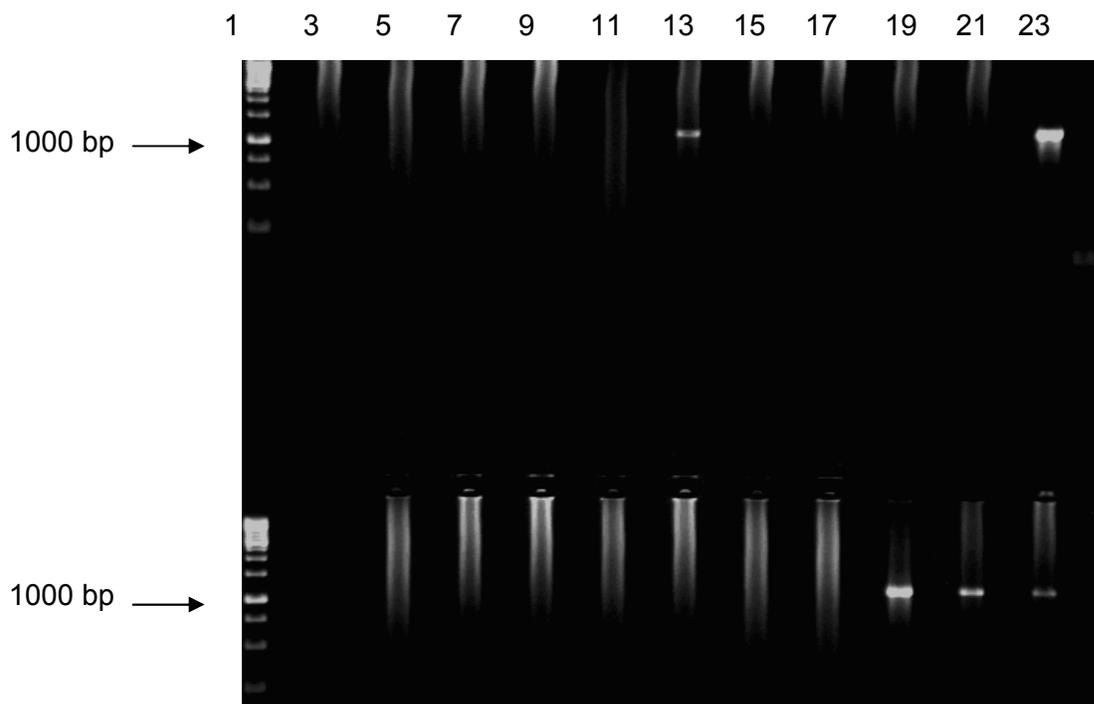


Figura 4. Amplificación del gen *msa-1* por PCR anidado de 21 muestras de Nayarit. En el carril 13 de la parte superior y en los carriles 19, 21, y 23 de la parte inferior se observan bandas al nivel del control positivo del carril 23 lo que confirma la amplificación del gen *msa-1* de esas muestras con un fragmento esperado de 1381 bp. El marcador de peso molecular se muestra en el carril 1 de la parte superior e inferior.

De las muestras en que no se observaron bandas positivas después del PCR anidado, se les realizó un segundo PCR anidado que amplifican un fragmento de 1216 bp, es de menor tamaño al esperado después del segundo PCR. Estos oligonucleótidos fueron el *msa-1F* 2do anidado y el *msa-1R* 2do anidado. El producto se analizó en un gel de agarosa 1% y se visualizó mediante excitación con luz UV y tinción con bromuro de etidio (Figura 5).

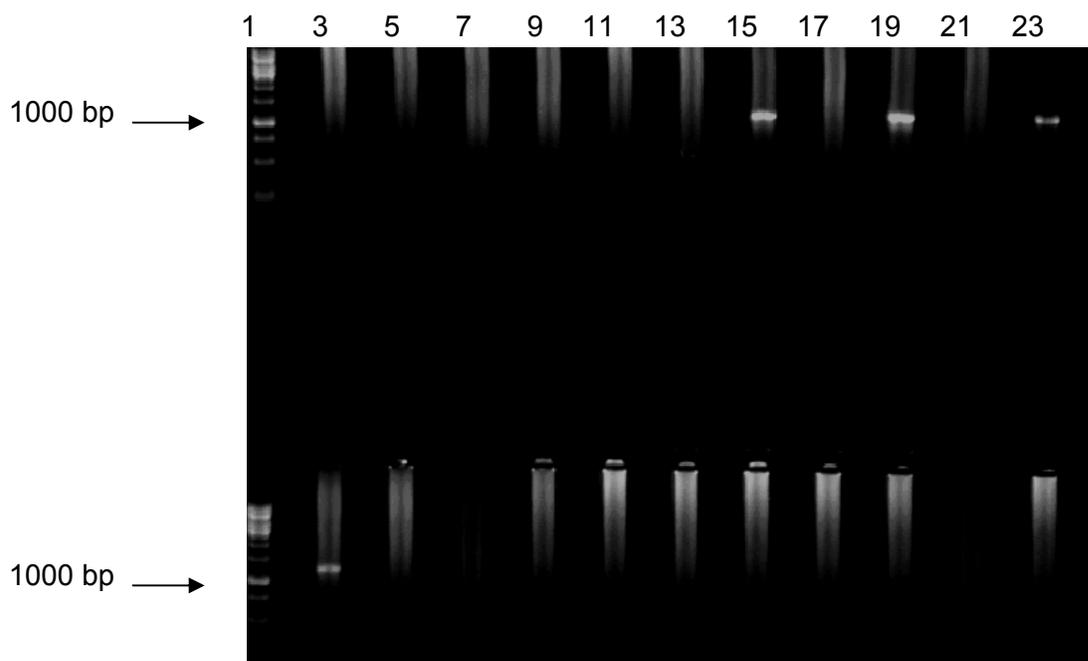


Figura 5. Amplificación del gen *msa-1* por un segundo PCR anidado de 21 muestras de Nayarit. En los carriles 15 y 19, de la parte superior y en el carril 3 de la parte inferior del gel se observa una banda que corresponde en tamaño al control positivo (carril 23 parte superior con un fragmento esperado de 1216 bp). El marcador de peso molecular se muestra en el carril 1 de la parte superior e inferior.

Del total de las muestras analizadas de ambos ranchos (264 muestras), 28 correspondientes al primer muestreo de Nayarit y 3 del segundo muestreo se logró la amplificación del gen; Para el rancho de Jalisco, 2 muestras del primer muestreo y 3 muestras del segundo muestreo se lograron amplificar. Este experimento se repitió por 3 ocasiones para corroborar que los resultados fueran correctos.

Clonación del gen *msa-1*

La clonación molecular del gen se hizo con un kit comercial (Invitrogen) lo que permitió obtener colonias de bacterias conteniendo como inserto la secuencia del gen amplificado de *msa-1*. Para comprobar que el inserto efectivamente pertenecía al fragmento deseado, se extrajo el DNA plasmídico a partir de poblaciones clonales de bacterias, y posteriormente se realizó una digestión enzimática con *EcoRI* y así se verificó la presencia del inserto correspondiente a *msa-1* en las clonas evaluadas como se aprecia en la Figura 6).

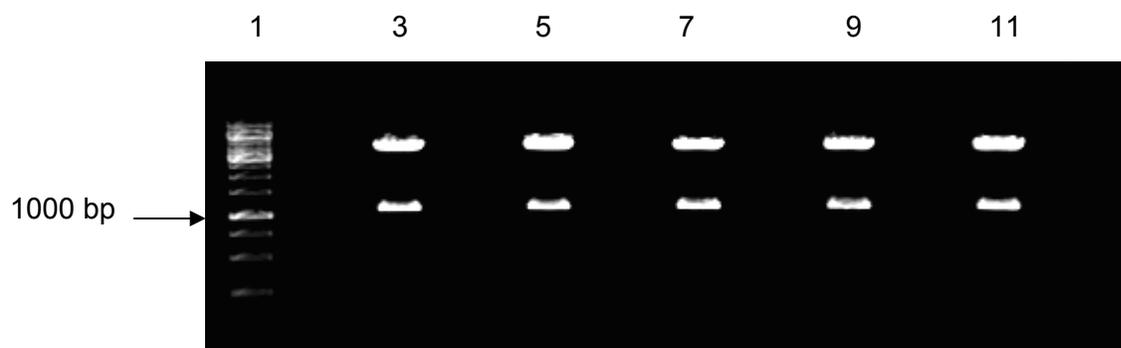


Figura 6. Digestión enzimática del DNA plasmídico purificado. En los carriles 3, 5, 7, 9 y 11 se muestra el ensayo de digestión enzimática con la enzima *EcoRI* con el DNA plasmídico obtenido de 5 clonas. En cada uno de los carriles se pueden observar dos bandas; la primera perteneciente al vector, y la segunda corresponde al fragmento clonado de *msa-1* (tamaños esperados: 1498 pb, 1381 pb y 1216 pb). El marcador de peso molecular se muestra en el carril 1.

Generación de las secuencias consenso

Se utilizaron 2 clonas de cada una de las 36 muestras de DNA plasmídico para su posterior secuenciación. Se obtuvieron 2 secuencias en sentido y contrasentido para cada una de las clonas, se obtuvo un total de 144 secuencias. Las 4 secuencias en sentido y contrasentido correspondientes a cada muestra fueron abiertas con el programa Chromas lite 2.01 para el análisis de los electroferogramas. Al análisis se corroboraron la identidad de nucleótidos, posiciones, deleciones e inserciones, para la generación de secuencias consenso.

Alineamiento múltiple de secuencias.

Se realizó el alineamiento múltiple de las 36 secuencias obtenidas de los 2 aislados mexicanos (Nayarit y Jalisco) mediante el uso del programa VECTOR NTI ADVANCE. Los alineamientos de las secuencias obtenidas de ambos ranchos durante los dos muestreos realizados se organizaron en diferentes grupos de genotipos, mostrando una posición idéntica del 51%, y una posición consenso del 93.7 % donde pueden observarse deleciones, inserciones y/o sustituciones provocando que el gen de *msa-1* tenga diferentes longitudes en oposición a la longitud antes reportada de 960 pb (Hines, 1992; Suárez *et al.*, 2000). Se pueden observar 4 grupos con base a sus longitudes se agrupan de la siguiente manera, 23 secuencias pertenecientes al rancho el Verdineño, Nayarit revelan una longitud de 960 pb, 11 secuencias ubicadas en el Verdineño, Nayarit y La Joya, Jalisco muestran una longitud de 993 pb, y dos más del Verdineño cuentan con una longitud de 1001 pb y 1005 pb respectivamente. Las moléculas de *msa-1* demostraron áreas conservadas en las regiones amino-terminal y carboxi-terminal. Cabe resaltar que las muestras con el número 3616v1 y 4526v1 son las menos conservadas en comparación del resto debido a inserciones ubicadas en las posiciones 79, 770, 796, 847, 863, y deleción en la posición 938 (figura 7).

4536v1 (71) TGACACAA-----TCGGATGTTAGAAATGCCGATACTTCAATCGTCTTCCCGAAGGATCATT
 4544v1 (71) TGACACAA-----TCGGATGTTAGAAATGCCGATACTTCAATCGTCTTCCCGAAGGATCATT
 4544v2 (71) TGACACAA-----TCGGATGTTAGAAATGCCGATACTTCAATCGTCTTCCCGAAGGATCATT
 4565v1 (71) TGACACAA-----TCGGATGTTAGAAATGCCGATACTTCAATCGTCTTCCCGAAGGATCATT
 5503v1 (71) TGACACAA-----TCGGATGTTAGAAATGCCGATACTTCAATCGTCTTCCCGAAGGATCATT
 5545v1 (71) TGACACAA-----TCGGATGTTAGAAATGCCGATACTTCAATCGTCTTCCCGAAGGATCATT
 4504v2 (71) CAGGTGAA-----AACGTTATTAGAGTTATGATTCTTCAATCCGATCTCCCGAAGGATATCT
 Mo7 (71) TGACACAA-----TCGGATGTTAGAAATGCCGATACTTCAATCGTCTTCCCGAAGGATCATT
 141 210
 5591v1 (129) TTACGATGATATGGCTAAGTTCTACGGTGCCGTTGAAAGCTTCGATAAGACTAAATTGTATGCTGTTATT
 53nj1 (129) TTACGATGATATGGCTAAGTTCTACGGTGCCGTTGAAAGCTTCGATAAGACTAAATTGTATGCTGTTATT
 2vj2 (129) TTACGATGATATGGCTAAGTTCTACGGTGCCGTTGAAAGCTTCGATAAGACTAAATTGTATGCTGTTATT
 4507v1 (129) TTACGATGATATGGCTAAGTTCTACGGTGCCGTTGAAAGCTTCGATAAGACTAAATTGTATGCTGTTATT
 5585v1 (129) TTACGATGATATGGCTAAGTTCTACGGTGCCGTTGAAAGCTTCGATAAGACTAAATTGTATGCTGTTATT
 8513v1 (129) TTACGATGATATGGCTAAGTTCTACGGTGCCGTTGAAAGCTTCGATAAGACTAAATTGTATGCTGTTATT
 32aj1 (129) TTACGATGATATGGCTAAGTTCTACGGTGCCGTTGAAAGCTTCGATAAGACTAAATTGTATGCTGTTATT
 32aj2 (129) TTACGATGATATGGCTAAGTTCTACGGTGCCGTTGAAAGCTTCGATAAGACTAAATTGTATGCTGTTATT
 4548v1 (129) TTACGATGATATGGCTAAGTTCTACGGTGCCGTTGAAAGCTTCGATAAGACTAAATTGTATGCTGTTATT
 32bj2 (129) TTACGATGATATGGCTAAGTTCTACGGTGCCGTTGAAAGCTTCGATAAGACTAAATTGTATGCTGTTATT
 3616v1 (141) TTACGATGATATGAAATAATTCTATGGTGCCGTTGAAAGTTTCGACAAGGATGATTGTATGCTGCCATT
 4526v1 (141) TTACGATGATATGAAATAATTCTATGGTGCCGTTGAAAGTTTCGACAAGGATGATTGTATGCTGTGATT
 4537v1 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 1520v1 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 1572v1 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 3538v1 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 3571v1 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 3597v1 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 3600v1 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 3601v1 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 3605v1 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 3611v1 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 4501v1 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 4503v1 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 4504v1 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 4506v1 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 4509v2 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 4517v1 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 4523v1 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 4536v1 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 4544v1 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 4544v2 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 4565v1 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 5503v1 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 5545v1 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 4504v2 (129) TTACGATGATATGGCTAAGTTCTACGGTGCCGTTGAAAGCTTCGATAAGACTAAATTGTATGCGGTTATT
 Mo7 (129) CTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGGAAGTTTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTT
 211 280
 5591v1 (199) GCTGCTAACTTCAAGAAACGCGGGCTAGCTGATGAAAAGGTTAAAGAAGCTTTTACCAGTCTATACAAAG
 53nj1 (199) GCTGCTAACTTCAAGAAACGCGGGCTAGCTGATGAAAAGGTTAAAGAAGCTTTTACCAGTCTATACAAAG
 2vj2 (199) GCTGCTAACTTCAAGAAACGCGGGCTAGCTGATGAAAAGGTTAAAGAAGCTTTTACCAGTCTATACAAAG
 4507v1 (199) GCTGCTAACTTCAAGAAACGCGGGCTAGCTGATGAAAAGGTTAAAGAAGCTTTTACCAGTCTATACAAAG
 5585v1 (199) GCTGCTAACTTCAAGAAACGCGGGCTAGCTGATGAAAAGGTTAAAGAAGCTTTTACCAGTCTATACAAAG
 8513v1 (199) GCTGCTAACTTCAAGAAACGCGGGCTAGCTGATGAAAAGGTTAAAGAAGCTTTTACCAGTCTATACAAAG
 32aj1 (199) GCTGCTAACTTCAAGAAACGCGGGCTAGCTGATGAAAAGGTTAAAGAAGCTTTTACCAGTCTATACAAAG
 32aj2 (199) GCTGCTAACTTCAAGAAACGCGGGCTAGCTGATGAAAAGGTTAAAGAAGCTTTTACCAGTCTATACAAAG
 4548v1 (199) GCTGCTAACTTCAAGAAACGCGGGCTAGCTGATGAAAAGGTTAAAGAAGCTTTTACCAGTCTATACAAAG
 32bj2 (199) GCTGCTAACTTCAAGAAACGCGGGCTAGCTGATGAAAAGGTTAAAGAAGCTTTTACCAGTCTATACAAAG
 3616v1 (211) TCTGCCAACTTCAAGCCGTCAGAAATGAGGATCAGCAGGTCGAGATGTTTACCTATATTACAAAG
 4526v1 (211) TCTGCCAACTTCAAGCCGTCAGAAATGAGGATCAGCAGGTCGAGATGTTTACCTATATTACAAAG
 4537v1 (199) TCTGCTAACTTCAAAGCCGCTAAAATGGATGATCAGAAGGTTAAAGAAGCAGATTCAAAAATTTATACAAAG
 1520v1 (199) TCTGCTAACTTCAAAGCCGCTAAAATGGATGATCAGAAGGTTAAAGAAGCAGATTCAAAAATTTATACAAAG
 1572v1 (199) TCTGCTAACTTCAAAGCCGCTAAAATGGATGATCAGAAGGTTAAAGAAGCAGATTCAAAAATTTATACAAAG
 3538v1 (199) TCTGCTAACTTCAAAGCCGCTAAAATGGATGATCAGAAGGTTAAAGAAGCAGATTCAAAAATTTATACAAAG
 3571v1 (199) TCTGCTAACTTCAAAGCCGCTAAAATGGATGATCAGAAGGTTAAAGAAGCAGATTCAAAAATTTATACAAAG
 3597v1 (199) TCTGCTAACTTCAAAGCCGCTAAAATGGATGATCAGAAGGTTAAAGAAGCAGATTCAAAAATTTATACAAAG
 3600v1 (199) TCTGCTAACTTCAAAGCCGCTAAAATGGATGATCAGAAGGTTAAAGAAGCAGATTCAAAAATTTATACAAAG
 3601v1 (199) TCTGCTAACTTCAAAGCCGCTAAAATGGATGATCAGAAGGTTAAAGAAGCAGATTCAAAAATTTATACAAAG
 3605v1 (199) TCTGCTAACTTCAAAGCCGCTAAAATGGATGATCAGAAGGTTAAAGAAGCAGATTCAAAAATTTATACAAAG

3611v1 (199) TCTGCTAACTTCA AAGCGCTAAAATGGATGATCAGAAAGGTAAAAGACACATTCAAAAATTTTATACAAAG

4501v1 (199) TCTGCTAACTTCA AAGCGCTAAAATGGATGATCAGAAAGGTAAAAGACACATTCAAAAATTTTATACAAAG

4503v1 (199) TCTGCTAACTTCA AAGCGCTAAAATGGATGATCAGAAAGGTAAAAGACACATTCAAAAATTTTATACAAAG

4504v1 (199) TCTGCTAACTTCA AAGCGCTAAAATGGATGATCAGAAAGGTAAAAGACACATTCAAAAATTTTATACAAAG

4506v1 (199) TCTGCTAACTTCA AAGCGCTAAAATGGATGATCAGAAAGGTAAAAGACACATTCAAAAATTTTATACAAAG

4509v2 (199) TCTGCTAACTTCA AAGCGCTAAAATGGATGATCAGAAAGGTAAAAGACACATTCAAAAATTTTATACAAAG

4517v1 (199) TCTGCTAACTTCA AAGCGCTAAAATGGATGATCAGAAAGGTAAAAGACACATTCAAAAATTTTATACAAAG

4523v1 (199) TCTGCTAACTTCA AAGCGCTAAAATGGATGATCAGAAAGGTAAAAGACACATTCAAAAATTTTATACAAAG

4536v1 (199) TCTGCTAACTTCA AAGCGCTAAAATGGATGATCAGAAAGGTAAAAGACACATTCAAAAATTTTATACAAAG

4544v1 (199) TCTGCTAACTTCA AAGCGCTAAAATGGATGATCAGAAAGGTAAAAGACACATTCAAAAATTTTATACAAAG

4544v2 (199) TCTGCTAACTTCA AAGCGCTAAAATGGATGATCAGAAAGGTAAAAGACACATTCAAAAATTTTATACAAAG

4565v1 (199) TCTGCTAACTTCA AAGCGCTAAAATGGATGATCAGAAAGGTAAAAGACACATTCAAAAATTTTATACAAAG

5503v1 (199) TCTGCTAACTTCA AAGCGCTAAAATGGATGATCAGAAAGGTAAAAGACACATTCAAAAATTTTATACAAAG

5545v1 (199) TCTGCTAACTTCA AAGCGCTAAAATGGATGATCAGAAAGGTAAAAGACACATTCAAAAATTTTATACAAAG

4504v2 (199) GCTGCTAACTTCA GAAGCGCGGGCTAGCTGATGAAAAGGTTAAGAGAGTTTACCGTCTATACAAAG

Mo7 (199) TCTGCTAACTTCA AAGCGCTAAAATGGATGATCAGAAAGGTAAAAGACACATTCAAAAATTTTATACAAAG

281 350

5591v1 (269) TCAAGTGCATCGATAAAGGTTAA CCAATGATTAAATTCCGACCTTTTTAAAGAA GAGGCTGTAAAGCAGTTT

53nj1 (269) TCAAGTGCATCGATAAAGGTTAA CCAATGATTAAATTCCGACCTTTTTAAAGAA GAGGCTGTAAAGCAGTTT

2vj2 (269) TCAAGTGCATCGATAAAGGTTAA CCAATGATTAAATTCCGACCTTTTTAAAGAA GAGGCTGTAAAGCAGTTT

4507v1 (269) TCAAGTGCATCGATAAAGGTTAA CCAATGATTAAATTCCGACCTTTTTAAAGAA GAGGCTGTAAAGCAGTTT

5585v1 (269) TCAAGTGCATCGATAAAGGTTAA CCAATGATTAAATTCCGACCTTTTTAAAGAA GAGGCTGTAAAGCAGTTT

8513v1 (269) TCAAGTGCATCGATAAAGGTTAA CCAATGATTAAATTCCGACCTTTTTAAAGAA GAGGCTGTAAAGCAGTTT

32aj1 (269) TCAAGTGCATCGATAAAGGTTAA CCAATGATTAAATTCCGACCTTTTTAAAGAA GAGGCTGTAAAGCAGTTT

32aj2 (269) TCAAGTGCATCGATAAAGGTTAA CCAATGATTAAATTCCGACCTTTTTAAAGAA GAGGCTGTAAAGCAGTTT

4548v1 (269) TCAAGTGCATCGATAAAGGTTAA CCAATGATTAAATTCCGACCTTTTTAAAGAA GAGGCTGTAAAGCAGTTT

32bj2 (269) TCAAGTGCATCGATAAAGGTTAA CCAATGATTAAATTCCGACCTTTTTAAAGAA GAGGCTGTAAAGCAGTTT

3616v1 (281) TTAGGATATGATAAAGAA GAA CCGTATATTGCTCCTGAACTATTTAAAGAACTGCTAAGGACAGTTT

4526v1 (281) TTAGGATATGATAAAGAA GAA CCGTATATTGCTCCTGAACTATTTAAAGAACTGCTAAGGACAGTTT

4537v1 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

1520v1 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

1572v1 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

3538v1 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

3571v1 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

3597v1 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

3600v1 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

3601v1 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

3605v1 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

3611v1 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

4501v1 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

4503v1 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

4504v1 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

4506v1 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

4509v2 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

4517v1 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

4523v1 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

4536v1 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

4544v1 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

4544v2 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

4565v1 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

5503v1 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

5545v1 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

4504v2 (269) TCAAGTGCATCGATAAAGGTTAA CCAATGATTAAATTCCGACCTTTTTAAAGAA GAGGCTGTAAAGCAGTTT

Mo7 (269) TCAACGCATTGATAAAGAACAA TCCTATGATTGCGCCGTGATCTATTTAATGCAACTATGTTAGCGGTTT

351 420

5591v1 (339) TTCAGGCAAGACAGACAGGATAAATTCAATGCTATATTTGAATCTATTAAGCAAAATGTCCTCAGAAAT

53nj1 (339) TTCAGGCAAGACAGACAGGATAAATTCAATGCTATATTTGAATCTATTAAGCAAAATGTCCTCAGAAAT

2vj2 (339) TTCAGGCAAGACAGACAGGATAAATTCAATGCTATATTTGAATCTATTAAGCAAAATGTCCTCAGAAAT

4507v1 (339) TTCAGGCAAGACAGACAGGATAAATTCAATGCTATATTTGAATCTATTAAGCAAAATGTCCTCAGAAAT

5585v1 (339) TTCAGGCAAGACAGACAGGATAAATTCAATGCTATATTTGAATCTATTAAGCAAAATGTCCTCAGAAAT

8513v1 (339) TTCAGGCAAGACAGACAGGATAAATTCAATGCTATATTTGAATCTATTAAGCAAAATGTCCTCAGAAAT

32aj1 (339) TTCAGGCAAGACAGACAGGATAAATTCAATGCTATATTTGAATCTATTAAGCAAAATGTCCTCAGAAAT

32aj2 (339) TTCAGGCAAGACAGACAGGATAAATTCAATGCTATATTTGAATCTATTAAGCAAAATGTCCTCAGAAAT

4548v1 (339) TTCAGGCAAGACAGACAGGATAAATTCAATGCTATATTTGAATCTATTAAGCAAAATGTCCTCAGAAAT

32bj2 (339) TTCAGGCAAGACAGACAGGATAAATTCAATGCTATATTTGAATCTATTAAGCAAAATGTCCTCAGAAAT

3616v1 (351) TACAAGTAGCAGTGACGAGGTTAAATTTAAAGCTATATTTGACTCCGTTGTCTATGCTTCAAGAAAT

4526v1 (351) TACAAGTAGCAGTGACGAGGTTAAATTTAAAGCTATATTTGACTCCGTTGTCTATGCTTCAAGAAAT

4537v1 (339) TTCAACTAAGAAATGACGAGGAAATTAATCAATGCTATATTTGACTCCAATAAGGGAATGACTATAGAGCT

4536v1 (549) TTGCAAGGAGTTTTTAA GCCCGCCTCGATTTCACAAACTTGTGAGTCTTTTGATGCGTTTGCACAT
4544v1 (549) TTGCAAGGAGTTTTTAA GCCCGCCTCGATTTCACAAACTTGTGAGTCTTTTGATGCGTTTGCACAT
4544v2 (549) TTGCAAGGAGTTTTTAA GCCCGCCTCGATTTCACAAACTTGTGAGTCTTTTGATGCGTTTGCACAT
4565v1 (549) TTGCAAGGAGTTTTTAA GCCCGCCTCGATTTCACAAACTTGTGAGTCTTTTGATGCGTTTGCACAT
5503v1 (549) TTGCAAGGAGTTTTTAA GCCCGCCTCGATTTCACAAACTTGTGAGTCTTTTGATGCGTTTGCACAT
5545v1 (549) TTGCAAGGAGTTTTTAA GCCCGCCTCGATTTCACAAACTTGTGAGTCTTTTGATGCGTTTGCACAT
4504v2 (549) GTGCAAGGTTTTTGGTGTATGATCAGACCTTAATAAACTTGTGTAACGTTTGATGATTTTGCAGAGA
Mo7 (549) TTGCAAGGAGTTTTTAA GCCCGCCTCGATTTCACAAACTTGTGAGTCTTTTGATGCGTTTGCACAT
631 700
5591v1 (619) GGTAGACATTATGACTTCAGAGAAATTATGTTGAACCTAACCTGATCTCAAGCTTCCTGAAGGATTA
53nj1 (619) GGTAGACATTATGACTTCAGAGAAATTATGTTGAACCTAACCTGATCTCAAGCTTCCTGAAGGATTA
2vj2 (619) GGTAGACATTATGACTTCAGAGAAATTATGTTGAACCTAACCTGATCTCAAGCTTCCTGAAGGATTA
4507v1 (619) GGTAGACATTATGACTTCAGAGAAATTATGTTGAACCTAACCTGATCTCAAGCTTCCTGAAGGATTA
5585v1 (619) GGTAGACATTATGACTTCAGAGAAATTATGTTGAACCTAACCTGATCTCAAGCTTCCTGAAGGATTA
8513v1 (619) GGTAGACATTATGACTTCAGAGAAATTATGTTGAACCTAACCTGATCTCAAGCTTCCTGAAGGATTA
32aj1 (619) GGTAGACATTATGACTTCAGAGAAATTATGTTGAACCTAACCTGATCTCAAGCTTCCTGAAGGATTA
32aj2 (619) GGTAGACATTATGACTTCAGAGAAATTATGTTGAACCTAACCTGATCTCAAGCTTCCTGAAGGATTA
4548v1 (619) GGTAGACATTATGACTTCAGAGAAATTATGTTGAACCTAACCTGATCTCAAGCTTCCTGAAGGATTA
32bj2 (619) GGTAGACATTATGACTTCAGAGAAATTATGTTGAACCTAACCTGATCTCAAGCTTCCTGAAGGATTA
3616v1 (631) CTTAAACATGAGCAGGGATGGCTAATTTATTTACACCTGAGAAACAATCTTACCTCTCT-CAGGAACTC
4526v1 (631) CTTAAACATGAGCAGGGATGGCTAATTTATTTACACCTGAGAAACAATCTTACCTCTCT-CAGGAACTC
4537v1 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
1520v1 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
1572v1 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
3538v1 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
3571v1 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
3597v1 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
3600v1 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
3601v1 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
3605v1 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
3611v1 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
4501v1 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
4503v1 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
4504v1 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
4506v1 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
4509v2 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
4517v1 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
4523v1 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
4536v1 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
4544v1 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
4544v2 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
4565v1 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
5503v1 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
5545v1 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
4504v2 (619) GGTAGACATTATGACTTCAGAGAAATTATGTTGAACCTGACCTGATCTCAAGCTTCCTGAAGGATTA
Mo7 (619) CTTAAGGTGCACGCTCAAGTAGAAATTTGTTAAACCTGGAAGTGCATCGCTCCTCT-AAGGATGTT
701 770
5591v1 (688) ATCGCTGAA GTAGAAAAGGAA GTAGCAA CCGTTAAA CCTGTAGAAA GAGAGA ATATCGTTTC ACCCGGT
53nj1 (688) ATCGCTGAA GTAGAAAAGGAA GTAGCAA CCGTTAAA CCTGTAGAAA GAGAGA ATATCGTTTC ACCCGGT
2vj2 (688) ATCGCTGAA GTAGAAAAGGAA GTAGCAA CCGTTAAA CCTGTAGAAA GAGAGA ATATCGTTTC ACCCGGT
4507v1 (688) ATCGCTGAA GTAGAAAAGGAA GTAGCAA CCGTTAAA CCTGTAGAAA GAGAGA ATATCGTTTC ACCCGGT
5585v1 (688) ATCGCTGAA GTAGAAAAGGAA GTAGCAA CCGTTAAA CCTGTAGAAA GAGAGA ATATCGTTTC ACCCGGT
8513v1 (688) ATCGCTGAA GTAGAAAAGGAA GTAGCAA CCGTTAAA CCTGTAGAAA GAGAGA ATATCGTTTC ACCCGGT
32aj1 (688) ATCGCTGAA GTAGAAAAGGAA GTAGCAA CCGTTAAA CCTGTAGAAA GAGAGA ATATCGTTTC ACCCGGT
32aj2 (688) ATCGCTGAA GTAGAAAAGGAA GTAGCAA CCGTTAAA CCTGTAGAAA GAGAGA ATATCGTTTC ACCCGGT
4548v1 (688) ATCGCTGAA GTAGAAAAGGAA GTAGCAA CCGTTAAA CCTGTAGAAA GAGAGA ATATCGTTTC ACCCGGT
32bj2 (688) ATCGCTGAA GTAGAAAAGGAA GTAGCAA CCGTTAAA CCTGTAGAAA GAGAGA ATATCGTTTC ACCCGGT
3616v1 (700) ATCAGTCTGTAGAAA ---TCA ---CAAGAGGAAA ---CCTGCGCGAACTGAGATGTTGATTACAGCCCT
4526v1 (700) ATCAGTCTGTAGAAA ---TCA ---CAAGAGGAAA ---CCTGCGCGAACTGAGATGTTGATTACAGCCCT
4537v1 (688) ACTGATGCATTAGAAAAGGAA TTGCAAGAGCAAAA CCTGCACGAA GTGAGAGCACCAGGATACCCGCT
1520v1 (688) ACTGATGCATTAGAAAAGGAA TTGCAAGAGCAAAA CCTGCACGAA GTGAGAGCACCAGGATACCCGCT
1572v1 (688) ACTGATGCATTAGAAAAGGAA TTGCAAGAGCAAAA CCTGCACGAA GTGAGAGCACCAGGATACCCGCT
3538v1 (688) ACTGATGCATTAGAAAAGGAA TTGCAAGAGCAAAA CCTGCACGAA GTGAGAGCACCAGGATACCCGCT
3571v1 (688) ACTGATGCATTAGAAAAGGAA TTGCAAGAGCAAAA CCTGCACGAA GTGAGAGCACCAGGATACCCGCT
3597v1 (688) ACTGATGCATTAGAAAAGGAA TTGCAAGAGCAAAA CCTGCACGAA GTGAGAGCACCAGGATACCCGCT
3600v1 (688) ACTGATGCATTAGAAAAGGAA TTGCAAGAGCAAAA CCTGCACGAA GTGAGAGCACCAGGATACCCGCT
3601v1 (688) ACTGATGCATTAGAAAAGGAA TTGCAAGAGCAAAA CCTGCACGAA GTGAGAGCACCAGGATACCCGCT
3605v1 (688) ACTGATGCATTAGAAAAGGAA TTGCAAGAGCAAAA CCTGCACGAA GTGAGAGCACCAGGATACCCGCT

3611v1	(688)	ACTGATGCATTAGAAAAGGAATT	GCAAGAGCAAAAA	CCTGCACGAA	GTGAGAGCACCGAAGT	ACCCGCT
4501v1	(688)	ACTGATGCATTAGAAAAGGAATT	GCAAGAGCAAAAA	CCTGCACGAA	GTGAGAGCACCGAAGT	ACCCGCT
4503v1	(688)	ACTGATGCATTAGAAAAGGAATT	GCAAGAGCAAAAA	CCTGCACGAA	GTGAGAGCACCGAAGT	ACCCGCT
4504v1	(688)	ACTGATGCATTAGAAAAGGAATT	GCAAGAGCAAAAA	CCTGCACGAA	GTGAGAGCACCGAAGT	ACCCGCT
4506v1	(688)	ACTGATGCATTAGAAAAGGAATT	GCAAGAGCAAAAA	CCTGCACGAA	GTGAGAGCACCGAAGT	ACCCGCT
4509v2	(688)	ACTGATGCATTAGAAAAGGAATT	GCAAGAGCAAAAA	CCTGCACGAA	GTGAGAGCACCGAAGT	ACCCGCT
4517v1	(688)	ACTGATGCATTAGAAAAGGAATT	GCAAGAGCAAAAA	CCTGCACGAA	GTGAGAGCACCGAAGT	ACCCGCT
4523v1	(688)	ACTGATGCATTAGAAAAGGAATT	GCAAGAGCAAAAA	CCTGCACGAA	GTGAGAGCACCGAAGT	ACCCGCT
4536v1	(688)	ACTGATGCATTAGAAAAGGAATT	GCAAGAGCAAAAA	CCTGCACGAA	GTGAGAGCACCGAAGT	ACCCGCT
4544v1	(688)	ACTGATGCATTAGAAAAGGAATT	GCAAGAGCAAAAA	CCTGCACGAA	GTGAGAGCACCGAAGT	ACCCGCT
4544v2	(688)	ACTGATGCATTAGAAAAGGAATT	GCAAGAGCAAAAA	CCTGCACGAA	GTGAGAGCACCGAAGT	ACCCGCT
4565v1	(688)	ACTGATGCATTAGAAAAGGAATT	GCAAGAGCAAAAA	CCTGCACGAA	GTGAGAGCACCGAAGT	ACCCGCT
5503v1	(688)	ACTGATGCATTAGAAAAGGAATT	GCAAGAGCAAAAA	CCTGCACGAA	GTGAGAGCACCGAAGT	ACCCGCT
5545v1	(688)	ACTGATGCATTAGAAAAGGAATT	GCAAGAGCAAAAA	CCTGCACGAA	GTGAGAGCACCGAAGT	ACCCGCT
4504v2	(688)	ATCCTGAGTAGAAAAGGAAGT	GCAACCGTTAAA	CCTGTGAAA	GAGAGATAAT	GTTCCGCT
Mo7	(688)	ACTGATGCATTAGAAAAGGAATT	GCAAGAGCAAAAA	CCTGCACGAA	GTGAGAGCACCGAAGT	ACCCGCT
		771				840
5591v1	(757)	ATTGGAGCAGTCCCACAGC	CACCTGTAGACGGACAA	GCA-----	CAGCAAGAAATTTCTACT	CCCGAT
53nj1	(757)	ATTGGAGCAGTCCCACAGC	CACCTGTAGACGGACAA	GCA-----	CAGCAAGAAATTTCTACT	CCCGAT
2vj2	(757)	ATTGGAGCAGTCCCACAGC	CACCTGTAGACGGACAA	GCA-----	CAGCAAGAAATTTCTACT	CCCGAT
4507v1	(757)	ATTGGAGCAGTCCCACAGC	CACCTGTAGACGGACAA	GCA-----	CAGCAAGAAATTTCTACT	CCCGAT
5585v1	(757)	ATTGGAGCAGTCCCACAGC	CACCTGTAGACGGACAA	GCA-----	CAGCAAGAAATTTCTACT	CCCGAT
8513v1	(757)	ATTGGAGCAGTCCCACAGC	CACCTGTAGACGGACAA	GCA-----	CAGCAAGAAATTTCTACT	CCCGAT
32aj1	(757)	ATTGGAGCAGTCCCACAGC	CACCTGTAGACGGACAA	GCA-----	CAGCAAGAAATTTCTACT	CCCGAT
32aj2	(757)	ATTGGAGCAGTCCCACAGC	CACCTGTAGACGGACAA	GCA-----	CAGCAAGAAATTTCTACT	CCCGAT
4548v1	(757)	ATTGGAGCAGTCCCACAGC	CACCTGTAGACGGACAA	GCA-----	CAGCAAGAAATTTCTACT	CCCGAT
32bj2	(757)	ATTGGAGCAGTCCCACAGC	CACCTGTAGACGGACAA	GCA-----	CAGCAAGAAATTTCTACT	CCCGAT
3616v1	(760)	CATGGCGAAGCTGGTTCTGGA	AGTGGCGATGGTGTGTCCG	TTGTCCCACAAACACCT	GGAAAAGAC	AAC
4526v1	(760)	CATGGCGAAGCTGGTTCTGGA	AGTGGCGATGGTGTGTCCG	TTGTCCCACAAACACCT	GGAAAAGAC	AAC
4537v1	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
1520v1	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
1572v1	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
3538v1	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
3571v1	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
3597v1	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
3600v1	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
3601v1	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
3605v1	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
3611v1	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
4501v1	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
4503v1	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
4504v1	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
4506v1	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
4509v2	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
4517v1	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
4523v1	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
4536v1	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
4544v1	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
4544v2	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
4565v1	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
5503v1	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
5545v1	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
4504v2	(757)	CTTGGAGCAGTCCCACAGC	CACCTGTAGACGGACAA	GCA----	CAGCAAGAAATTTCTACT	CCCGAT
Mo7	(757)	CCAGGTGATG-----	CATCTGGCGTCCAACAA	-----	-----	CCGCCTG
		841				910
5591v1	(821)	CTTCACCTAGTTCCTCGAGTCT	CAATCACCTCAGACTCAAGGT	GCTGAAAA	CCCATCTCCAGAT	---TC
53nj1	(821)	CTTCACCTAGTTCCTCGAGTCT	CAATCACCTCAGACTCAAGGT	GCTGAAAA	CCCATCTCCAGAT	---TC
2vj2	(821)	CTTCACCTAGTTCCTCGAGTCT	CAATCACCTCAGACTCAAGGT	GCTGAAAA	CCCATCTCCAGAT	---TC
4507v1	(821)	CTTCACCTAGTTCCTCGAGTCT	CAATCACCTCAGACTCAAGGT	GCTGAAAA	CCCATCTCCAGAT	---TC
5585v1	(821)	CTTCACCTAGTTCCTCGAGTCT	CAATCACCTCAGACTCAAGGT	GCTGAAAA	CCCATCTCCAGAT	---TC
8513v1	(821)	CTTCACCTAGTTCCTCGAGTCT	CAATCACCTCAGACTCAAGGT	GCTGAAAA	CCCATCTCCAGAT	---TC
32aj1	(821)	CTTCACCTAGTTCCTCGAGTCT	CAATCACCTCAGACTCAAGGT	GCTGAAAA	CCCATCTCCAGAT	---TC
32aj2	(821)	CTTCACCTAGTTCCTCGAGTCT	CAATCACCTCAGACTCAAGGT	GCTGAAAA	CCCATCTCCAGAT	---TC
4548v1	(821)	CTTCACCTAGTTCCTCGAGTCT	CAATCACCTCAGACTCAAGGT	GCTGAAAA	CCCATCTCCAGAT	---TC
32bj2	(821)	CTTCACCTAGTTCCTCGAGTCT	CAATCACCTCAGACTCAAGGT	GCTGAAAA	CCCATCTCCAGAT	---TC
3616v1	(830)	CTCCAGCTACCTACAGTCAACCG	AGCTGTG-CAAAC	CAATCCAAAG	TGACCAACCA	----GC
4526v1	(830)	CTCCAGCTACCTACAGTCAACCG	AGCTGTG-CAAAC	CAATCCAAAG	TGACCAACCA	----GC
4537v1	(791)	CATCAGGAACATCCCG	-----	CAAGGACTG	-----	CTCCGACTACACCCAGCCCATCTCCAGAT

		981	1025
5591v1	(949)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
53nj1	(949)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
2vj2	(949)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
4507v1	(949)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
5585v1	(949)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
8513v1	(949)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
32aj1	(949)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
32aj2	(949)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
4548v1	(949)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
32bj2	(949)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
3616v1	(957)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
4526v1	(961)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
4537v1	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
1520v1	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
1572v1	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
3538v1	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
3571v1	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
3597v1	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
3600v1	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
3601v1	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
3605v1	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
3611v1	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
4501v1	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
4503v1	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
4504v1	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
4506v1	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
4509v2	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
4517v1	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
4523v1	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
4536v1	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
4544v1	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
4544v2	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
4565v1	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
5503v1	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
5545v1	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
4504v2	(949)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA
Mo7	(916)	TTGACTGTGGCT	ACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGCATTTTAA

Figura 7. Alineamiento múltiple de las secuencias del gen *msa-1* de *Babesia bovis*. Se muestra el alineamiento de las secuencias obtenidas de las muestras analizadas del rancho el Verdineño, Nayarit y del rancho La Joya, Jalisco. En los recuadros de color azul se muestran las bases que son conservadas, en los recuadros de color amarillo las bases que son idénticas y en los recuadros de letra negra con fondo blanco las bases que no comparten ninguna similitud, los guiones significan huecos. La identidad fue establecida en un 51%.

Alineamiento múltiple de los genotipos.

A partir del alineamiento nucleotídico del gen *msa-1*, se realizó un agrupamiento basado en el 100% de identidad entre las secuencias de un mismo grupo. Se estableció que las 36 secuencias formaban 9 grupos lo que dio como resultado la identificación de 9 genotipos diferentes, y un menor número de secuencias lo que facilitó su análisis. En la figura 8 se muestra el alineamiento de los diferentes genotipos encontrados. Los análisis de las secuencias muestran una identidad consenso del 50.5% e indican que dentro del rancho del Verdineño se encuentran establecidos ocho de los nueve genotipos sugeridos aquí (Genotipo 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 y 9). Dentro del rancho la Joya en Jalisco, se encuentran 3 genotipos (Genotipos 2, 3 y 4). En el cuadro 3 se muestra la manera en como quedaron integradas las muestras analizadas de acuerdo al genotipo, muestreo y rancho de proveniencia.

Rancho	Genotipo	Muestreo	# Muestra	
El Verdineño, Nayarit	1	1	5591	
	2	1	4507	
			5585	
	3	1	8513	
			4548	
	5	1	3616	
	6	1	4526	
	7	1	4537	
	8	1	1520	4501
			1572	4503
			3538	4504
			3571	4506
			3597	4517
3600			4523	
3601			4536	
3605			4544	
3611			4565	
5503			5545	
2		4509		
		4544		
9	2	4504		
La Joya, Jalisco	2	1	53N	
		2	2V	
	3	1	32A	
		2	32A	
	4	2	32B	

Cuadro 3. Distribución de genotipos. Se muestra la integración de los 9 genotipos encontrados de acuerdo al rancho al que pertenecen, el número de muestreo y número de identificación de cada una de las muestras analizadas.

1 60

Genotipo 1 (1) ATGGCCACGTTTGCTCTTTTCATTCAGCCTTGTGCTGTGTTTCGGCCGTTACGTCGTC

Genotipo 2 (1) ATGGCTACGTTTGCTCTTTTCATTCAGCCTTGTGCTGTGTTTCGGCCGTTACGTCGTC

Genotipo 3 (1) ATGGCTACGTTTGCTCTTTTCATTCAGCCTTGTGCTGTGTTTCGGCCGTTACGTCGTC

Genotipo 4 (1) ATGGCTACGTTTGCTCTTTTCATTCAGCCTTGTGCTGTGTTTCGGCCGTTACGTCGTC

Genotipo 9 (1) ATGGCTACGTTTGCTCTTTTCATTCAGCCTTGTGCTGTGTTTCGGCCGTTACGTCGTC

Genotipo 7 (1) ATGGCTACGTTTGCTCTTTTCATTCAGCCTTGTGCTGTGTTTCGGCAATTACATCGGCG

Genotipo 8 (1) ATGGCTACGTTTGCTCTTTTCATTCAGCCTTGTGCTGTGTTTCGGCAATTACATCGGCG

Genotipo 5 (1) ATGGTTGCGTTTGCTCTTTTCATTCAGCCTTGTGCTGTGTTTCGGCCATTGCAATCTTC

Genotipo 6 (1) ATGGTTGCGTTTGCTCTTTTCATTCAGCCTTGTGCTGTGTTTCGGCCATTGCAATCTTC

61 120

Genotipo 1 (61) GAACCAAGGTCAGCTGAA-----AACGTTATTAGAGTTATCGATTCTTCATCC

Genotipo 2 (61) GAACCAAGGTCAGCTGAA-----AACGTTATTAGAGTTATCGATTCTTCATCC

Genotipo 3 (61) GAACCAAGGTCAGCTGAA-----AACGTTATTAGAGTTATCGATTCTTCATCC

Genotipo 4 (61) GAACCAAGGTCAGCTGAA-----AACGTTATTAGAGTTATCGATTCTTCATCC

Genotipo 9 (61) GAACCAAGGTCAGCTGAA-----AACGTTATTAGAGTTATCGATTCTTCATCC

Genotipo 7 (61) GTGAAGAAATGACACAA-----TCGATGTTAGAAATGCCGATACTTCAATC

Genotipo 8 (61) GTGAAGAAATGACACAA-----TCGATGTTAGAAATGCCGATACTTCAATC

Genotipo 5 (61) GAGCAAGAGGTGCTCAAAGCCGGCTCCATCCTTGTAGAGTTGTTGATCTTCATCA

Genotipo 6 (61) GAGCAAGAGGTGCTCAAAGCCGGCTCCATCCTTGTAGAGTTGTTGATCTTCATCA

121 180

Genotipo 1 (109) GATCTCCCCAAGGATATCTTACGATGATATGGCTAAGTTCTACGGTGCCGTTGAAGC

Genotipo 2 (109) GATCTCCCCAAGGATATCTTACGATGATATGGCTAAGTTCTACGGTGCCGTTGAAGC

Genotipo 3 (109) GATCTCCCCAAGGATATCTTACGATGATATGGCTAAGTTCTACGGTGCCGTTGAAGC

Genotipo 4 (109) GATCTCCCCAAGGATATCTTACGATGATATGGCTAAGTTCTACGGTGCCGTTGAAGC

Genotipo 9 (109) GATCTCCCCAAGGATATCTTACGATGATATGGCTAAGTTCTACGGTGCCGTTGAAGC

Genotipo 7 (109) CTCCTCCCCAAGGATCATCTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGAAGT

Genotipo 8 (109) CTCCTCCCCAAGGATCATCTACGATGACATGCTAAGTTCTACGGTGCTGTTGAAGT

Genotipo 5 (121) CCTCTCCCCAAGGATCTCTTACGATGATATGAAATAATTCTATGGTGCCGTTGAAGT

Genotipo 6 (121) CCTCTCCCCAAGGATCTCTTACGATGATATGAAATAATTCTATGGTGCCGTTGAAGT

181 240

Genotipo 1 (169) TTCGATAAGACTAATTGTATGCTGTTATTCTGCTAACTTCAAGAAACGCGGGCTAGCT

Genotipo 2 (169) TTCGATAAGACTAATTGTATGCTGTTATTCTGCTAACTTCAAGAAACGCGGGCTAGCT

Genotipo 3 (169) TTCGATAAGACTAATTGTATGCTGTTATTCTGCTAACTTCAAGAAACGCGGGCTAGCT

Genotipo 4 (169) TTCGATAAGACTAATTGTATGCTGTTATTCTGCTAACTTCAAGAAACGCGGGCTAGCT

Genotipo 9 (169) TTCGATAAGACTAATTGTATGCGGTTATTCTGCTAACTTCAAGAAACGCGGGCTAGCT

Genotipo 7 (169) TTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTTTCTGCTAACTTCAAGAAACGCGGCTAAATGGAT

Genotipo 8 (169) TTCGACCAGACCAATTGTATAGCGTTCTTTCTGCTAACTTCAAGAAACGCGGCTAAATGGAT

Genotipo 5 (181) TTCGACAAGGGTAGATTGTATGCTGCGATTCTGCTCAACTTCAAGGCCGTCAGAAATGGAG

Genotipo 6 (181) TTCGACAAGGGTAGATTGTATGCTGCGATTCTGCTCAACTTCAAGGCCGTCAGAAATGGAG

241 300

Genotipo 1 (229) GATGAAAAGGTTAAAGAAGCTTTACCAGTCTATACAAAGTCAGTGCATCGATAAAGGTT

Genotipo 2 (229) GATGAAAAGGTTAAAGAAGCTTTACCAGTCTATACAAAGTCAGTGCATCGATAAAGGTT

Genotipo 3 (229) GATGAAAAGGTTAAAGAAGCTTTACCAGTCTATACAAAGTCAGTGCATCGATAAAGGTT

Genotipo 4 (229) GATGAAAAGGTTAAAGAAGCTTTACCAGTCTATACAAAGTCAGTGCATCGATAAAGGTT

Genotipo 9 (229) GATGAAAAGGTTAAAGAAGCTTTACCAGTCTATACAAAGTCAGTGCATCGATAAAGGTT

Genotipo 7 (229) GATCAGAAGGTTAAAGACACATTCAAAATTTATACAAAGTCACGTCATTGATAAAGAAC

Genotipo 8 (229) GATCAGAAGGTTAAAGACACATTCAAAATTTATACAAAGTCACGTCATTGATAAAGAAC

Genotipo 5 (241) GATCAGCAGGTCGAGAAATGTTTTACCTATAATTTACAAAGTTAGGGATATGATAAAGAAG

Genotipo 6 (241) GATCAGCAGGTCGAGAAATGTTTTACCTATAATTTACAAAGTTAGGGATATGATAAAGAAG

301 360

Genotipo 1 (289) AACCCAATGATTAATTCCGACCTTTTAAAGAAAGAGGCTGTAAGCAGTTTTTCAGGCAAG

Genotipo 2 (289) AACCCAATGATTAATTCCGACCTTTTAAAGAAAGAGGCTGTAAGCAGTTTTTCAGGCAAG

Genotipo 3 (289) AACCCAATGATTAATTCCGACCTTTTAAAGAAAGAGGCTGTAAGCAGTTTTTCAGGCAAG

Genotipo 4 (289) AACCCAATGATTAATTCCGACCTTTTAAAGAAAGAGGCTGTAAGCAGTTTTTCAGGCAAG

Genotipo 9 (289) AACCCAATGATTAATTCCGGCCTTTTAAAGAAAGAGGCTGTAAGCAGTTTTTCAGGCAAG

Genotipo 7 (289) AATCCTATGATTCGCCCTGATCTATTTAATGCAACTATTGTTAGCGGTTTTTCAACTAAG

Genotipo 8 (289) AATCCTATGATTCGCCCTGATCTATTTAATGCAACTATTGTTAGCGGTTTTTCAACTAAG

Genotipo 5 (301) AACCCATATTATTGCTCTGAACTATTTAAAGAAACTGCTAAGGACAGTTTTTCAAGTAGC

Genotipo 6 (301) AACCCATATTATTGCTCTGAACTATTTAAAGAAACTGCTAAGGACAGTTTTTCAAGTAGC

		361		420
Genotipo 1	(349)	ACAGACAAGGATAAATTCAATGCTATATTTGAA	TCATTAAAGCAATGGTCCTCAGAATT	
Genotipo 2	(349)	ACAGACAAGGATAAATTCAATGCTATATTTGAA	TCATTAAAGCAATGGTCCTCAGAATT	
Genotipo 3	(349)	ACAGACAAGGATAAATTCAATGCTATATTTGAA	TCATTAAAGCAATGGTCCTCAGAATT	
Genotipo 4	(349)	ACAGACAAGGATAAATTCAATGCTATATTTGAA	TCATTAAAGCAATGGTCCTCAGAATT	
Genotipo 9	(349)	ACAGACAAGGATAAATTCAATGCTATATTTGAA	TCATTAAAGCAATGGTCCTCAGAATT	
Genotipo 7	(349)	AATGACGAGGAAAATTCAATGCTATATTTGAT	TCATTAAAGGAATGTACTATAGAGCT	
Genotipo 8	(349)	AATGACGAGGAAAATTCAATGCTATATTTGAT	TCATTAAAGGAATGTACTATAGAGCT	
Genotipo 5	(361)	AGTGACGAGGTTAAATTTAAAGCTATATTTGAT	CTCGTTGTGCTATGCTTTAAAGAATT	
Genotipo 6	(361)	AGTGACGAGGTTAAATTTAAAGCTATATTTGAT	CTCGTTGTGCTATGCTTTAAAGAATT	
		421		480
Genotipo 1	(409)	AACCACATGCAAAACATTTTGTAAAGGACTAGACT	GGAGTTCTGAGATAACCGAAGGTGAT	
Genotipo 2	(409)	AACCACATGCAAAACATTTTGTAAAGGACTAGACT	GGAGTTCTGAGATAACCGAAGGTGAT	
Genotipo 3	(409)	AACCACATGCAAAACATTTTGTAAAGGACTAGACT	GGAGTTCTGAGATAACCGAAGGTGAT	
Genotipo 4	(409)	AACCACATGCAAAACATTTTGTAAAGGACTAGACT	GGAGTTCTGAGATAACCGAAGGTGAT	
Genotipo 9	(409)	AACCACATGCAAAACATTTTGTAAAGGACTAGACT	GGAGTTCTGAGATAACCGAAGGTGAT	
Genotipo 7	(409)	CAACACATGGACAAAATATTGTAAAGTCACTAAGG	TGGAATACTGATATTGTTGAGGAAGAT	
Genotipo 8	(409)	CAACACATGGACAAAATATTGTAAAGTCACTAAGG	TGGAATACTGATATTGTTGAGGAAGAT	
Genotipo 5	(421)	TACCACATGCAAGCAAAAATTGGAATCATTACAG	TATGTTGAGGAAGAT	
Genotipo 6	(421)	TACCACATGCAAGCAAAAATTGGAATCATTACAG	TATGTTGAGGAAGAT	
		481		540
Genotipo 1	(469)	CGTAAAAGGCAGAGGAGTATTTCAAGAAGCATGT	CTACAAGGAGGAATACAAGGTTAAT	
Genotipo 2	(469)	CGTAAAAGGCAGAGGAGTATTTCAAGAAGCATGT	CTACAAGGAGGAATACAAGGTTAAT	
Genotipo 3	(469)	CGTAAAAGGCAGAGGAGTATTTCAAGAAGCATGT	CTACAAGGAGGAATACAAGGTTAAT	
Genotipo 4	(469)	CGTAAAAGGCAGAGGAGTATTTCAAGAAGCATGT	CTACAAGGAGGAATACAAGGTTAAT	
Genotipo 9	(469)	CGTAAAAGGCAGAGGAGTATTTCAAGAAGCATGT	CTACAAGGAGGAATACAAGGTTAAT	
Genotipo 7	(469)	CGTGAAGAGGCAGTTGAATATTTCAAGAAGCATGT	TATACGGGGAACACGTTGTTGAC	
Genotipo 8	(469)	CGTGAAGAGGCAGTTGAATATTTCAAGAAGCATGT	TATACGGGGAACACGTTGTTGAC	
Genotipo 5	(481)	CGTAAACAAGGCAGAGGAATATTTAAACAGCAGT	TATAAGACCAGGAAGGTTAAT	
Genotipo 6	(481)	CGTAAACAAGGCAGAGGAATATTTAAACAGCAGT	TATAAGACCAGGAAGGTTAAT	
		541		600
Genotipo 1	(529)	GTCCGAAGGTATGGCTGCTGTGTGCAAAAGGGTT	TTTTGGGTGATGGATCAGACTTTAATAAAA	
Genotipo 2	(529)	GTCCGAAGGTATGGCTGCTGTGTGCAAAAGGGTT	TTTTGGGTGATGGATCAGACTTTAATAAAA	
Genotipo 3	(529)	GTCCGAAGGTATGGCTGCTGTGTGCAAAAGGGTT	TTTTGGGTGATGGATCAGACTTTAATAAAA	
Genotipo 4	(529)	GTCCGAAGGTATGGCTGCTGTGTGCAAAAGGGTT	TTTTGGGTGATGGATCAGACTTTAATAAAA	
Genotipo 9	(529)	GTCCGAAGGTATGGCTGCTGTGTGCAAAAGGGTT	TTTTGGGTGATGGATCAGACTTTAATAAAA	
Genotipo 7	(529)	GTCAACGGTATGGCTGGTGTGCAAGGAGTTTTT	AAGCCCGCTCTGATTTCTACAAA	
Genotipo 8	(529)	GTCAACGGTATGGCTGGTGTGCAAGGAGTTTTT	AAGCCCGCTCTGATTTCTACAAA	
Genotipo 5	(541)	GTAGATAACATGGCTACTGTAAGCAAAAGGCT	TTTTGAGTGATGTTCATACTTTACAAA	
Genotipo 6	(541)	GTAGATAACATGGCTACTGTAAGCAAAAGGCT	TTTTGAGTGATGTTCATACTTTACAAA	
		601		660
Genotipo 1	(589)	CTTGTGTAACGTTTGATGATTTTGAAGAGGTAG	ACATTATGGACTTGCAGAGAATTAAT	
Genotipo 2	(589)	CTTGTGTAACGTTTGATGATTTTGAAGAGGTAG	ACATTATGGACTTGCAGAGAATTAAT	
Genotipo 3	(589)	CTTGTGTAACGTTTGATGATTTTGAAGAGGTAG	ACATTATGGACTTGCAGAGAATTAAT	
Genotipo 4	(589)	CTTGTGTAACGTTTGATGATTTTGAAGAGGTAG	ACATTATGGACTTGCAGAGAATTAAT	
Genotipo 9	(589)	CTTGTGTAACGTTTGATGATTTTGAAGAGGTAG	ACATTATGGACTTGCAGAGAATTAAT	
Genotipo 7	(589)	CTTGTGAGTCTTTTGATGCGTTTGCACATGCTA	AGGTGCACCTCAAGAGGAAATTTT	
Genotipo 8	(589)	CTTGTGAGTCTTTTGATGCGTTTGCACATGCTA	AGGTGCACCTCAAGAGGAAATTTT	
Genotipo 5	(601)	CTTGCTGTATATTTTGATGATTTTGGAAAGCTA	AACATGAACCAAGGATGGTAATTTT	
Genotipo 6	(601)	CTTGCTGTATATTTTGATGATTTTGGAAAGCTA	AACATGAACCAAGGATGGTAATTTT	
		661		720
Genotipo 1	(649)	GTTGAACCTAACCCGTATCTACCGCTTCCTGA	AAGGATTAATCGCTGAAGTAGAAAAGGAA	
Genotipo 2	(649)	GTTGAACCTAACCCGTATCTACCGCTTCCTGA	AAGGATTAATCGCTGAAGTAGAAAAGGAA	
Genotipo 3	(649)	GTTGAACCTAACCCGTATCTACCGCTTCCTGA	AAGGATTAATCGCTGAAGTAGAAAAGGAA	
Genotipo 4	(649)	GTTGAACCTAACCCGTATCTACCGCTTCCTGA	AAGGATTAATCGCTGAAGTAGAAAAGGAA	
Genotipo 9	(649)	GTTGAACCTAACCCGTATCTACCGCTTCCTGA	AAGGATTAATCGCTGAAGTAGAAAAGGAA	
Genotipo 7	(649)	GTTAAACCTGAACTGACATCGTCTCCCTAAAG	GATGTTACTGATGCATAGAAAAGGAA	
Genotipo 8	(649)	GTTAAACCTGAACTGACATCGTCTCCCTAAAG	GATGTTACTGATGCATAGAAAAGGAA	
Genotipo 5	(661)	AATTACACCTGAGAAAACAAATCGTACCCTC	ACGAACTCATGACTGCTGTAGAAA---TCA	
Genotipo 6	(661)	AATTACACCTGAGAAAACAAATCGTACCCTC	ACGAACTCATGACTGCTGTAGAAA---TCA	

		721		780
Genotipo 1	(709)	GTAGCAACCGTTAAA	-CCTGTAGAAAAGAGAGAATAATCGTTCACCCGGTACTGGAGCAGT	
Genotipo 2	(709)	GTAGCAACCGTTAAA	-CCTGTAGAAAAGAGAGAATAATCGTTCACCCGGTACTGGAGCAGT	
Genotipo 3	(709)	GTAGCAACCGTTAAA	-CCTGTAGAAAAGAGAGAATAATCGTTCACCCGGTACTGGAGCAGT	
Genotipo 4	(709)	GTAGCAACCGTTAAA	-CCTGTAGAAAAGAGAGAATAATCGTTCACCCGGTACTGGAGCAGT	
Genotipo 9	(709)	GTAGCAACCGTTAAA	-CCTGTAGAAAAGAGAGAATAATGGTTACCCGGTCCCTGGAGCAGT	
Genotipo 7	(709)	-TTGCAAGAGCAAAA	CCTGCA CGAAGT GAGAGCA CCGAAGT ACCCGCTCCAGGTG----	
Genotipo 8	(709)	-TTGCAAGAGCAAAA	CCTGCA CGAAGT GAGAGCA CCGAAGT ACCCGCTCCAGGTG----	
Genotipo 5	(718)	----CAAGAGGAA	----CCTG GCCGAACT GAGAA TGGT GATT CACGCC TCAAGGCGAAG-	
Genotipo 6	(718)	----CAAGAGGAA	----CCTG GCCGAACT GAGAA TGGT GATT CACGCC TCAAGGCGAAG-	
		781		840
Genotipo 1	(768)	CCCACAGCCACCTGTAGACGGACAAGCACAGCAAGAAATTTCTACTCCCCCATCTTCACC		
Genotipo 2	(768)	CCCACAGCCACCTGTAGACGGACAAGCACAGCAAGAAATTTCTACTCCCCCATCTTCACC		
Genotipo 3	(768)	CCCACAGCCACCTGTAGACGGACAAGCACAGCAAGAAATTTCTACTCCCCCATCTTCACC		
Genotipo 4	(768)	CCCACAGCCACCTGTAGACGGACAAGCACAGCAAGAAATTTCTACTCCCCCATCTTCACC		
Genotipo 9	(768)	CCCACAGCCACCTGTAGACGGACAAGCACAGCAAGAAATTTCTACTCCCCCATCTTCACC		
Genotipo 7	(764)	----ATGCACTCTGGCCTCAACAA	-----CGCCTGCATCAGGAACA--	
Genotipo 8	(764)	----ATGCACTCTGGCCTCAACAA	-----CGCCTGCATCAGGAACA--	
Genotipo 5	(770)	----CTGGTTCTGGAAGTGGCGATGGTGTGCCTTGTCCACAAAACCTGGAAAAGA		
Genotipo 6	(770)	----CTGGTTCTGGAAGTGGCGATGGTGTGCCTTGTCCACAAAACCTGGAAAAGA		
		841		900
Genotipo 1	(828)	TAGTTCCTTGAGTCTCAATCACCTCAGACTCAAGGTGCTGAAAACCCATCTCCAGATTC		
Genotipo 2	(828)	TAGTTCCTTGAGTCTCAATCACCTCAGACTCAAGGTGCTGAAAACCCATCTCCAGATTC		
Genotipo 3	(828)	TAGTTCCTTGAGTCTCAATCACCTCAGACTCAAGGTGCTGAAAACCCATCTCCAGATTC		
Genotipo 4	(828)	TAGTTCCTTGAGTCTCAATCACCTCAGACTCAAGGTGCTGAAAACCCATCTCCAGATTC		
Genotipo 9	(828)	TAGTTCCTTGAGTCTCAATCACCTCAGACTCAAGGTGCTGAAAACCCATCTCCAGATTC		
Genotipo 7	(802)	---TCCCCG-----CAAGGACCTG---CTCCGACTTACACCCAGCCCATCTCCAGAGTC		
Genotipo 8	(802)	---TCCCCG-----CAAGGACCTG---CTCCGACTTACACCCAGCCCATCTCCAGAGTC		
Genotipo 5	(825)	CCAACCTCCAGCTACCTCACCTAGTCCAACTAGTGTGCCAAACCCATCCCAAGCTGA		
Genotipo 6	(825)	CCAACCTCCAGCTACCTCACCTAGTCCAACTAGTGTGCCAAACCCATCCCAAGCTGA		
		901		960
Genotipo 1	(888)	CTCAC-----A-----AGGAAACCTCAATGGACAACGTG-----AACCAAGCCAA		
Genotipo 2	(888)	CTCAC-----A-----AGGAAACCTCAATGGACAACGTG-----AACCAAGCCAA		
Genotipo 3	(888)	CTCAC-----A-----AGGAAACCTCAATGGACAACGTG-----AACCAAGCCAA		
Genotipo 4	(888)	CTCAC-----A-----AGGAAACCTCAATGGACAACGTG-----AACCAAGCCAA		
Genotipo 9	(888)	CTCAC-----A-----AGGAAACCTCAATGGACAACGTG-----AACCAAGCCAA		
Genotipo 7	(849)	CTCA-----GGAAACCTCAAGGACAACAGGTACAACCAAAGCCAGCCGG		
Genotipo 8	(849)	CTCA-----GGAAACCTCAAGGACAACAGGTACAACCAAAGCCAGCCGG		
Genotipo 5	(885)	CCAACCAA---GCCTGAAGTAAACCTCAATGGACAACAGGTTCACCCAAAGCCTGCC--		
Genotipo 6	(885)	CCAACCAAAGCCTGAAGTAAACCTCAATGGACAACAGGTTCACCCAAAGCCTGCC--		
		961		1020
Genotipo 1	(927)	ATCTTCATTACCTATGGCGGATTGACTGTGGCTACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGC		
Genotipo 2	(927)	ATCTTCATTACCTATGGCGGATTGACTGTGGCTACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGC		
Genotipo 3	(927)	ATCTTCATTACCTATGGCGGATTGACTGTGGCTACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGC		
Genotipo 4	(927)	ATCTTCATTACCTATGGCGGATTGACTGTGGCTACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGC		
Genotipo 9	(927)	ATCTTCATTACCTATGGCGGATTGACTGTGGCTACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGC		
Genotipo 7	(894)	ATCTTCATTACCTATGGCGGATTGACTGTGGCTACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGC		
Genotipo 8	(894)	ATCTTCATTACCTATGGCGGATTGACTGTGGCTACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGC		
Genotipo 5	(939)	----TCTTTCACCTTGGCGGATTGACTGTGGCTACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGC		
Genotipo 6	(943)	----TCTTTCACCTTGGCGGATTGACTGTGGCTACTCTCTGCTACTTCGTTCTCTCTGC		

		1021
Genotipo 1	(987)	ATTTTAA
Genotipo 2	(987)	ATTTTAA
Genotipo 3	(987)	ATTTTAA
Genotipo 4	(987)	ATTTTAA
Genotipo 9	(987)	ATTTTAA
Genotipo 7	(954)	ATTTTAA
Genotipo 8	(954)	ATTTTAA
Genotipo 5	(995)	ATTTTAA
Genotipo 6	(999)	ATTTTAA

Figura 8. Alineamiento nucleotídico de los genotipos identificados con las secuencias del gen *msa-1*. En los recuadros de color azul se muestran las bases que son conservadas, en los recuadros de color amarillo las bases que son idénticas y en los recuadros de letra negra con fondo blanco las bases que no son similares, los guiones significan huecos. El porcentaje de identidad determinado es del 50.5%.

Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de MSA-1 de *Babesia bovis*.

El alineamiento múltiple de proteínas predichas, se realizó a partir de la secuencias de los 9 genotipos de *msa-1*. El alineamiento mostró una identidad consenso de 29.7%. Existen 8 secuencias diferentes de MSA-1, ya que los genotipos 3 y 4 a pesar de su diferencia en secuencias nucleotídicas comparten identidad al 100% a nivel de proteína predicha. Cabe mencionar que ambos genotipos se encuentran localizados en el rancho la Joya, de Jalisco. Las proteínas muestran longitudes variables debido a deleciones y/o inserciones, los genotipos 1, 2, 3, 4 y 9 presentan 331 aa, los genotipos 7 y 8 presentan 320 aa y los genotipos 5 y 6 presentan 333 aa y 335 aa respectivamente. Los análisis correspondientes se realizaron con el programa VECTOR NTI ADVANCE 10™ (Invitrogen) (Figura 9).

		1		60
Genotipo 1	(1)	MATFALFISALCCVSAVTSSEP	----	RSAENVIRVIDSSSDLPEGYLYDDMAKFGAVES
Genotipo 2	(1)	MATFALFISALCCVSAVTSSEP	----	RSAENVIRVIDSSSDLPEGYLYDDMAKFGAVES
Genotipo 3	(1)	MATFALFISALCCVSAVTSSEP	----	RSAENVIRVIDSSSDLPEGYLYDDMAKFGAVES
Genotipo 4	(1)	MATFALFISALCCVSAVTSSEP	----	RSAENVIRVIDSSSDLPEGYLYDDMAKFGAVES
Genotipo 9	(1)	MATFALFISALCCVSAVTSSEP	----	RSAENVIRVIDSSSDLPEGYLYDDMAKFGAVES
Genotipo 5	(1)	MVAFFVFISALCCVSAIASSE	QEVAAQQPAPS	FVRVVDTSPLPEGSLYDDMNKFGAVES
Genotipo 6	(1)	MVAFFVFISALCCVSAIASSE	QEVAAQQSAPS	FVRVVDTSPLPEGSLYDDMNKFGAVES
Genotipo 7	(1)	MATFALFISALCCVLAITSAGE	----	ELTQSDVNRNADTSIVLPEGSFYDDMSKFGAVGS
Genotipo 8	(1)	MATFALFISALCCVLAITSAGE	----	ELTQSDVNRNADTSIVLPEGSFYDDMSKFGAVGS
Mo7	(1)	MATFALFISALCCVLAITSAGE	----	ELTQSDVNRNADTSIVLPEGSFYDDMSKFGAVGS
		61		120
Genotipo 1	(57)	FDKTKLYAVIAANFRNGGLADE	RVKFAFTSLYKVSASIKVNP	MINSDLFKEEAVSSFSGK
Genotipo 2	(57)	FDKTKLYAVIAANFRNGGLADE	RVKFAFTSLYKVSASIKVNP	MINSDLFKEEAVSSFSGK
Genotipo 3	(57)	FDKTKLYAVIAANFRNGGLADE	RVKFAFTSLYKVSASIKVNP	MINSDLFKEEAVSSFSGK
Genotipo 4	(57)	FDKTKLYAVIAANFRNGGLADE	RVKFAFTSLYKVSASIKVNP	MINSDLFKEEAVSSFSGK
Genotipo 9	(57)	FDKTKLYAVIAANFRNGGLADE	RVKFAFTSLYKVSASIKVNP	MINSDLFKEEAVSSFSGK
Genotipo 5	(61)	FDKGRLYGAISANFKAVRME	DQQVENVFTYTYKVRDM	IKKNPTIAPFLFKETA
Genotipo 6	(61)	FDKGRLYGVI SANFKAVRME	DQQVENVFTYTYKVRDM	IKKNPTIAPFLFKETA
Genotipo 7	(57)	FDQTKLYSVLSANFKAAKMD	DQKVKDTFKNLYKVNAL	IKNNPMIRPDLFNATIVSGFSTK
Genotipo 8	(57)	FDQTKLYSVLSANFKAAKMD	DQKVKDTFKNLYKVNAL	IKNNPMIRPDLFNATIVSGFSTK
Mo7	(57)	FDQTKLYSVLSANFKAAKMD	DQKVKDTFKNLYKVNAL	IKNNPMIRPDLFNATIVSGFSTK
		121		180
Genotipo 1	(117)	TDKDKFNNAIFESIKPMVLR	INHMOTFLKGLDWSSEITE	GDRKKAEEYFKKHVYKEEYKVN
Genotipo 2	(117)	TDKDKFNNAIFESIKPMVLR	INHMOTFLKGLDWSSEITE	GDRKKAEEYFKKHVYKEEYKVN
Genotipo 3	(117)	TDKDKFNNAIFESIKPMVLR	INHMOTFLKGLDWSSEITE	GDRKKAEEYFKKHVYKEEYKVN
Genotipo 4	(117)	TDKDKFNNAIFESIKPMVLR	INHMOTFLKGLDWSSEITE	GDRKKAEEYFKKHVYKEEYKVN
Genotipo 9	(117)	TDKDKFNNAIFESIKPMVLR	INHMOTFLKGLDWSSEITE	GDRKKAEEYFKKHVYKEEYKVN
Genotipo 5	(121)	SDEVKFKAIFDSVSM	LQRIYHMQAKLESLO	QGPQMTQENRNKAEYFKQHVYKTEGSVN
Genotipo 6	(121)	SDEVKFKAIFDSVSM	LQRIYHMQAKLESLO	QGPQMTQENRNKAEYFKQHVYKTEGSVN
Genotipo 7	(117)	NDEEKFNNAIFDSIKGMY	YRAQHM DKYLKSLRWN	TDIIVEEDREKAVEYFKKHVYTGHEVVD
Genotipo 8	(117)	NDEEKFNNAIFDSIKGMY	YRAQHM DKYLKSLRWN	TDIIVEEDREKAVEYFKKHVYTGHEVVD
Mo7	(117)	NDEEKFNNAIFDSIKGMY	YRAQHM DKYLKSLRWN	TDIIVEEDREKAVEYFKKHVYTGHEVVD
		181		240
Genotipo 1	(177)	VEGMAAVCKGFLLDGSDF	NKLVVTFDDFARGRHYGLA	ENYVEENPDLTLP EGLIAEVEKE
Genotipo 2	(177)	VEGMAAVCKGFLLDGSDF	NKLVVTFDDFARGRHYGLA	ENYVEENPDLTLP EGLIAEVEKE
Genotipo 3	(177)	VEGMAAVCKGFLLDGSDF	NKLVVTFDDFARGRHYGLA	ENYVEENPDLTLP EGLIAEVEKE
Genotipo 4	(177)	VEGMAAVCKGFLLDGSDF	NKLVVTFDDFARGRHYGLA	ENYVEENPDLTLP EGLIAEVEKE
Genotipo 9	(177)	VEGMAAVCKGFLLDGSDF	NKLVVTFDDFARGRHYGLA	ENYVEENPDLTLP EGLIAEVEKE
Genotipo 5	(181)	VDNMATVCKGFLLDVS	YFYKLAVYFDDFWKAKHEA	GMGNFITPEETIVPPQELITAVESQ
Genotipo 6	(181)	VDNMATVCKGFLLDVS	YFYKLAVYFDDFWKAKHEA	GMGNFITPEETIVPPQELITAVESQ
Genotipo 7	(177)	VNGMAGVCKEFLSPAS	DFYKLVESFDAFAHAKVHA	QVGNFVKP GTDIAPPKDVTDAL EKE
Genotipo 8	(177)	VNGMAGVCKEFLSPAS	DFYKLVESFDAFAHAKVHA	QVGNFVKP GTDIAPPKDVTDAL EKE
Mo7	(177)	VNGMAGVCKEFLSPAS	DFYKLVESFDAFAHAKVHA	QVGNFVKP GTDIAPPKDVTDAL EKE
		241		300
Genotipo 1	(237)	VATVKPVERENNRSPGT	GAVPQPVPDGOAQQE	ISTPPSSPSSPESQSPQTGAENPS
Genotipo 2	(237)	VATVKPVERENNRSPGT	GAVPQPVPDGOAQQE	ISTPPSSPSSPESQSPQTGAENPS
Genotipo 3	(237)	VATVKPVERENNRSPGT	GAVPQPVPDGOAQQE	ISTPPSSPSSPESQSPQTGAENPS
Genotipo 4	(237)	VATVKPVERENNRSPGT	GAVPQPVPDGOAQQE	ISTPPSSPSSPESQSPQTGAENPS
Genotipo 9	(237)	VATVKPVERENNRSPGT	GAVPQPVPDGOAQQE	ISTPPSSPSSPESQSPQTGAENPS
Genotipo 5	(241)	E---EFGRTENGDSRPQ	GEAGSG--SGDGVSVV	PQTPGKDQPPATISPTVQPVVFNPSQAD
Genotipo 6	(241)	E---EFGRTENGDSRPQ	GEAGSG--SGDGVSVV	PQTPGKDQPPATISPTVQPVVFNPSQAD
Genotipo 7	(237)	LQEQKPARSESTVFPAP	GDASG-----VQQFPASG	TSEQGPAPTTIP---SPS---
Genotipo 8	(237)	LQEQKPARSESTVFPAP	GDASG-----VQQFPASG	TSEQGPAPTTIP---SPS---
Mo7	(237)	LQEQKPARSESTVFPAP	GDASG-----VQQFPASG	TSEQGPAPTTIP---SPS---

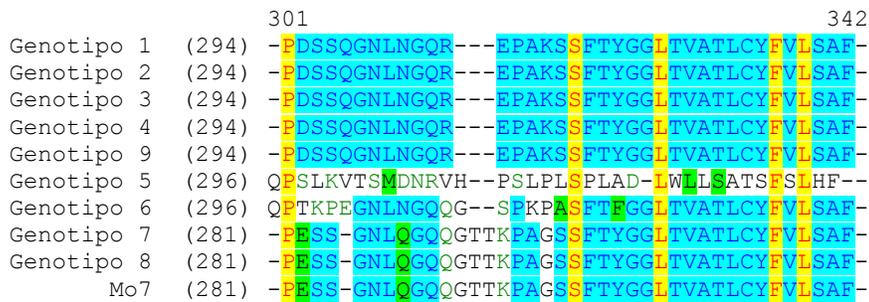


Figura 9. Alineamiento múltiple de proteínas predichas del gen *msa-1*. En los recuadros de color azul se muestran los bases que son conservadas, en los recuadros de color amarillo las bases que son idénticas, los recuadros de letra negra con fondo blanco muestran las bases que no son similares y las letras verdes con fondo blanco son bases débilmente similares, los recuadros verdes por su parte muestran las bases similares, los guiones significan huecos. La identidad establecida fue de un 31.1%.

Análisis filogenético

Para el establecimiento de las relaciones filogenéticas entre los 2 aislados mexicanos en estudio, se realizó la construcción de árboles filogenéticos para el gen *msa-1* de *Babesia bovis*. Al realizar el análisis con el programa Mega 4, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes métodos empleados (Máxima parsimonia, Mínima evolución, Neighbor Joining, y UPGMA). El valor de remuestreo fue evaluado con el programa de Bootstrap con 1000 réplicas. La figura 8 muestra el análisis filogenético realizado a partir de las secuencias nucleotídicas de los genotipos encontrados. Se fijó un grupo externo con el gen *gp45* de *Babesia bigemina*. En el filograma se puede observar la rama principal de la que se desprenden 2 ramas principales, de una de las ramas se derivan 4 grupos y sólo un grupo se deriva de la segunda rama. Los resultados son estadísticamente consistentes, sólo con una variación del 36% de la replicación del árbol en una de las ramas.

El Grupo I se encuentra formado por los genotipos 1 y 2, Grupo II formado por los genotipos 3 y 4, Grupo III integrado por el genotipo 9, Grupo IV, genotipos 7 y 8 y por último el Grupo V constituido por los genotipos 5 y 6.

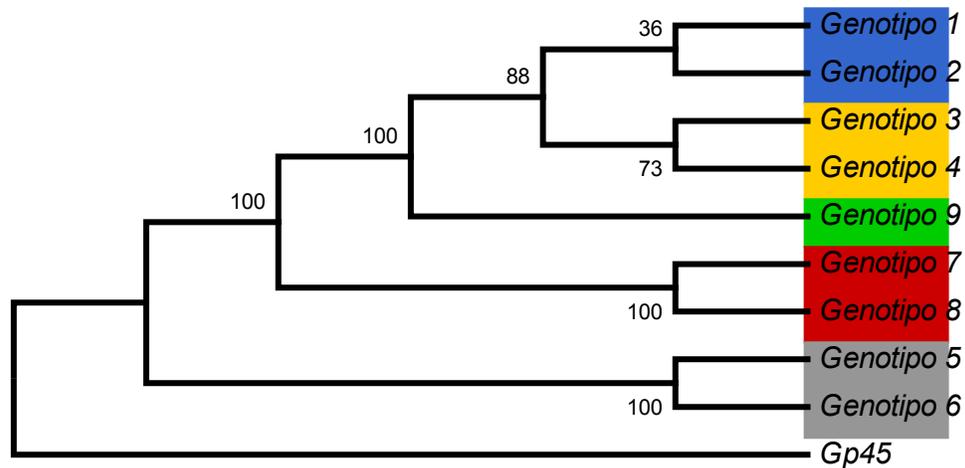


Figura 10. Filogenia del gen *msa-1* con 9 genotipos mexicanos. Filograma construido con el método de Máxima parsimonia. Se fijó la raíz con el gen Gp45 de *B. bigemina*. Los números representan el porcentaje de repeticiones consenso de la muestras en 1000 replicaciones. En los recuadros coloreados pueden observarse las diferentes agrupaciones de los genotipos.

En la figura 11, se muestran las relaciones filogenéticas entre las secuencias de los 9 genotipos previamente descritos con las secuencias de *msa-1* ya reportadas en el GenBank. El análisis se realizó con el programa Mega 4, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes métodos empleados (Máxima parsimonia, Mínima evolución, Neighbor Joining, y UPGMA). El valor de remuestreo fue evaluado con el programa de Bootstrap con 1000 réplicas.

El análisis muestra 5 grandes ramas que se desprenden de la raíz, en la mayoría de los grupos, la delimitación muestra una consistencia alta entre ellos. De la primera rama se desprenden 3 clados, el primero comprende a los aislados mexicanos y australianos a la par con los genotipos 1, 2, 3, 4 y 9, el segundo está constituido por aislados australianos y el tercero comprende únicamente a aislados americanos y a los genotipos 7 y 8. La segunda rama contiene únicamente al aislado mexicano Chiapas 1 separándolo del resto de las agrupaciones. La tercera rama agrupa por segunda ocasión a aislados mexicanos como lo son los genotipos 5 y 6 junto al aislado australiano G36, también se desprende de ésta misma rama el aislado mexicano Veracruz 1. La cuarta rama se encuentra compuesta únicamente a aislados australianos y por último la quinta rama muestra 3 clados, el primero conformado por los aislados argentinos y el segundo y tercero por aislados australianos. Básicamente los aislados americanos, australianos, y argentinos muestran una relación filogenética muy estrecha, sin embargo los aislados australianos podrían sugerirse como grupo origen debido a su cercanía al grupo externo.

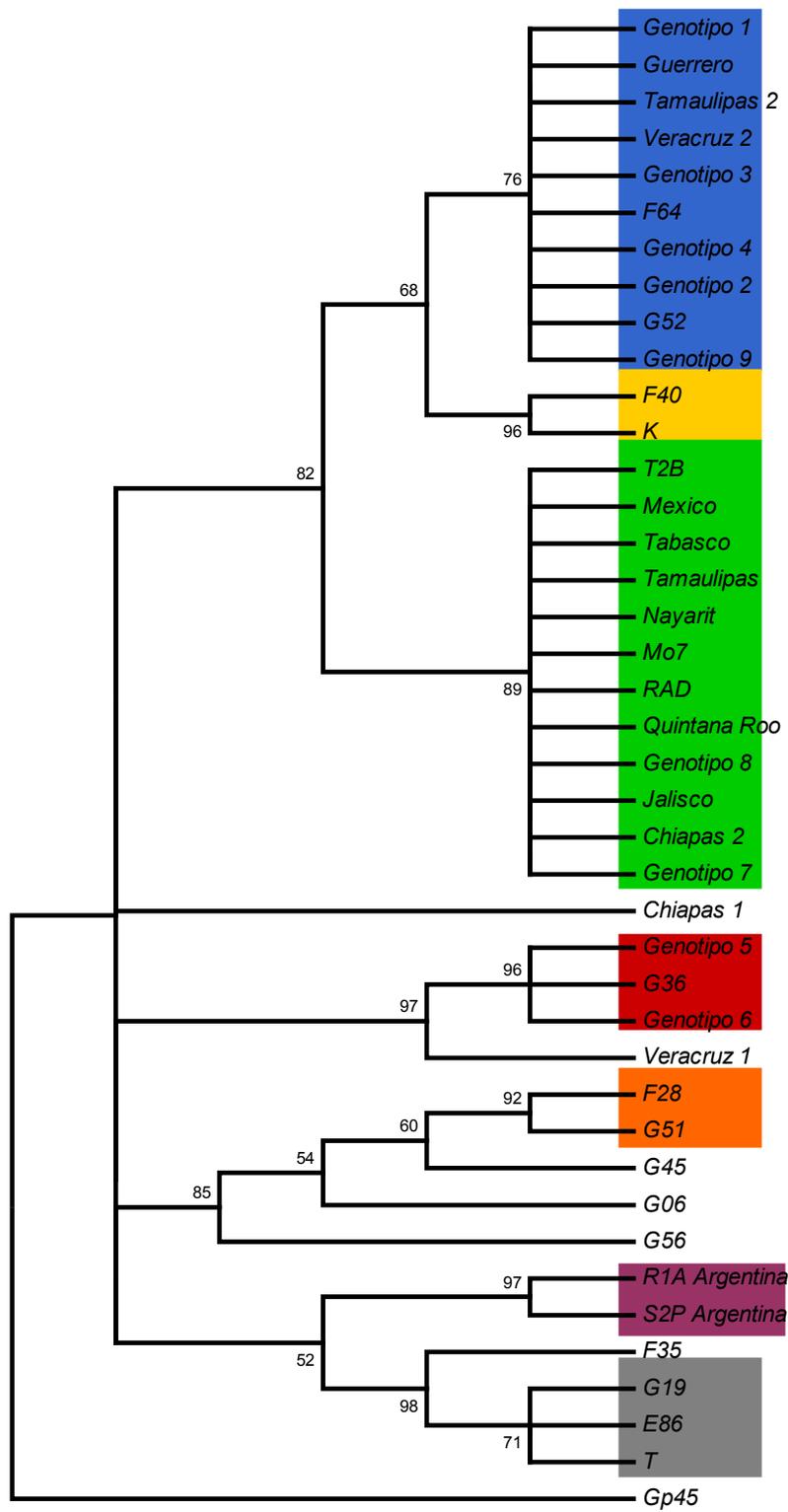


Figura 11. Análisis filogenético del gen *msa-1* con aislados mexicanos, australianos y argentinos . Filograma construido con el método de Neighbor Joining. Se fijó la raíz con el gen Gp45 de *B. bigemina*. Los números representan el porcentaje de repeticiones consenso de la muestra en 1000 replicaciones. En los recuadros coloreados pueden observarse las diferentes agrupaciones de los aislados.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

El parásito intraeritrocítico *Babesia bovis* es responsable de la enfermedad hemolítica en el ganado vacuno, considerado como causa principal del impedimento en exportaciones e importaciones de ganado a nivel mundial (Hines *et al.*, 1989). Se sabe que animales que se infectan con *Babesia bovis* y que han logrado la recuperación, cuentan con una respuesta inmune protectora después de la exposición a los antígenos del parásito. En la actualidad la identificación y caracterización de estos antígenos es de suma importancia para el desarrollo de vacunas que contengan únicamente los inmunógenos necesarios para la inducción de una inmunidad protectora contra nuevas exposiciones de *Babesia bovis* (Callow, 1977).

Las proteínas de superficie del merozoito son fundamentales en la patogenia de la babesiosis ya que guardan una relación estrecha en el reconocimiento, unión y penetración del parásito a las células rojas de hospedero bovino (Jack y Ward, 1981). Estos antígenos de superficie son blancos potenciales del sistema inmune debido a que se expresan en la etapa inicial de la infección, razón por la cual son considerados como candidatos vacunales, sin embargo cabe mencionar, que los parásitos pueden alterar sistemáticamente sus antígenos de superficie para generar nuevas variantes antigénicas y así lograr evadir al sistema inmune (Dzikowski y Deitsch, 2006). La habilidad de inducir una respuesta inmune protectora por las proteínas de superficie ha sido comprobada en *Plasmodium falciparum* (Hines, 1989). Las especies de *Babesia* y *Plasmodium* utilizan los antígenos de superficie para poder unirse a las células blanco y poder penetrarlas (Mosqueda *et al.*, 2002). En *Babesia bovis* se han identificado 5 proteínas pertenecientes a la familia de los antígenos variables de superficie del merozoito (VMSA) MSA-1, MSA-2_{a1}, MSA-2_{a2}, MSA-2b y MSA-2c, respectivamente (Florin-Christensen *et al.*, 2002).

En este trabajo se evaluó si existe diversidad de genotipos de *msa-1* de *Babesia bovis* dentro de una misma población de bovinos, y si existe la generación de variantes alélicas de *msa-1* dentro de un mismo bovino.

Como objetivo número uno del trabajo se realizó la selección de animales infectados naturalmente con *Babesia bovis* por medio de la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) de acuerdo al protocolo utilizado en el laboratorio de parasitología del CENID PAVET en Jiutepec, Morelos, México. En el análisis de las reacciones antígeno-anticuerpo se encontró señal positiva fluorescente visualizando los merozoitos y trofozoitos dentro de las células de acuerdo a lo que se esperaba. Los resultados fueron consistentes con las formas encontradas en los controles positivos utilizados, y con la morfología y tamaño de los merozoitos de *Babesia bovis* ya reportados (Mehlhorn y Schein, 1984).

Como siguiente objetivo se purificó el DNA genómico por medio de un protocolo desarrollado comercialmente (Gentra Systems ®) y se amplificó mediante PCR el gen *msa-1* de *B. bovis* de eritrocitos infectados de los bovinos seleccionados; Anteriormente se ha demostrado la eficacia de la amplificación de *msa-1* por medio de esta técnica (Suarez *et al.*, 2000; LeRoith *et al.*, 2005, 2006). En este trabajo también pudimos amplificar exitosamente el gen *msa-1* utilizando oligonucleótidos diseñados específicamente, comprobando los resultados previos. Al análisis de PCR se visualizaron amplicones de tamaño esperado de 1498 pb, 1381 bp, y de 1216 pb, como se esperaba de acuerdo al diseño de los oligonucleótidos. Como control positivo se analizó el DNA extraído de la clona biológica de Mo7 *Babesia bovis* mostrando resultados similares a los ya reportados (Rodríguez *et al.*, 1986; Hines *et al.*, 1989). De manera preventiva para confirmar que no existiera ninguna clase de contaminación, las muestras se analizaron siempre en presencia de un control negativo, verificando que la reacción fuera específica y por lo tanto se puede afirmar que los amplicones obtenidos son específicos de *msa-1*.

La amplificación del gen *msa-1* para algunas muestras se obtuvo fácilmente, sin embargo en la mayoría de ellas no fue así y por lo tanto, se debieron realizar ensayos de PCR anidados consecutivos. Una explicación es que las muestras de sangre infectada de los aislados de campo de Nayarit y Jalisco provienen de zonas endémicas y presentan un porcentaje de parasitemia por debajo del límite de detección de la técnica de PCR, según reportes previos, lo que significa que aunque los bovinos estén infectados, no se detectan como tales en un PCR sencillo (Gubbels et al., 1999; Pipano et al., 2002; Oliveira- Sequeiro et al., 2005). Para descartar la posibilidad de la presencia de inhibidores de la reacción de PCR, se utilizaron muestras no infectadas a las cuales se les adicionó DNA de *Babesia bovis* a diferentes diluciones, las cuales fueron procesadas y purificadas de acuerdo a los protocolos establecidos y de igual forma fueron manejadas el resto de las muestras problema; al observar amplificación en estas muestras, se comprobó que no era un problema de presencia de inhibidores lo que ocasionaba la falta de amplificación. Las amplificaciones de *msa-1* fueron realizadas en fechas posteriores a la fecha inicial de la toma de las mismas, cuestión por la cual se sospechó que no se logran amplificaciones de este gen debido a que la molécula se había degradado en el DNA ya purificado. Es importante recordar que el diagnóstico por serología no detecta la presencia del parásito, por lo que el animal muestreado puede haber eliminado el patógeno y seguir siendo un animal seropositivo, asociado a ésta problemática también encontramos que el nivel de parasitemia fluctúa a lo largo del año en los animales portadores, lo que ha sido descrito anteriormente para *Babesia bovis* y *Babesia divergens* (Calder et al., 1996; Gubbels et al., 1999).

En los ensayos de digestión con la enzima Eco RI, se observaron insertos del tamaño esperado, sin embargo entre muestras que fueron amplificadas con los mismos oligonucleótidos se pudo apreciar un pequeña diferencia entre el tamaño del inserto.

Esto pudo verificarse al momento del análisis de las secuencias donde se observaron diferentes longitudes entre ellas, probablemente ocasionadas por deleciones y/o inserciones, como ya se ha demostrado con anterioridad en estudios de *Babesia bovis* donde se comprobó la existencia de la gran variabilidad en longitud de las secuencias de diferentes aislados (LeRoith *et al.*, 2005).

Para la realización de los siguientes objetivos de determinación y comparación de genotipos dentro de un mismo hato y dentro de un mismo animal, se realizó la secuenciación de dos clones de cada una de las muestras positivas a *Babesia bovis* de ambos aislados; Nayarit y Jalisco. En el análisis se observó una variación muy alta, donde las secuencias que se obtuvieron variaron en longitud teniendo tamaños que corresponden a 960pb, 993pb, 1001pb y 1005pb, debido a las inserciones y/o deleciones que se observaron. Se analizó la diversidad de cada una de las secuencias para posteriormente formar grupos de genotipos, por lo que se proponen 9 genotipos diferentes generados por *msa-1* de los aislados mexicanos de las muestras de dos ranchos, Nayarit y Jalisco. Es necesaria la clasificación de los aislados de *Babesia bovis* mediante la utilización de genotipos específicos para poder establecer un origen del ganado y/o los movimientos de exportación-importación dentro del país, como se ha realizado previamente en *Anaplasma marginale* con los genotipos de las proteínas de superficie *msh-1* (De la Fuente *et al.*, 2003).

Los análisis de los alineamientos múltiples indican que dentro del hato proveniente del rancho del Estado de Nayarit se encuentran establecidos ocho de los nueve genotipos sugeridos aquí (Genotipos 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 y 9) y dentro del hato en el Estado de Jalisco, se encuentran 3 genotipos (Genotipos 2, 3 y 4). Por lo que puede confirmarse la existencia de una diversidad génica dentro de un mismo hato, ya que los datos demuestran que dentro de poblaciones de bovinos se encuentra presente más de un genotipo, en similitud con lo que se ha observado en estudios realizados en *Anaplasma marginale*, donde se ha reportado

la presencia y transmisión de genotipos múltiples del gen *msp1α* dentro de hatos endémicos de la enfermedad (Palmer *et al.*, 2004).

Con relación a la variación génica de un genotipo establecido en un bovino a lo largo del tiempo, los análisis de los alineamientos nucleotídicos de las secuencias pertenecientes al primero y segundo muestreo, demuestran que al menos un animal perteneciente al hato en Jalisco y uno del hato en Nayarit mantuvieron la presencia del mismo genotipo durante el transcurso de 6 meses, tiempo estimado que hubo entre cada muestreo. En el análisis de las secuencias nucleotídicas de un tercer bovino proveniente de Nayarit pudo observarse una diferencia en identidad del 32.7% con respecto a la primera molécula de *msa-1*; un cambio notable percibido fue la variación en longitud de ambas secuencias, debido a que la primera molécula contaba con una longitud de 960pb y la segunda tiene una longitud de 993pb, cuestión que pudo ser originado muy probablemente por la introducción de un nuevo genotipo o bien por la variación antigénica. Según reportes previos, ciertos organismos han adoptado estrategias como el cambio de sus proteínas expuestas, para poder evadir la respuesta inmune del hospedero y sobrevivir (Brown y Palmer, 1999; Deitsch, *et al.*, 2001). Antígenos de superficie como MSA-1 tienen la capacidad de expresar diferentes formas antigénicas y variar con el tiempo como lo indicaron Allred y colaboradores en 1993 (a,b). De igual manera, en las poblaciones de *Babesia bovis* analizadas, en *Theileria parva* se ha observado una población heterogénea de parásitos dentro de un mismo aislado y de diferentes aislados geográficos (Chae *et al.*, 1998; Katzer *et al.*, 2006).

Mecanismos de evasión inmune se han reportado en organismos como *Plasmodium knowlesi* y *Trypanosoma brucei*, donde poblaciones de parásitos pueden variar antigénicamente sus moléculas de superficie por medio de intercambios de las posiciones entre los diferentes genes que se encuentran dentro el genoma de cada parásito (Biggs *et al.*, 1991; Calderwood *et al.*, 2003).

Las bases del polimorfismo de antígenos localizados en la superficie de eritrocitos infectados de *Babesia bovis* han sido mayormente estudiados en los antígenos de superficie variables del eritrocito VESA donde sus proteínas son codificadas por familias multigénicas que permiten la expresión proteica con epítopes de células “B” únicos en cada ocasión (O'Connor *et al.*, 1997).

En este caso la diversidad antigénica resulta del amplio polimorfismo de aminoácidos en la proteína que se genera a partir del uso del mecanismo de conversión génica segmental de grandes familias multigenes compuestas al menos por 300 copias polimórficas como es el caso de *Babesia bovis* (Allred y Al-Khedery, 2004). La habilidad de *B. bovis* de variar la expresión de sus proteínas de superficie es compartida por protozoarios como los tripanosomas africanos, *Plasmodium* y bacterias como *Borrelia* y *Neisseria* (Donelson, 2003; Barbour y Restrepo, 2000; Criss *et al.*, 2005; Dzikowski *et al.*, 2006).

Otro medio por el cual *Babesia bovis* es capaz de establecer infecciones de larga duración debido a la persistencia del parásito mediante el mecanismo de secuestro de las células rojas infectadas dentro de la microvasculatura del hospedero, comportamiento asociado con las complicaciones cerebrales y vasculares de la enfermedad, además es un sistema que provee a los parásitos excelentes medios para la evasión inmune. Los ligandos de las células rojas infectadas implicados en la citoadherencia aún no han sido identificados plenamente, sin embargo estudios preliminares señalan a las familias multigénicas como la familia VESA de *B. bovis*, las responsables de este mecanismo (O'Connor, 1999; O'Connor y Allred, 2000; Allred *et al.*, 2000).

Por lo que se puede deslindar que las variaciones presentes en los alineamientos nucleotídicos (deleciones y/o inserciones) fueron originadas a partir del proceso integral del parásito para su supervivencia y evasión del sistema inmune (Smith *et al.*, 1995).

De igual manera la variación observada en *msa-1* puede deberse a la presencia de diferentes genotipos de parásitos que se recombinan sexualmente entre sí generando nuevas variantes como ya ha sido reportado anteriormente (Chae et al., 1998; Proudfoot y McCulloch, 2005).

La evaluación de los árboles filogenéticos permite concluir que la generación de los árboles generados a partir de cada uno de los métodos utilizados tiene una alta similitud. El método de Neighbor Joining se caracteriza por tener la ventaja de construir grandes árboles a partir de cientos de secuencias a gran velocidad a diferencia de los demás métodos (Kuhner y Felsenstein, 1994). Por lo cual la aplicación del método de Neighbor Joining se destinó para la construcción del árbol filogenético donde el número de secuencias a analizar era demasiado alto y se requería obtener un árbol de forma rápida (figura 9); conjuntamente se eligió por la característica que tienen los métodos basados en distancias de estimar el número de sustituciones ocurridas a lo largo de su evolución (Yves Van de Peer, 2003).

Para los análisis más profundos y con un número menor de secuencias a evaluar se utilizó el método de Máxima Parsimonia para la construcción del árbol filogenético mostrado en la figura 8. Es un método basado en caracteres y trata de utilizar cada una de las posiciones del alineamiento múltiple para la búsqueda del árbol más probable (más parsimonioso), que será el que tiene un número menor de cambios (Swofford y Sullivan, 2003).

En el filograma obtenido de las secuencias de los aislados mexicanos, argentinos y australianos se puede observar una clara división entre estos aislados, mostrando una consistencia alta entre ellos. Sin embargo un grupo se encuentra comprendido por aislados mexicanos y australianos a la par con los genotipos 1, 2, 3, 4 y 9, lo que sugiere que las secuencias de *Babesia bovis* americanas pudieron originarse a partir de aislados australianos, debido esto a la

importación de ganado australiano a México e infectado con el parásito. Otra posibilidad del porque secuencias americanas son tan similares a las australianas, podemos encontrar la variación antigénica donde los parásitos adoptan estrategias para cambiar sus proteínas expuestas en la superficie de eritrocitos infectados y así escapar al reconocimiento del sistema inmune (Calderwood *et al.*, 2002).

Los parásitos que muestran variantes de antígenos de superficie como *msa-1* de *Babesia bovis*, son resistentes a la presión selectiva; por lo cual las variantes surgen de manera rápida en un bovino inmunológicamente competente (Good *et al.*, 1993; Jacobson *et al.*, 1993; Allred *et al.*, 1994), por lo que se sugiere que las secuencias podrían cambiar a tal grado, de manera que pudieran ser muy similares a otras sin que eso signifique que los genes del donador necesariamente provengan de otro continente. Los aislados americanos, australianos, y argentinos muestran una relación evolutiva muy estrecha, sugiriendo a los aislados australianos como grupo raíz debido a que se encuentran cercanos al grupo externo.

PERSPECTIVAS

El candidato vacunal MSA-1 de *Babesia bovis* puede variar antigénicamente entre aislados ó variar con el tiempo en animales crónicamente infectados, por lo que es esencial la determinación de epítopes conservados en los diferentes aislados mexicanos y sus genotipos.

Se requiere el estudio a detalle de epítopes blanco conservados entre aislados que estimulen IFN- γ para la subsecuente activación de células T CD4⁺ efectoras que produzcan anticuerpos protectores.

De igual manera es importante el estudio de epítopes de MSA-1 compartidos entre los diferentes genotipos, y sean cruciales en el proceso de invasión eritrocítica de diferentes aislados.

A consecuencia de la evasión inmune, los organismos expresan diferentes formas antigénicas de sus moléculas de superficie, por lo que es importante la determinación de clonas capaces de cambiar con el tiempo su fenotipo antigénico y generar variación antigénica en una población de parásitos establecida.

A pesar de la gran variabilidad que presenta MSA-1 de *Babesia bovis*, la caracterización de los ligandos responsables de la citoadherencia y el secuestro permitirá entender la relación entre el parásito y hospedero para un mejor diseño de vacunas.

La rapidez con la que las variantes antigénicas aparecen dentro de una población de parásitos de un mismo hato aún se desconoce, por lo que se propone el estudio de los genotipos y su variabilidad en un tiempo mayor de 2 años.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas Abul K., Lichtman Andrew H. and Pober Jordan S. 2004. Inmunología Celular y Molecular. Quinta Edición. Elsevier. España. pp. 528.

Allred D.R. and Ahrens K.P. 1993. A nonsubjective assay for antigenic modifications of the *Babesia bovis*-parasitized erythrocyte surface. J. Parasitol. 79 (2): 274-277.

Allred D.R. and Ahrens K.P. 1993. Isolate-specific parasite antigens of the *Babesia bovis*-infected erythrocyte surface. Mol. Biochem. Parasitol. 60 (1): 121-132.

Allred D.R., Cinque R.M., Lane T.J., and Ahrens K.P. 1994. Antigenic variation of parasite-derived antigens on the surface of *Babesia bovis* infected erythrocytes. Infect immun. 62 (1): 91-98.

Allred D.R. 1995. Immune evasion by *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum*: Cliff-dwellers of the parasite world. Parasitol. today. 11 (3): 100-105.

Allred D.R., Carlton J.M.R., Satcher R.L., Long J.A., Brown W.C., Patterson P.E., O'Connor R.M. and Stroup S.E. 2000. The ves multigene family of *B.bovis* encodes components of rapid antigenic variation at the infected erythrocyte surface. Mol. Cell. 5: 153-162.

Allred D.R. 2003. Babesiosis: persistence in the face of adversity. Trends parasitol. 19 (2): 51-55.

Allred D.R. and Al-Khedery B. 2004. Antigenic variation and cytoadhesion in *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum*: different logics achieve the same goal.. Mol. Biochem. Parasitol. 134: 27-35.

Allred D.R. and Al-Khedery B. 2006. Antigenic variation as an exploitable weakness of babesial parasites. Vet. Parasitol. 138: 50-60.

Barbour A.G. and Restrepo B.I. 2002. Antigenic variation in vector-borne pathogens. Emerg. Infect. Dis. 6 (5): 449-45.

Barros S.L., Madruga C.R., Araújo F.R., Menk C.F., de Almeida M.A., Melo E.P. and Kessler R.H. 2005. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 100 (6): 513-517.

Berens S.J., Brayton K.A., Molloy J.B, Bock R.E., Lew A.E and McElwain T.F. 2005. Merozoite surface antigen 2 proteins of *Babesia bovis* vaccine breakthrough isolates contains a unique hypervariable region composed of degenerate repeats. Infect Immun. 73(11): 7180-7189.

Biggs B.A., Goozé L., Wycherley K., Wollish W., Southwell B. and Leech J.H. 1991. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 9171-9174.

Bock R., Jackson L., de Vos A. and Jorgensen W. 2004. Babesiosis of cattle. Parasitol. 129: 247- 269.

Bock R.E., Lew A.E., Minchin C.M., Jeston P.J. and Jorgensen W.K. 2000. Application of PCR assays isolated from cattle with clinical babesiosis soon after vaccination against tick fever. *Aust. Vet. J.* 78 (3):179-181.

Borgonio V., Mosqueda J., Genis A.D., Falcon A., Alvarez J.A., Camacho M., and Figueroa J.V. (2008). *msa-1* and *msa-2c* gene analysis and common epitopes assessment in Mexican *Babesia bovis* isolates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1150 (In press).

Böse R., Jorgensen W.K., Dalgliesh R.J., Friedhoof K.T. and De Vos A.J. 1995. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet. Parasitol.* 57: 61-74.

Brown W.C. and Palmer G.H. 1999. Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitol Today.* 15 (7):275-281.

Brown W.C., Norimine J., Knowles D.P. and Goff W.L. 2006. Immune control of *Babesia bovis* infection. *Vet Parasitol.* 138 (1-1): 75-87.

Brown W.C., Palmer G.H., McElwain T.F., Hines S.H. and Dobbelaere D.A.E. 1993. *Babesia bovis*: Characterization of the T helper cell response against the 42-kDa merozoite surface antigen (MSA-1) in cattle. *Exp Parasitol.* 77: 97-110.

Brown W.C., Ruef B.J, Norimine J. Kegerreis K.A., Suarez C.E., Conley P.G., Stich R.W., Carson K.H. and Rice-Ficht A.C. 2001. A novel 20 kilodalton protein conserved in *Babesia bovis* and *B. bigemina* stimulates memory CD4+ T Lymphocytes responses in *B. bovis* immune cattle. *Mol Biochem Parasitol.* 118: 97-109.

Calder J.A., Reddy G.R., Chieves L., Courtney C.H., Littell R., Livengood J.R., Norval R.A., Smith C. and Dame J.B. 1996. Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR-based tests. J. Clin. Microbiol. 34 (11): 2748-2755.

Calderwood M.S., Gannoun-Zaki L., Wellem's T.E. and Deitsch K.W. 2003. *Plasmodium falciparum* var genes are regulated by two regions with separate promoters, one upstream of the coding region and a second within the intron. J. Biol. Chem. 278 (36): 34125-34132.

Callow L.L. 1968. The infection of *Boophilus microplus* with *Babesia bigemina*. Parasitol. 58: 663-670.

Callow L.L. 1977. Vaccination against bovine babesiosis. Adv. Exp. Med. Biol. 93: 121-49.

Callow L.L., Dalgliesh R.J. and de Vos A.J. 1997. Development of effective living vaccines against bovine babesiosis the longest field trial?. Int. J. Parasitol. 27 (7): 747-67.

Chae J.S., Lee J.M., Kwon O.D., Holman P.J., Waghela S.D. and Wagner G.G. 1998. Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene variable (V4) region among and within geographic isolates of *Theileria* from cattle, elk and white tailed deer. Vet. Parasitol. 75: 41-52.

Cooke B.M., Mohandas N., Cowman A.F. and Coppel R.L. 2005. Cellular adhesive phenomena in apicomplexan parasites of red blood cells. Vet. Parasitol. 132: 273-295.

Costa-Júnior L.M., Leite E.M., Martins O.A. and Barbosa M.F. 2006. Comparison of different diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated parasites. *Vet. Parasitol.* 139: 231-236.

Criss A.K., Kline K.A. and Seifert H.S. 2005. The frequency and rate of pilin antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol.* 58(2): 510-519.

Dalrymple B.P. 1993. Molecular variation and diversity in candidate Vaccine antigens from *Babesia*. *Acta Trop.* 53: 227-238.

Darwin C. 1859. *On the origin of species by means of natural selection*. London: Murray.

De la Fuente J., García-García J.C., Blouin E.F., Saliki J.T. and Kocan K.M. 2002. Infection of tick cells and bovine erythrocytes with one genotype of intracellular Ehrlichia *Anaplasma Marginale* excludes infection with other genotypes. *Clin Diag. Lab. Immun.* 9 (3): 658-668.

De Waal D.T. and Combrink M.P. 2006. Live vaccines against bovine babesiosis. *Vet. parasitol.* 138: 88-96.

Deitsch K.W., Calderwood M.S. and Wellems T.E. 2001. Malaria: Cooperative silencing elements in var genes. *Nature.* 412(6850):875-876.

Deitsch K.W., Moxon E.R. and Wellems T.E. 1997. Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 (3): 281-293.

Donelson JE. 2003. Antigenic variation and the African trypanosome genome. *Acta Trop.* 85 (3): 391-404.

Dubremetz J.F., Garcia-Réguet N., Conseil V. and Fourmaux M.N. 1998. Apical organelles and host-cell invasion by apicomplexa. *Int. J. Parasitol.* 28: 1007-1013.

Dzikowski R., Templeton T.J. and Deitsch K. 2006. Variant antigen gene expression in malaria. *Cell. Microbiol.* 8 (9): 1371-1381.

Estadística agropecuaria. Servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP), SAGARPA. 2004.

Fahrimal Y., Goff W.I. and Jasmer D.P. 1992. Detection of *Babesia bovis* carrier by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. *J. Clin Microbiol.* 30 (6): 1374-1379.

Fernández M., Cantó G.J. y Aboytes R. 1995. Prevalencia de anticuerpos séricos en contra de *Babesia* spp. Y *Anaplasma marginale* en el municipio de Santiago Ixcuintla, Nayarit. *Vet. Mex.* 26 (4): 407-409.

Figueroa J.V., Chieves L.P., Johnson G.S. and Buening G.M. 1992. Detection of *Babesia bigemina* infected carriers by polymerase chain reaction amplification. *J. Clin Microbiol.* 30 (10): 2576-2582.

Florin-Christensen M., Suarez C.E., Hines S.A., Palmer G.H., Brown W.C. and McElwain T.F. 2002. The *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 locus contains four tandemly arranged and expressed genes encoding immunologically distinct proteins. *Infect Immun.* 70(7): 3566-3575.

Friedhoff K.T. 1981. Morphologic aspects of *Babesia* in the tick. In: Ristic M. and Kreier J.P. (ed). Babesiosis. Academic Press, New York. pp:143-164.

Genis A.D., Mosqueda J., Borgonio V.M., Falcon A., Alvarez J.A., Camacho M., Munoz M.D.L., and Figueroa J.V. (2008). Phylogenetic Analysis of Mexican *Babesia bovis* Isolates Using *msa* and *ssrRNA* Gene Sequences. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1150 (In press).

Góes T.S., Góes V.S., Ribeiro M.F.B. and Gontijo C.M. 2007. Bovine babesiosis: Anti-erythrocyte antibodies purification from the sera of naturally infected cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 116: 215-218.

Goff W.L., Davis W.C., Palmer G.H., McElwain T.F., Johnson W.C., Bailey J.F. and McGuire T.C. 1988. Identification of *Babesia bovis* Merozoite Surface Antigens by Using Immune Bovine Sera and Monoclonal Antibodies *Infect. Immun.* 56 (9): 2363-2368.

Goff W.L., Storset A.K., Johnson W.C. and Brown W.C. 2006. Bovine splenic NK cells synthesize IFN- γ in response to IL-12 containing supernatants from *Babesia bovis*-exposed monocyte cultures. *Parasite Immunol.* 28: 221-228.

Goncalves P.M., Passos L.M.F. and Ribeiro M.F.B. 1999. Detection of IgM antibodies against *Babesia bovis* in cattle. *Vet. Parasitol.* 82: 11-17.

Good M.F., Zevering Y., Currier J. and Bilsborough J. 1993. Original antigenic sin, T cell memory, and malaria sporozoite immunity: an hypothesis for immune evasion. *Parasite Immunol.* 15: 187-193.

Gubbels J.M., De Vos A.P., Van Der Weide M., Visras J., Schouls L.M. De Vries E. and Jongejan F. 1999. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. J. Clin. Microbiol. 37 (6): 1782-1789.

Gupta S. 2005. Parasite immune escape: new views into host-parasite interactions. Curr. Opin. Microbiol. 8 (4): 428-433.

Hines S.A., McElwain T.F., Buening G.M. and Palmer G.H. 1989. Molecular characterization of *Babesia bovis* merozoite surface proteins bearing epitopes immunodominant in protected cattle. Mol Biochem Parasitol. 37: 1-10.

Hines S.A., Palmer G.H., Jasmer D.P., Goff W.L. and McElwain T.F. 1995. Immunization of cattle with recombinant *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1. Infect Immun. 63 (1): 349-352.

Hines S.A., Palmer G.H., Jasmer D.P., McGuire T.C. and McElwain T.F. 1992. Neutralization-sensitive merozoite surface antigen of *Babesia bovis* encoded by members of polymorphic gene family. Mol Biochem Parasitol. 55: 85-94.

Homer M.J., Aguilar-Delfin I., Telford III S.R., Krause P.J. and Persing D.H. 2000. Babesiosis. Clin. Microbiol. Rev. 13 (3):451-469.

Howell J.M., Massaro W.U., Palmer G.H., Scoles G.A. and Knowles D.P. 2007. Transovarial transmission efficiency of *Babesia bovis* tick stages acquired by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* during acute infection. J Clin Microbiol 45(2): 426-431.

Hutchings C.L., Li A., Fernandez K.M., Fletcher T., Jackson L.A., Molloy J.B., Jorgensen W.K., Lim C.T. and Cooke B.M. 2007. New insights into the altered adhesive and mechanical properties of red blood cells parasitized by *Babesia bovis*. *Mol. Microbiol.* 65 (4): 1092-1105.

Jacobson R.H., Parrodi F., Wright I.G., Fitzgerald C.J. and Dobson C. 1993. *Babesia bovis*: in vitro phagocytosis promoted by immune serum and by antibodies produced against protective antigens. *Parasitol. Res.* 79 (3): 221-226.

Janeway C. A., Travers P., Walport M. and Capra J. D. 2005. *Immunobiology: The immune system in health and disease*. 6 ed. Current Biology Publications pp: 689-690.

Jasmer D.P., Reduker D.W., Goff W.L., Stiller D. and McGuire T.C. 1990. DNA probes distinguish geographical isolates and identify a novel DNA molecule of *Babesia bovis*. *J. Parasitol.* 76 (6): 834-41.

Jasmer D.P., Reduker D.W., Hines S.A., Perryman L.E. and McGuire T.C. 1992. Surface epitope localization and gene structure of *Babesia bovis* 44 kilodalton variable merozoite surface antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* 55:75-84.

Kahl L.P, Mitchell G.F., Dalgliesh R.J., Stewart N.P., Rodwell B.J., Mellors L.T., Timms P. and Callow L.L. 1983. *Babesia bovis*: proteins of virulent and avirulent parasites passaged through ticks and splenectomized or intact calves. *Exp. Parasitol.* 56 (2): 222-35.

Katzer F., Ngugi D., Oura C., Bishop R.P., Taracha E.L.N., Walker A.R. and McKeever D.J. 2006. Extensive genotypic diversity in a recombining population of the apicomplexan parasite *Theileria parva*. *Infect. Immun.* 74 (10): 5456-5464.

Kuhner M.K, Felsenstein J. 1994. A simulation comparison of phylogeny algorithms under equal and unequal evolutionary rates. *Mol. Biol. Evol.* 11 (3): 459-468.

Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B. and Nei M. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics.* 17 (12): 1244-1245.

LeRoith T., Berens S.J., Brayton K.A., Hines S.A., Brown W.C., Norimine J. and McElwain T.F. 2006. The *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 hypervariable region induces surface-reactive antibodies that block merozoite invasion. *Infect Immun.* 74 (6): 3663-3667.

LeRoith T., Brayton K.A., Molloy J.B., Bock R.E., Hines S.A., Lew A.E. and McElwain T.F. 2005. Sequence variation and immunologic cross-reactivity among *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 protein from vaccine strain and vaccine breakthrough isolates. *Infect Immun.* 73 (9): 5388-5394.

Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.E., Deroux G., Grain J., Honigberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R. 3rd, Lom J., Lynn D., Merinfeld E.G., Page F.C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J. and Wallace F.G. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* 27 (1):37-58.

Lew A. and Jorgensen W. 2005. Molecular approaches to detect and study the organisms causing bovine tick borne diseases: babesiosis and anaplasmosis. *African J. of Biotechnology.* 4 (4): 292-302.

McCosker P.J. 1981. The global importance of babesiosis. In: Ristic M. and Kreier JP. (ed). Babesiosis. Academic Press, New York. pp: 1-24.

McElwain T.F., Hines S.A. and Palmer G.H. 1998. Persistence of antibodies against epitopes encoded by a single gene copy of the *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 (MSA-1). J. Parasitol. 84 (2): 449-452.

McElwain T.F., Palmer G.H., Goff W.L. and McGuire T.C. 1988. Identification of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* merozoite proteins with isolate and species common epitopes recognized by antibodies in bovine immune sera. Infect Immun. 56(6): 1658-1660.

Mehlhorn H. y Schein E. 1984. The piroplasms: life cycle and sexual stages. Adv Parasitol. 23: 37-103.

Mosqueda J., Figueroa J.V., Alvarez A., Bautista R., Falcon A., Ramos A., Canto G. and Vega C.A. 2007. Advances in the development of molecular tools for the control of bovine babesiosis in Mexico. Parassitologia. 49 (1): 19-22.

Mosqueda J., McElwain T.F. and Palmer G.H. 2002. *Babesia bovis* Merozoite Surface Antigen 2 proteins are expressed on the merozoite and sporozoite surface, and specific antibodies inhibit attachment and invasion of erythrocytes. Infect. Immun. 70 (11): 6448-6455.

Mosqueda J., McElwain T.F., Stiller D. and Palmer G.H. 2002. *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. Infect Immun. 70 (3): 1599-1603.

Nevils M.A., Figueroa J.V., Turk J.R., Canto G.J., Ellersieck M.R. and Carson C.A. 2000. Cloned lines of *Babesia bovis* differ in their ability to induce cerebral babesiosis in cattle. *Parasitol. Res.* 86:437-443.

O'Connor R., Lane T.J., Stroup S.E. and Allred D.R. 1997. Characterization of variant erythrocyte surface antigen (VESA1) expressed by *Babesia bovis* during antigenic variation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 89:259-270.

O'Connor R., Long J.A. and Allred D.R. 1999. Cytoadherence of *Babesia bovis* infected erythrocytes to bovine brain capillary endothelial cells provides an in vitro model for sequestration. *Infect. Immun.* 67 (8): 3921-3928.

O'Connor R.M. and Allred D.R. 2000. Selection of the *Babesia bovis* infected erythrocytes for adhesion to endothelial cells coselects for altered variant erythrocyte surface antigen isoforms. *J. Immunol.* 164: 2037-2045.

Oliveira-Sequeira T.C., Oliveira M.C., Araujo J.P. Jr. and Amarante A.F. 2005. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. *Int. J. Parasitol.* 35 (1): 105-111.

Page R.D.M. and Holmes E.C. 1998. *Molecular evolution: A phylogenetic approach.* Blackwell, Oxford.

Palmer G.H., Knowles D.P., Rodriguez J.L., Gnad D.P., Hollis L.C., Marston T. and Brayton K.A. 2004. Stochastic transmission of multiple genotypically distinct *anaplasma marginale* strains in a herd with high prevalence of *Anaplasma* infection. *J. Clin. Microbiol.* 42 (11): 5381-5384.

- Palmer G.H., McElwain T.F., Parryman L.E, Davis W.C., Reduker D.R., Jasmer D.P., Shkap V., Pipano E., Goff W.L. and McGuire T.C. 1991. Strain variation of *Babesia bovis* merozoite surface-exposed apitopes. *Infect Immun.* 59 (9): 3340-3342.
- Petchpoo W., Tan-ariya P., Boonsaeng V., Brockelman C.R., Wilairat P. and Panyim S. 1992. A specific DNA probe which identifies *Babesia bovis* in whole blood. *Vet. Parasitol.* 42 (3-4):189-98.
- Pipano E., Shkap V., Kriegel Y., Leibovitz B., Savitsky I. and Fish I. 2002. *Babesia bovis* and *B. bigemina*: Persistence of infection in friesian cows following vaccination with live antibabesial vaccines. *Vet. J.* 164: 64-68.
- Potgieter F.T. and Els H.J. 1976. Light and electron microscopic observations on the development of small merozoites of *Babesia bovis* in *Boophilus microplus*. *Onderstepoort J Vet Res.* 43(3): 123-128.
- Potgieter F.T. and Els H.J. 1977. The fine structure of intra-erythrocytic stages of *Babesia bigemina*. *Onderstepoort J Vet Res.* 44(3): 157-168.
- Preiser P., Kaviratne M., Khan S., Bannister L. and Jarra W. 2000. The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes Infect.* 2: 1461-1477.
- Proudfoot C. and McCulloch R. 2005. Distinct roles for two RAD51 related genes in *Trypanosoma brucei* antigenic variation. *Nucleic Acids Res.* 33 (21): 6906-6919.
- Purnell R.E. 1981. Tick-borne diseases. *Br Vet J.* 137(2):221-40.

Raes J. and Van de Peer Y. 2003. Gene duplication, the evolution of novel gene functions, and detecting functional divergence of duplicates in silico. *Appl. Bioinformatics*. 2 (2): 91-101.

Reiter I. and Weiland G. 1989. Recently developed methods for the detection of babesial infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83: 21-23.

Rodriguez JL., Palmer G.H., Knowels Jr D.P. and Brayton K.A. 2005. Distinctly different *msp2* pseudogene repertoires in *Anaplasma marginale* strains that are capable of superinfection. *Gene*. 361: 127-132.

Rodríguez S.D., Buening G.M., Green T.J. and Carson C.A. 1983. Cloning of *Babesia bovis* by In Vitro cultivation. *Infect Immun.* 42 (1): 15-18.

Rogers R.J., Dimmock C.K., De Vos A.J. and Rodwell B.J. 1988. Bovine leucosis contamination of a vaccine produced in vivo against bovine babesiosis and anaplasmosis. *Aust Vet J.* 65 (9):285-287.

Rzhetsky A. and Nei M. 1992. Statistical properties of the ordinary least-squares, generalized least-squares, and minimum-evolution methods of phylogenetic inference. *J. Mol. Evol.* 35 (4): 367-375.

Sambrook J., Russell W.D. *Molecular cloning; A laboratory Manual*. 3^a ed. Vol. 3. United States of America; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Sam-Yellowe T.Y. 1996. Rhoptry organelles of the apicomplexa: Their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitol. Today.* 12 (8): 308-316.

Shetters T.P.M. and Eling W.M.C. 1999. Can *Babesia* infections be used as a model for cerebral malaria?. *Parasitol. today.* 15 (12): 492-497.

Shoda L.K., Palmer G.H., Florin-Christensen J., Florin-Christensen M., Godson D.L. and Brown W.C. 2000. *Babesia bovis* stimulated macrophages express interleukin-1 β , interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. *Infect. Immun.* 68 (9): 5139-5145.

Smith J.D., Chitnis C.E., Craig A.G., Roberts D.J., Hudson D.E., Peterson D.S., Pinches R., Newbold C. I. and Miller L.H. 1995. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell.* 82: 101-110.

Solís S.S. 1991. Epidemiología de garrapatas *Boophilus* y *Amblioma* en México. En: Segundo seminario internacional de parasitología animal: garrapatas y enfermedades que transmiten pp. 19-30.

Solorio-Rivera J.L. y Rodriguez-Vivas R.I. 1997. Epidemiología de la babesiosis bovina. II. Indicadores epidemiológicos y elementos para el diseño de estrategias de control. *Rev Biomed.* 8: 95-105.

Suarez C.E., Florin-Christensen M., Hines S.A., Palmer G.H., Brown W.C. and McElwain T.F. 2000. Characterization of allelic variation in the *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 (MSA-1) locus and identification of a cross-reactive inhibition-sensitive MSA-1 epitope. *Infect Immun.* 68 (12): 6865-6870.

Sullivan J. and Swofford D.L. 2001. Should we use model-based methods for phylogenetic inference when we know that assumptions about among-site rate variation and nucleotide substitution pattern are violated?. *Syst. Biol.* 50 (5): 723-729.

Sullivan J., Abdo Z., Joyce P. and Swofford D.L. 2005. Evaluating the performance of a successive approximations approach to parameter optimization in maximum likelihood phylogeny estimation. *Mol. Biol. Evol.* 22 (6): 1386-1392.

Tizard I. R. *Inmunología Veterinaria*. 6ª ed. Mc Graw Hill, Interamericana, 2002.
Toro B.M., Montenegro-James B., Leon A.E., Lopez B.A., García J.A., Urbina A. y Llovera L. 1990. Vacuna bivalente inactivada contra la babesiosis bovina: eficacia, estabilidad y duración de inmunidad. *Vet. Trop.* 15: 3-16.

Uilenberg G. 2006. Babesia- A historical overview. *Vet Parasitol.* 138: 3-10.
Ward P.A. and Jack R.M. 1981. The entry process of *Babesia* merozoites into red cells. *Am. J. Pathol.* 102 (1): 109-113.

Vandamme Anne- Mieke and Salemi Marco. *The phylogenetic handbook, a Practical approach to DNA and protein phylogeny*. First edition. Cambridge University Press. 2003.

Weber G y Friedhoff KT 1977. Preliminary observations on the ultrastructure of supposed sexual stages of *Babesia bigemina* (Piroplasma). *Z. Parasitenkd.* 53, 83-92.

Wright I.G., Goodger B.V. and Clark I.A. 1988. Immunopathophysiology of *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum* infections. *Parasitol. today.* 4 (8): 214-218.

Wu J., Xie M., Zhang X., Wu H., Wang Z., Xie H., Du Y. and Pong X. 1997. Detection of *Babesia bovis* using a DIG-labeled DNA probe. *Trop. Anim. Health Prod.* 29 (4): 56-59.

Young A.S. and Morzaria S.P. 1986. Biology of *Babesia*. Parasitol. Today. 2 (8): 211-219.

Zintl A., Mulcahy G., Skerret H.E., Taylor S.M. and Gray J.S. 2003. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. Clin. Microbiol. Rev. 16 (4): 622-636.