



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

DISCRIMINACIÓN DE POBLACIONES DE *Babesia bigemina*
MEDIANTE SISTEMAS DE MARCADORES MOLECULARES.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

RODRIGO VICHIDO CHÁVEZ

TUTOR: JUAN JOEL MOSQUEDA GUALITO

COMITÉ TUTORAL: MARÍA DOLORES CORREA BELTRÁN

JULIO VICENTE FIGUEROA MILLÁN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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:

Carlos y María Dolores

**Por haber sido un ejemplo a seguir y brindarme su cariño,
apoyo incondicional y alentarme durante todos los
proyectos que he emprendido en mi vida.**

A mis hermanos:

Carlos y Milton

**Por estar ahí cuando los necesité y servirme de apoyo en
los momentos difíciles de mi vida.**

A mis Amigos:

Gracias por todos los momentos felices que me hicieron pasar y por las grandiosas personas que con el tiempo encontré en ustedes:

Alberto Islas, Antonio Fitz, André Mosqueda, Aurora Hidalgo, Brigido Arévalo, Carlos Martínez, Carmen Castañeda, Enrique Siordia, Fátima Huerta, Fernando Ayala, Gabriela Aguilar, Georgina Hernández, Haydee Martínez, Karla Cereceres, Luis Castro, Javier Pérez, Juan Diego Pérez, Ma. Antonieta Castelló...

A los Doctores que ya considero como amigos: Juan Mosqueda, Alfonso Falcón, Alberto Ramos, Ma. Dolores Correa, Julio Figueroa, Antonio Álvarez, Sergio Rodríguez, Edmundo Rojas, Miguel A. García, J. Francisco Preciado y Zeferino García.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco al Dr. Juan Mosqueda por haber fungido como mi Tutor en el posgrado, siendo la persona a quien debo lo mucho o poco que aprendí con sus asesorías y discusiones.

A la comunidad europea por aprobar el proyecto INCO 003691, gracias al cual se pudo realizar el presente proyecto de investigación y a CONACYT por el apoyo económico brindado durante la realización de mi posgrado.

Por ultimo, a los investigadores del INIFAP CENID-PAVET a quienes estaré eternamente agradecido por su apoyo incondicional durante mi estancia en sus instalaciones y por el haber contribuido enormemente a mi formación en el área de investigación.

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del laboratorio de Babesiosis bovina del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)

DATOS BIOGRÁFICOS DEL AUTOR.

Rodrigo Vichido Chávez nació en la Ciudad de Cuernavaca en el estado de Morelos en Octubre de 1982. Se incorporó como estudiante al INIFAP CENID-PAVET en el 2004 donde desarrolló su proyecto de tesis de licenciatura titulado: Transcripción y expresión de HSP-20 y RAP-1a en las fases sexuales y en los quinetos de *Babesia bigemina*, que además de servirle para obtener el grado de Ingeniero de Producción Animal, fue mérito para obtener mención honorífica durante la defensa de su tesis en el 2005. En el siguiente año ingresó al Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la FMVZ de la UNAM y realizó su proyecto de investigación en las instalaciones de INIFAP. Durante toda su formación en el área de investigación, el Dr Juan Joel Mosqueda Gualito fungió como su tutor y es de quien aprendió gran parte de los conocimientos que ahora posee. La temporada que permaneció en INIFAP y con los trabajos que desarrollo le permitió conocer gente de renombre a nivel nacional e internacional, además de participar como ponente en distintos congresos nacionales e internacionales.

RESUMEN.

Discriminación de poblaciones de *Babesia bigemina* mediante sistemas de marcadores moleculares.

Babesia bigemina es agente causal de la babesiosis bovina en México donde causa pérdidas económicas a la ganadería y en la actualidad no existen metodologías moleculares que permitan discriminar entre poblaciones de esta especie. Una estrategia de control de la babesiosis es diferenciar cepas usadas en las vacunas de aquellas usadas en desafíos o de los propios aislados de campo. El objetivo general es discriminar aislados mexicanos de *Babesia bigemina* utilizando técnicas de biología molecular basadas en la secuencia del gen *sbp-1*. En este trabajo se analizaron diez poblaciones de parásitos; 8 obtenidos de casos clínicos y dos cepas, una vacunal y una de desafío. Se realizó extracción de ADN de las 10 muestras a partir de eritrocitos infectados y se amplificó el gen *sbp-1*. Se realizó la clonación molecular del gen, posteriormente se secuenció y con la secuencia del gen se realizaron alineamientos múltiples, se analizó la presencia de secuencias repetidas en tándem y se obtuvo la secuencia de la proteína predicha. El alineamiento múltiple se utilizó para identificar el polimorfismo presente entre las secuencias obtenidas. Con el polimorfismo identificado, se diseñaron iniciadores específicos para la amplificación de la región variable del gen, lo que sirvió para diferenciar entre las distintas poblaciones de parásitos. La información generada en este trabajo permite proponer a este gen de *B. bigemina* como un marcador molecular para discriminar poblaciones de parásitos mediante técnicas moleculares. Proyecto financiado por: INCO, proyecto 003691.

Palabras clave: *Babesia bigemina*, Polimorfismo, marcadores moleculares.

Abstract

Discrimination of *Babesia bigemina* populations by molecular markers.

Babesia bigemina is a causative agent of bovine babesiosis in Mexico, where it affects the cattle industry. Molecular methodologies able to distinguish between isolates of this species are not available. A control strategy for this disease would be to identify strains used in vaccines from virulent strains and field isolates. The aim of this work was to discriminate *Babesia bigemina* Mexican isolates by molecular biology techniques based on the sequence of the *sbp-1* gen. Ten parasite populations were analyzed in this work: eight isolates were from clinical cases, one vaccinal strain and one virulent strain. DNA of ten parasite population were extracted from infected erythrocytes and the *sbp-1* gen was amplified with specific primers and cycling conditions. The resulting amplicons were cloned and sequenced. The sequences were used for homology comparisons; analyses to detect the presence of tandem repeats; and for analyses of the predicted amino acid sequence. The alignment was also used for the identification of polymorphism between the sequences. Once the variant regions of the gen were detected, specific primers were designed to discriminate each parasite population. With the information generated in this work we propose the *Babesia bigemina sbp-1* gen as a molecular marker to discriminate parasite populations. Project financed by: INCO, project 003691.

Key Words: *Babesia bigemina*, Polymorphism, molecular marker.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
Aspectos generales de la babesiosis bovina	1
Definición.....	1
Distribución de la enfermedad.....	1
Taxonomía.....	2
Signología.....	2
Ciclo de vida del parásito	3
En la garrapata vector.....	3
En el hospedero bovino.....	4
Control de la enfermedad	4
Vacunación.....	5
Diagnóstico.....	6
Diagnóstico directo.....	6
Diagnóstico Indirecto.....	7
Marcadores Moleculares	8
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	8
Enzimas de restricción.....	9
Electroforesis en gel.....	10
Hibridación.....	10
Secuenciación.....	11
Marcadores moleculares en microorganismos	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
JUSTIFICACIÓN	16
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	18
MATERIAL Y MÉTODOS	19
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	58
BIBLIOGRAFÍA	67

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Situación de la campaña contra la garrapata <i>Boophilus</i> spp en el 2007 en México.....	2
Figura 2. Esquema del gen <i>sbp-1</i> de <i>Babesia bigemina</i>	14
Figura 3. Protocolo de ciclado para la prueba de RT-PCR.....	25
Figura 4. Protocolo de ciclado utilizado para la prueba de PCR.....	27
Figura 5. Alineamiento de los primers en el Vector TOPO con la secuencia del gen <i>sbp-1</i> insertado.....	29
Figura 6. El gen <i>sbp-1</i> de <i>Babesia bigemina</i> se transcribe en estadios intraeritrocíticos.....	34
Figura 7. Amplificación del gen <i>sbp-1</i> en un aislado mexicano.....	34
Figura 8. Análisis de la clonación molecular del gen <i>sbp-1</i> del aislado Tepatitlán.....	36
Figura 9. Alineamiento múltiple de las secuencias del gen <i>sbp-1</i> de aislados mexicanos de <i>Babesia bigemina</i>	45
Figura 10. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína predicha SBP-1 de <i>Babesia bigemina</i>	52
Figura 11 Amplificación de la región variable del gen <i>sbp-1</i> en diez poblaciones de <i>Babesia bigemina</i>	56

LISTA DE CUADROS.

Cuadro 1. Aislados utilizados para evaluar la variación del gen <i>sbp-1</i> de <i>Babesia bigemina</i>	22
Cuadro 2. Iniciadores utilizados para analizar el gen <i>sbp-1</i> de <i>Babesia bigemina</i>	23
Cuadro 3. Protocolo utilizado para la prueba de RT-PCR.....	24
Cuadro 4. Protocolo utilizado para la prueba de PCR.....	26
Cuadro 5. Características de <i>sbp-1</i> en 10 poblaciones de parásitos.....	39
Cuadro 6. Número de repetidos presentes en las secuencias del gen <i>sbp-1</i>	46
Cuadro 7. Secuencias de los distintos repetidos identificados en las secuencias del gen <i>sbp-1</i> de <i>Babesia bigemina</i> en las poblaciones de parásitos mexicanos....	47
Cuadro 8. Arreglo de repetidos de las secuencias del gen <i>sbp-1</i> de las distintas poblaciones de parásitos mexicanos.....	48
Cuadro 9. Longitud de la proteína SBP-1 en 10 poblaciones de parásitos de <i>Babesia bigemina</i>	49
Cuadro 10. Secuencias de los distintos repetidos identificados en las secuencias de la proteína SBP-1 de <i>Babesia bigemina</i> en las poblaciones de parásitos mexicanos.....	53
Cuadro 11. Arreglo de repetidos de las secuencias de la proteína SBP-1 de las distintas poblaciones de parásitos mexicanos.....	53
Cuadro 12. Fragmento amplificado con los primers que flanquean la región variable del gen <i>sbp-1</i> de <i>Babesia bigemina</i>	55

INTRODUCCIÓN.

Aspectos generales de la babesiosis bovina.

Definición.

La babesiosis bovina es una enfermedad causada por protozoarios intraeritrocíticos del género *Babesia* que es transmitida por garrapatas del género *Boophilus*. Afecta a los animales provocando incremento en la temperatura corporal, disminución del volumen celular aglomerado, anorexia, anemia hemolítica, hemoglobinuria y la muerte (McCosker 1981).

Distribución de la enfermedad.

En el mundo se han identificado 71 especies de *Babesia* (Levine 1971). Las especies de *Babesia* que afectan a bovinos son: *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens*, *B. major*, *B. ovata* y *B. occultans* (Bock *et al.* 2004). En México, la enfermedad es provocada por las especies *B. bovis* y *B. bigemina* y son las que generan mayores pérdidas económicas en la industria ganadera a nivel mundial (Solis 1991).

La babesiosis bovina tiene una amplia distribución que abarca a las regiones tropicales y subtropicales que reúnen las condiciones ideales para el establecimiento de la garrapata vector, factor indispensable para la presencia de la enfermedad. Siendo así, la babesiosis bovina se encuentra distribuida en Asia, África, Australia, América central y América del Sur (Bock *et al.* 2004).

En México, la enfermedad se distribuye en los litorales del golfo de México y Océano Pacífico y en la zona Sur del país donde se encuentra la fase de control de la garrapata *Boophilus* spp (Figura 1). Con base en la distribución de la garrapata vector, se ha estimado que en México el 70% de la población bovina se localiza en zonas endémicas (SAGARPA 2007), donde genera problemas que se encuentran asociados a la baja en los rendimientos productivos, el gasto en el tratamiento de los animales enfermos y la muerte de los mismos (Solorio-Rivera 1997a).

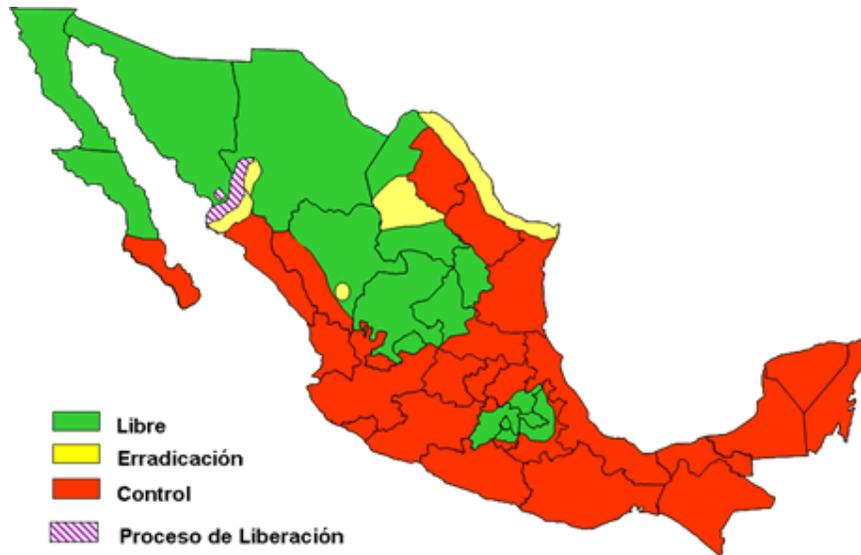


Figura 1. Situación de la campaña contra la garrapata *Boophilus* spp en el 2007 en México. Se muestran las regiones donde se distribuye la garrapata *Boophilus micropuls* y *B. annulatus* en México. Fuente: SAGARPA 2007.

Taxonomía.

Levine *et al.* (1980), clasificaron al agente causal de babesiosis de la siguiente manera:

- Reino: *Protista*
- Subreino: *Protozoa*
- Phylum: *Apicomplexa*
- Clase: *Sporozoa*
- Subclase: *Piroplamia*
- Orden: *Piroplasmida*
- Familia: *Babesiidae*
- Género: *Babesia*

Signología

La babesiosis bovina se puede manifestar con un rango variado de signos en los animales infectados, debido a la variabilidad que existe en la virulencia del parásito dentro de cada especie (Wright 1981).

Babesia bovis se caracteriza por provocar un aumento en la temperatura corporal del bovino a valores de 41° a 41.5°C, temblores musculares, incoordinación y signos nerviosos. Los animales afectados muestran pérdida de peso corporal, deshidratación, anemia, anorexia, hemoglobinuria y muerte súbita en casos severos (Purnell 1981 y Young, Morzaria 1986).

La enfermedad causada por *Babesia bigemina* se caracteriza por altas parasitemias lo que resulta en anemia hemolítica y hemoglobinuria; se observa disminución del volumen celular aglomerado por la ruptura de los eritrocitos; sin embargo, a diferencia de lo que se observa con *Babesia bovis*, la fiebre no es un signo indicativo de la infección. En ocasiones la enfermedad se desarrolla rápidamente provocando anemia hemolítica severa, ictericia y la muerte (Purnell 1981 y Wright 1981).

Ciclo de vida del parásito.

El ciclo de vida del parásito presenta una fase de reproducción sexual en la garrapata vector y una fase de multiplicación asexual en el hospedero bovino.

En la garrapata vector.

La garrapata ingiere los parásitos al alimentarse sobre un bovino infectado (Howell *et al.* 2007). Los cambios en temperatura, tensión de oxígeno y algunos factores presentes en el intestino de la garrapata inducen el desarrollo de los gametos (Weber, Friedhoff 1977). Posterior a la formación de los gametos, se desarrollan los cigotos (Mehlhorn, Schein 1984) que invaden las células del epitelio intestinal de la garrapata donde dan origen a formas móviles denominadas quinetos (Friedhoff 1990). Los quinetos se liberan a la hemolinfa de la garrapata donde migran a diversos órganos, entre ellos a los ovarios donde infectarán a los óvulos y es cuando se lleva a cabo la transmisión vertical, así, cuando se realiza la ovoposición, la progenie se encuentra infectada. Cuando las larvas eclosionan, los quinetos migran a las glándulas salivales donde se transforman en esporontes que darán lugar a los esporozoitos. La transmisión de *Babesia* al hospedero bovino ocurre cuando

los esporozoitos son inoculados junto con la saliva de la garrapata cuando ésta se alimenta de sangre (Friedhoff 1990 y Balashov 1968).

En el hospedero bovino.

Los esporozoitos (al igual que los merozoitos) son estadios del parásito de cuerpo periforme que se conforman de una doble membrana, núcleo, mitocondrias anillos polares anteriores y posteriores, roptrías y micronemas en la región polar anterior, microtúbulos y un cuerpo esférico localizado en la porción anterior del parásito (Potgieter Els 1977 y Potgieter *et al.* 1976). Una vez que los esporozoitos han sido transmitidos al bovino, entran al torrente sanguíneo e invaden a los eritrocitos. El proceso de invasión por el esporozoito/merozoito hacia el eritrocito ocurre de manera similar en otras apicomplexas, y consiste en la unión al eritrocito, la reorientación del parásito favoreciendo la interacción de la región anterior, formación de vacuola parasitófora e internalización en el eritrocito (Bannister, Mitchell 2003). A diferencia de otros microorganismos apicomplexos, en el caso de *Babesia* la vacuola parasitófora se pierde después del establecimiento del parásito en el eritrocito (Sam-Yellowe 1996). Dentro del eritrocito se desarrolla el siguiente estadio denominado trofozoito. En este nuevo estadio no es posible identificar roptrías ni cuerpos esféricos, los micronemas se reducen en número y tamaño y los anillos polares desaparecen (Potgieter, Els 1977). El trofozoito da lugar a dos nuevos merozoitos mediante fisión binaria, los nuevos merozoitos se separan y rompen al eritrocito para invadir otras células que no estén infectadas (Potgieter, Els 1977). Esta reproducción se realiza en el bovino hasta que otra garrapata ingiera los eritrocitos parasitados y así continuar con el ciclo (Callow 1968 y Friedhoff 1988).

Control de la enfermedad.

La babesiosis bovina es una de las principales enfermedades transmitidas por garrapatas que genera pérdidas económicas a nivel mundial. Esto ha permitido que se desarrollen numerosas investigaciones para el control

de la enfermedad ya sea en con el uso de vacunas o con el diagnóstico oportuno de la enfermedad.

Vacunación.

La vacunación se considera una herramienta importante para el control de la babesiosis bovina. Por tal motivo se han desarrollado diversas metodologías que han permitido la obtención de organismos vivos atenuados para su uso como agente vacunal en diversas partes del mundo (Bishop, Adams 1974, Alonso *et al.* 1994) además de la estandarización de un método de cultivo continuo *in vitro* de las distintas especies de *Babesia* (Levy, Ristic 1980 y Vega *et al.* 1985).

El uso de organismos vivos atenuados en la vacunación ha mostrado ser una estrategia confiable en el control de la babesiosis (Toro *et al.* 1990, Cantó *et al.* 2003 y Álvarez *et al.* 2004), ya que confiere protección ante desafíos desafiaron en condiciones de campo. Existen dos grandes limitantes con el uso de poblaciones vivas de parásitos como inmunógenos: la posibilidad de transmitir enfermedades con la sangre inoculada y el riesgo de que los mismos parásitos sean los que generen la enfermedad.

Algunos casos referentes a fallas en la vacunación, son los reportados en Australia de los años 70 a los años 90 (Dalglish, Stewart 1977 y Bock *et al.* 1992) y los reportados en África en los años 90 (Lawrence *et al.* 1993), entre otros. Esto generó dudas sobre la causa de la enfermedad; es decir si la causa era la población vacunal, o bien, si los brotes estaban siendo provocados por una población distinta de parásitos.

Se generó una problemática a raíz del uso de organismos vivos como agentes vacunales. Esto dio lugar al desarrollo de una vacuna recombinante para desafíos heterólogos (Bock *et al.* 2004) y así evitar el uso de inmunógenos vivos y los problemas que éstos pueden causar (Schetters, Montenegro-James 1995 y Brown, Palmer 1999). Dentro de los antígenos descritos en *Babesia bovis* de estadios que se desarrollan en el hospedero bovino se encuentra una proteína de 77-80 kDa (Bv80) llamada Proteína de Cuerpos Esféricos 1 (SBP-1) que tiene una localización en los organelos denominados cuerpos esféricos

equivalentes a los gránulos densos de otros géneros apicomplexos. Cuando la proteína se utilizó para inmunizar bovinos, mostró protección parcial a los desafíos (Hines *et al.* 1995). Otras proteínas que mostraron conferir protección contra desafíos son: una proteína rica en cisteína denominada 12D3 que se sugiere es de secreción, ya que se localiza en el extremo apical del merozoito y en el citoplasma de los eritrocitos infectados (Harper 1996); la proteína 1 asociada a las roptrías (RAP, por sus siglas en inglés rhoptry associate protein) de 60 kDa de secreción, que ha mostrado inducir en bovinos células T de memoria, neutralización de la invasión *in vitro* de parásitos a eritrocitos por medio de anticuerpos y protección parcial en bovinos inmunizados con la proteína recombinante (Rodríguez *et al.* 1996, McElwain *et al.* 1991 y Brown *et al.* 2006) y un antígeno de alto peso molecular nombrado 11C5 que logró inducir protección a bovinos inoculados con esta proteína recombinante (East *et al.* 1997). Se han analizado una gran variedad de antígenos que ha mostrado protección en los bovinos contra el parásito; sin embargo, parece ser que el uso de múltiples antígenos en una vacuna es la propuesta más viable para el control de la enfermedad mediante el uso de vacunas recombinantes (Brown *et al.* 2006, Brown, Palmer 1999 y Wright *et al.* 1992).

Diagnóstico.

El control de la enfermedad mediante un diagnóstico oportuno es una estrategia importante para disminuir el número de casos fatales provocados por la babesiosis y así disminuir las pérdidas ocasionadas por el parásito (Böse *et al.* 1995 y Homer *et al.* 2000). Los métodos para el diagnóstico de la babesiosis consisten en la identificación directa del parásito o bien mediante el diagnóstico serológico indirecto.

Diagnóstico directo.

El diagnóstico directo realizado por frotis sanguíneo teñido con Giemsa permite la demostración morfológica del parásito, es posible realizar diferenciación entre especies y la sensibilidad del examen de frotis sanguíneo es de un eritrocito infectado en 1×10^5 - 10^6 , sin embargo, se requiere de un

entrenamiento especializado y cuando existen parasitemias muy bajas resulta complicado diferenciar entre algunas especies como *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* (Böse *et al.* 1995).

El diagnóstico por medio de la reacción en cadena de la polimerasa resulta un método de diagnóstico directo de alta sensibilidad, logrando detectar parasitemias de 1×10^{-9} (Figuroa *et al.* 1992), siendo 100 veces más sensible que el análisis por frotis sanguíneo. La técnica consiste en amplificar una secuencia de DNA específica localizada dentro del genoma del organismo a evaluar, para obtener un producto fácilmente detectable (Böse *et al.* 1995). Esto favorece la especificidad de la técnica lo cual permite hacer un diagnóstico diferencial confiable.

Diagnóstico Indirecto.

Los métodos indirectos que se encuentran basados en la detección de anticuerpos contra *Babesia* spp, se han convertido en pruebas de rutina para el diagnóstico de la enfermedad, siendo la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo inmuno enzimático (ELISA), las más utilizadas para la detección de las especies *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* por mencionar algunas (Böse *et al.* 1995).

La prueba IFI se basa en detectar anticuerpos que se unen a sus moléculas blanco en células o tejido, utilizando anticuerpos que reaccionan contra inmunoglobulinas y que se encuentran marcadas con moléculas que emiten una señal capaz de ser detectada con equipos específicos. La reacción se analiza por observación en microscopio de fluorescencia (Janeway *et al.* 1999). El costo de la prueba es bajo y el material y los reactivos se encuentran disponibles o pueden ser producidos. La principal desventaja es que es una técnica que requiere un arduo trabajo para emitir el resultado y es subjetivo al criterio del analizador lo que hace de la estandarización un proceso difícil. La utilización de antígeno obtenido de bovinos infectados con una sola de las especie del parásitos, o bien del cultivo *in vitro* de las especies, permite que la prueba sea altamente específica.

La prueba de ELISA se basa en la detección de anticuerpos mediante el uso de anti-anticuerpos unidos químicamente a una enzima. El resultado es obtenido mediante lectores especializados, lo que brinda datos que se evalúan por métodos numéricos. La cantidad de muestras que pueden ser analizadas por esta técnica es mayor. En la actualidad, la técnica se basa en el uso de antígeno obtenido de manera recombinante como sustrato. La proteína asociada a las roptrías 1 de *Babesia bovis* y de *Babesia bigemina* presenta una región conservada de 300 aminoácidos en la región amino terminal, sin embargo, en ambas especies se observa variabilidad en el extremo carboxilo, región utilizada para desarrollar la prueba de ELISA (Boonchit *et al.* 2004 y Boonchit *et al.* 2006).

En la actualidad se buscan técnicas que tengan alta sensibilidad y especificidad y que además sean rápidas. La prueba de inmunocromatografía se desarrollo como una alternativa que permite diagnosticar de manera específica a las especies de mayor importancia económica en el mundo, las especies *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* (Chulmin *et al.* 2007).

Marcadores moleculares.

Los marcadores moleculares de ADN son simplemente un punto de referencia en un cromosoma que puede o no corresponder a un gen. En la actualidad existen técnicas biomoleculares con alta sensibilidad que permiten detectar variabilidad entre secuencias de ADN. Dentro de las técnicas más empleadas se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa PCR (Por sus siglas en ingles, Polymerase Chain Reaction), las enzimas de restricción, la separación de fragmentos por electroforesis, la hibridación y la secuenciación (Picca *et al* 2004).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Es una técnica utilizada para el diagnóstico que se fundamenta en la amplificación de una secuencia específica de ADN con el uso de iniciadores que servirán para delimitar la secuencia a amplificar. El uso de una polimerasa

que es termoestable y dependiente de ADN, sirve para facilitar la amplificación de los fragmentos ya que soporta las condiciones de ciclado que se requieren para la amplificación, es decir, la desnaturalización del ADN, la temperatura de alineamiento de los iniciadores y, posteriormente, la elongación catalizada por la enzima. Este proceso repetido 30 veces o más permite obtener un solo fragmento de tamaño esperado al flanqueo de los iniciadores (Mathews *et al.* 2005). Esta técnica se ha utilizado para identificar alelos mediante la detección de mutaciones y por medio de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP; Single Nucleotide Polymorphism) que se encuentren asociados a un genotipo en particular. El diseño de estrategias aplicadas al uso de variantes de la PCR como el PCR-Asociado a un Sistema de Amplificación Refractora por Mutación (ARMS por sus siglas en inglés PCR-Amplification Refractory Mutation System) sirve para diferenciar entre genotipos. La técnica se fundamenta en que un mal apareamiento entre el nucleótido 3' de alguno de los iniciadores para la PCR, y la temperatura adecuada, reduce o impide la amplificación realizada por la *Taq* polimerasa. Otra variante que se utiliza para identificar polimorfismo entre alelos es la PCR denominada oligonucleótido específico de alelo (ASO Allele-Specific Oligonucleotide). Esta prueba consiste en identificar mutaciones o SNP mediante hibridación con oligonucleótidos que contengan la variación. La presencia de nucleótidos mal apareados por parte de los oligonucleótidos con sus secuencias blanco de DNA desestabilizan la hibridación lo que favorece que puedan ser removidos bajo condiciones astringentes (Waye, Eng, 2005).

Enzimas de restricción.

El uso de las enzimas de restricción que cortan el ADN en una secuencia específica de nucleótidos se convirtió en una tecnología que sirvió para el desarrollo de diversas metodologías. Los sitios de corte han sido utilizados como marcadores para obtener un mapa físico y específico de ADN, en la obtención de fragmentos específicos de ADN mediante cortes con enzimas de restricción que hacen posible la posterior clonación molecular, y los fragmentos generados por estas enzimas son la base para una variedad de

metodologías que hoy en día son empleadas en la biología molecular (Struhl 2003).

Las enzimas de restricción se han combinado con otras técnicas para ser utilizadas en la comparación de secuencias. Los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés: Restriction Fragment Length Polymorphisms) es una técnica utilizada para identificar cambios que van desde un solo nucleótido entre dos secuencias, siempre y cuando, con la variación obtenida se genere un sitio de restricción que permita diferenciar entre ellas.

Electroforesis en gel.

La electroforesis en gel es una metodología simple y altamente efectiva para realizar la separación, identificación y purificación de fragmentos de DNA. La metodología consiste en preparar un gel a partir de un polímero (agarosa o poliacrilamida) a una concentración apropiada de acuerdo al tamaño del fragmento a separar, la muestra de DNA es colocada en un pozo colector y el gel es sometido a un voltaje por un periodo que permita obtener una separación óptima. La manera de observar los fragmentos de DNA, es mediante el uso de tinciones intercalantes como el bromuro de etidio, que al interaccionar con el DNA y posteriormente ser expuesto a luz UV, emite una fluorescencia que se puede observar (Voytas 2003). Con la electroforesis es posible separar fragmentos que van de los 10 pb a varios miles de kilobases, siendo posible identificar diferencias de hasta poco menos de 10 bases entre secuencias.

Hibridación.

La técnica de hibridación consiste en utilizar una sonda marcada que servirá para identificar secuencias que sean homólogas ya sea en un tejido (hibridación *in situ*) o a partir de una muestra de ADN de un microorganismo. Esta técnica permite diferenciar entre secuencias de organismos por la hibridación homóloga entre el ADN, ya que un mal apareamiento entre bases

provoca una desestabilización entre las secuencias siendo posible su separación por medios astringentes (Mathews *et al.* 2005).

Secuenciación.

La secuenciación del DNA es una técnica que determina el arreglo que tiene una cadena de nucleótidos. El procedimiento más empleado es con el uso de dideoxirribonucleótidos, los cuales permiten determinar la secuencia de nucleótidos que comprenden a una cadena por que al irse incorporando éstos durante la elongación del ADN durante una reacción de PCR, el proceso se suprime por la carencia del radical –OH en el extremo 3' del azúcar. Este proceso permite identificar el arreglo de nucleótidos que presenta una secuencia ya sea por electroforesis en gel o mediante el marcaje de los dideoxirribonucleótidos y posteriormente, identificando el arreglo de los nucleótidos con el uso de equipos automatizados mediante detectores que identificaran las secuencias. La secuenciación es el procedimiento más confiable que permite identificar el polimorfismo que existe entre secuencias, además que permite realizar una comparación entre las mismas secuencias. La secuenciación además permite determinar la variación precisa que se presenta entre distintos alelos. Una variante de la secuenciación es la pirosecuenciación, la cual se ha empleado para identificar variaciones de un solo nucleótido entre distintos alelos, esto con la finalidad de identificar mutaciones en diagnósticos médicos, así como en estudios de farmacogenómica (Wolford, Yeatts 2005)

Marcadores moleculares en microorganismos.

Los marcadores moleculares han servido para identificar variaciones entre secuencias de microorganismos, donde el uso de genes que presentan polimorfismos, permiten realizar diferenciación y además de brindar información sobre la diversidad que existe entre géneros y especies.

El gen de la proteína principal de superficie 1a (por sus siglas en ingles *msp1a*) identificado en *Anaplasma marginale*, sirvió para evaluar 131 aislados obtenidos de América del norte y del sur, Europa, Asia, África y Australia. Dentro de la secuencia de *msp1a* se identificó una región de repeticiones en

tándem, y cuando se compararon secuencias obtenidas de los distintos aislados, se demostró la variabilidad que existe entre ellos. Esta región demostró la diversidad genética que existe entre los distintos aislados ya que se lograron identificar 79 patrones de repeticiones (de la Fuente *et al.* 2007). Con los resultados obtenidos en dicho estudio, fue posible realizar estudios filogeográficos de los aislados.

A lo largo de la secuencia del genoma de *Plasmodium falciparum* son muy abundantes las secuencias repetidas. Esto permitió que diversas metodologías se adaptaran para el desarrollo de marcadores moleculares que permitieran realizar estudios genéticos. El uso del PCR y de iniciadores que flanquean las secuencias repetidas fueron factores suficientes para poder diferenciar entre aislados. (Ferdig, Su 2000, Li *et al.* 2007 y Mlambo *et al.* 2007).

El análisis comparativo de secuencias repetidas presentes en el genoma de *Plasmodium falciparum* sirvió como modelo para realizar estudios en especies del mismo género como *Plasmodium malariae* donde el uso de minisatélites ha permitido identificar individuos con infección que presentan desde un solo genotipo, hasta individuos donde se identificaron 4 genotipos distintos. Esto ha permitido obtener datos que se han utilizado para realizar estudios epidemiológicos de la enfermedad (Bruce *et al.* 2007).

En *Theileria annulata* el uso de RFLP's ha servido para diferenciar entre poblaciones de parásitos. El uso de los distintos patrones obtenidos con el uso de las enzimas de restricción permitió identificar distintos genotipos a partir de distintas poblaciones de parásitos obtenidas de una región donde la enfermedad es endémica (Taylor *et al.* 2002). Sin embargo, recientemente se han realizado estudios en *Theileria annulata* donde se analizaron patrones de secuencias de repetidos en tandeo, los cuales han permitido identificar distintos genotipos dentro de las poblaciones de parásitos. El uso de la amplificación de las secuencias de repetidos mediante iniciadores específicos y el uso de la PCR han sido la estrategia que permitió identificar a distintas poblaciones de parásitos (Weir *et al.* 2007).

En *Babesia bovis* se han descrito los cuerpos esféricos como organelos que junto con los micronemas y las roptrías, forman parte del complejo apical de la *Babesia* (Potgieter, Els 1977). Las proteínas de los cuerpos esféricos, junto con otras proteínas de interacción con la membrana del eritrocito liberadas por micronemas y roptrías, se han descrito como componentes asociados a la infección y establecimiento del parásito con el eritrocito (Hines *et al.* 1995 y Ruef *et al.* 2000). Dentro de la familia de las proteínas de los cuerpos esféricos que se han caracterizado en *Babesia bovis*, se encuentra la SBP-1 (por sus siglas en inglés Spherical Body Protein), la cual se identificó como una proteína inmunodominante de 77 kDa que estimula la activación de células T (Tetzlaff *et al.* 1992). Anticuerpos específicos generados contra SBP-1 interaccionan con la membrana interna de eritrocitos infectados, no así con parásitos intactos que aun no han infectado a su célula blanco, lo que implicaría una función en el establecimiento de *Babesia* dentro del eritrocito. Los anticuerpos generados contra SBP-1 de parásitos de una cepa, reconocen SBP-1 de parásitos de cepas de distintas zonas geográficas (Hines *et al.* 1995). Sin embargo, cuando se analizan las secuencias del gen *sbp-1* entre cepas mexicanas y australianas, se identifican regiones con polimorfismo. En estudios realizados en *Babesia bovis* utilizando las regiones con polimorfismo del gen *sbp-1* de distintas cepas, Lew *et al.* (1997) identificaron diversos genotipos que utilizaron para diferenciar entre poblaciones de parásitos. La identificación de los distintos aislados fue realizada con iniciadores específicos de la región variable del gen *sbp-1* de *B. bovis* por PCR.

El genoma completo de *Babesia bigemina* que ha sido secuenciado y publicado de manera electrónica (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/b_bigemina), permitió que se realizaran diferentes investigaciones en la búsqueda de nuevos genes. Mosqueda *et al.*, en 2006 compararon la secuencia que codifica a la proteína de los cuerpos esféricos 1 de *Babesia bovis* (Genbank No de Acceso AY727909) e identificaron una secuencia con marco abierto de lectura (ORF por sus siglas en inglés Open Reading Frame) en el genoma de *Babesia bigemina* que mostró un 57% de identidad. Se realizó la identificación del orf a partir del contig de *Babesia*

bigemina y la secuencia se empleó para el diseño de iniciadores específicos para amplificar el gen. Un par de iniciadores alinean fuera del ORF (*sbp-1aF*, *sbp-1aR*) y un tercer iniciador (*sbp-1 intR*) que alinea en la región interna del ORF (figura 2.) Esta información les permitió identificar una secuencia que era homóloga al gen *sbp-1* de *Babesia bovis* en el parásito *Babesia bigemina*.

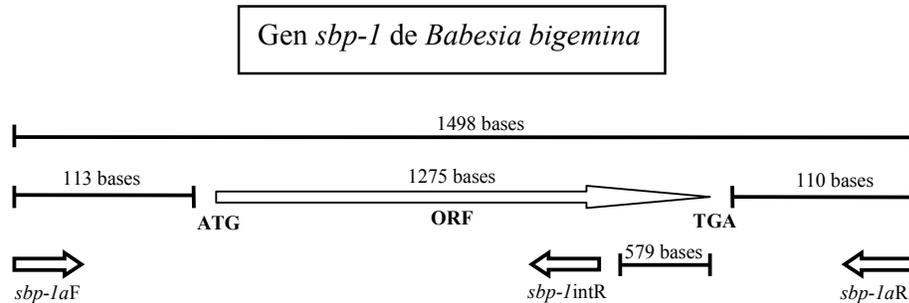


Figura 2. Esquema del gen *sbp-1* de *Babesia bigemina*. La barra superior muestra la longitud total de amplificación con los iniciadores *sbp-1aF* y *sbp-1aR* que es de 1498 pb, La flecha indica el ORF del gen de 1275 bases y las barras aledañas a la flecha, indican la distancia de que hay de los iniciadores al ORF. El *sbp-1aF* alinea de -113 a -91 pares de bases con respecto al gen y *sbp-1aR* de 90 a 110 bases después del gen. El iniciador *sbp-1 intR* se encuentra 579 bases antes del final del gen y alinea de la posición +672 a la +696.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La babesiosis bovina provoca pérdidas millonarias a la ganadería mexicana y limita el desarrollo del sector pecuario ya que impide que animales de alto valor genético, que provienen de regiones libres de la enfermedad, sean introducidos a regiones donde la enfermedad es endémica. Por lo tanto, es de vital importancia desarrollar y mejorar las estrategias de control de la enfermedad que favorezcan el desarrollo de la ganadería. Se han descrito métodos para el control de la enfermedad como la vacunación con organismos vivos atenuados (Cantó *et al.* 2003, Álvarez *et al.* 2004 y Benavides *et al.* 2000) y mediante el diagnóstico de la enfermedad por métodos serológicos como la Inmunofluorescencia indirecta o mediante la identificación del parásito mediante la PCR (Homer *et al.* 2000). En la actualidad no existen métodos moleculares que permitan discriminar poblaciones de *Babesia bigemina* genéticamente distintas. Estrategias útiles que permitan discriminar e identificar poblaciones de parásitos, son necesarias para poder identificar a la población causante de un brote de enfermedad, o para diferenciar entre cepas en estudios experimentales.

Hoy en día, la vacunación es una herramienta importante para el control de la enfermedad (Toro *et al.* 1990). Métodos desarrollados para identificar distintas poblaciones de parásitos son necesarios en estudios de vacunación, ya que permitirán diferenciar tanto la población de parásitos vacunal como la de desafío y así identificar a la población de parásitos que está causando la enfermedad. El control mediante un diagnóstico oportuno es una estrategia recomendada para disminuir riesgos por brotes de la enfermedad en una unidad de producción en las regiones endémicas (Solorio-Rivera, Rodríguez-Vivas 1997b). A la fecha, diversas técnicas son empleadas para el diagnóstico de la babesiosis bovina, lo que ha permitido identificar al parásito de manera directa o indirecta. A pesar del gran avance que existe en el diagnóstico, no se han logrado estudiar aspectos epidemiológicos de las poblaciones del parásito ya que las herramientas utilizadas para el diagnóstico en la actualidad, no permiten identificar entre distintas poblaciones que afectan a los bovinos.

JUSTIFICACIÓN.

La babesiosis bovina es una enfermedad endémica de México donde es causante de pérdidas económicas. A pesar del gran avance que existe en el diagnóstico de la enfermedad, no hay técnicas moleculares capaces de identificar y discriminar entre poblaciones de *Babesia bigemina*.

Los estudios realizados en *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* se han basado en identificar antígenos considerados como candidatos vacunales y gracias a ello se han caracterizado diversos genes. En la actualidad existe una gran diversidad de antígenos que se consideran prospectos para ser incluidos en el diseño de una vacuna recombinante. De los antígenos propuestos en *B. bovis* se encuentran las proteínas de choque térmico (HSP) 20, 70 y 90, la proteína asociada a las roptrías (RAP) 1 y la proteína de los cuerpos esféricos (SBP) 1 y de los identificados en *Babesia bigemina* se propone a la familia multigénica de RAP-1 y las glicoproteínas GP45 y GP55 por mencionar algunos (Brown, Palmer 1999 y Brown *et al* 2006). La importancia de identificar candidatos vacunales es que favorece la identificación de secuencias que son conservadas entre aislados de distintas zonas geográficas.

En experimentos donde se evaluó el gen *sbp-1* de *Babesia bovis* en una población de microorganismo a través de pases en bovinos y en garrapatas mostró que no existía variación en su secuencia (Lew *et al.* 1997b, Bock *et al.* 2000), lo cual indica que *sbp-1* es un gen que no varía rápidamente durante la multiplicación sexual y asexual del parásito y por lo tanto puede considerarse como un marcador estable. Todo esto hace al gen *sbp-1* un candidato a utilizarse como marcador molecular para la discriminación entre cepas.

A la fecha, genes homólogos a los que codifican las proteínas de los cuerpos esféricos en *Babesia bigemina* no han sido identificados, sin embargo en esta especie ya se han identificado distintos organelos, incluidos los cuerpos esféricos (Potgieter, Els 1977), lo cual sugiere la presencia de las proteínas de los cuerpos esféricos y de los genes que las codifican. En estudios realizados en el laboratorio de babesiosis bovina del CENID-PAVET del INIFAP por Mosqueda *et al.* (2006) utilizando la secuencia del gen que codifica la proteína

de los cuerpos esféricos 1 de *Babesia bovis*, hicieron un análisis BLAST con la secuencia del genoma completo de *Babesia bigemina* recientemente publicada sin anotaciones (http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_bigemina). Se identificó una secuencia de DNA en *Babesia bigemina* con características de marco abierto de lectura que presentó homología con el gen *sbp-1* de *Babesia bovis*. Con la secuencia del marco abierto de lectura obtenido se diseñaron iniciadores específicos que se utilizaron para amplificar los fragmentos tanto de DNA como de cDNA de una cepa mexicana de *Babesia bigemina*. La amplificación y secuenciación exitosa del gen homólogo a *sbp-1* de *B. bigemina* propone a este gen como marcador molecular para la tipificación de poblaciones de parásitos de *Babesia bigemina*; si este gen presenta polimorfismo a nivel de DNA en distintos aislados, será posible utilizarlo para la discriminación entre poblaciones de parásitos utilizando técnicas de biología molecular.

HIPÓTESIS

El gen *sbp-1* de *Babesia bigemina* presenta polimorfismo que puede utilizarse para la discriminación de aislados mexicanos.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del trabajo es discriminar aislados mexicanos de *Babesia bigemina* utilizando técnicas de biología molecular basadas en la secuencia que codifica al gen *sbp-1*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los tres objetivos específicos son:

Amplificar, clonar y secuenciar el gen *sbp-1* de DNA de 10 aislados mexicanos de *Babesia bigemina*.

Analizar las secuencias del gen *sbp-1* de *Babesia bigemina* e identificar el polimorfismo entre los 10 aislados mexicanos.

Amplificar por PCR la región variable de *sbp-1* para discriminar los aislados mexicanos de *Babesia bigemina*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Lista de equipo.

- Campanada Flujo Laminar. Marca: Termo Electron Corporation. Modelo 1286 Forma Class II, A2.
- Campana de extracción. Marca: Sola SB Cat No. 650-148.
- Microcentrífuga Marca: Jouan. Modelo: BR4i
- Incubadora con CO₂. Marca Lab-line. A temperatura de 37°C.
- Agitador automático. Marca: Lab-line. A temperatura de 37°C.
- Termociclador. Marca: BioRad. Modelo: iCycler
- Fotodocumentador. Marca: Vilber Lourmat Modelo: Chemi-smart 2026M. WL.

Lista de material.

- Microtubos. Marca: Axigen. Cat. No. 311-08-051 de 1.5ml.
- Micropipeta. Marca: Biorad. Cat No.165-0505XTU de 1-10 μ l.
- Micropipeta Marca: Biorad. Cat No. 165-0506XTU de 2-20 μ l.
- Micropipeta. Marca: Biorad. 166-0507XTU de 20-200 μ l.
- Micropipeta. Marca: Biorad. Cat. No. 166-0508XTU de 100-1000 μ l
- Puntas estériles. Marca: Corning. Cat. No. 4866 de 1-200 μ l.
- Puntas estériles. Marca: Corning. Cat. No. 4868 de 100-1000 μ l.
- Tubos para PCR. Marca: Molecular Bioproducts. Cat No. 3414.
- Guantes de látex. Marca: Titan. Cat. No. 1315.30.
- Tubos de 15ml. Marca: Neptune Cat. No. 2541
- Placas de cultivo de 16" X 1". Marca: CLP
- Bata de laboratorio
- Toallas removedoras de ácido nucleico Marca: Ambion Cat No. 9786.
- Kit de extracción de ARN. Marca: Ambion Cat No. AM1914.
- Kit para RT-PCR en un solo paso Marca: Invitrogen Cat No. 10928-034.
- Kit de clonación molecular Marca Invitrogen Cat No. 25-0185.
- Kit de extracción de ADN plasmídico Marca: Promega Cat No. A1330.

Lista de reactivos.

- EDTA. Marca: Fisher. Cat. No. 5311.
- SDS. Marca: Sigma. Cat. No. L4509.
- Tris-base. Marca: Sigma. Cat. No. T-6066.
- Proteinasa K. Marca: Sigma. Cat. No. P-4914.
- Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico 25:24:1 v/v. Marca: Invitrogen. Cat. No. 15593-031.
- Cloroformo. Marca: Sigma. Cat No. C2432.
- Alcohol Etílico. Marca: Sigma. Cat. No. E7148.
- PCR Master Mix. Marca: Promega. Cat. No. M7505.
- Agarosa. Marca: Promega. Cat. No. V3125.
- Bromuro de etidio. Marca Amersham Biosciences. Cat. No. 17-1328-01.
- Medio LB. Marca: Sigma. Cat. No. L3022.
- Kanamicina. Marca. Gibco. Cat. No. 11815-032.
- Agar. Marca: Sigma. Cat. No. A7002.
- Trizol®. Marca: Invitrogen Cat. No. 15596-018

Poblaciones de parásitos y manipulación de muestras sanguíneas.

En este trabajo fueron utilizadas diez poblaciones de parásitos; ocho de ellas se obtuvieron de casos clínicos de campo de diferentes estados y municipios de la república mexicana y dos corresponden a cepas de referencia que han sido mantenidas bajo condiciones de laboratorio en el CENID-PAVET del INIFAP por varios años (Cuadro 1).

Los aislados y cepas fueron amplificados en el laboratorio inoculando sangre infectada o bien infestando con garrapatas infectadas a un bovino esplenectomizado que fue probado libre de anticuerpos contra *Babesia* spp., mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta. Cuando la parasitemia fue detectable mediante el análisis de frotis de sangre teñidos con colorante de Giemsa, se obtuvo una muestra de sangre de cada bovino infectado. La sangre se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos a 4°C, y el paquete de eritrocitos conteniendo los parásitos se colectó en tubos de 1.5 ml y se almacenó a -20°C hasta su uso.

De manera simultánea, una muestra de eritrocitos infectados de la cepa México se adicionó a un tubo conteniendo un volumen igual de reactivo Trizol (Invitrogen Cat. No. 15596-018) para preservar la integridad del ARN. La muestra se homogenizó y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Cuadro 1. Aislados utilizados para evaluar la variación del gen *sbp-1* de *Babesia bigemina*.

No	Nombre	Descripción	Año de obtención
1	Tapalpa	Aislado obtenido de un caso clínico en el municipio de Tapalpa, Jalisco.	2004
2	Tepatitlán	Aislado obtenido de un caso clínico en el municipio de Tepatitlán, Jalisco.	2005
3	Playa Vicente	Aislado obtenido de un caso clínico en el municipio de Playa Vicente, Veracruz.	2006
4	Pungarabato	Aislado obtenido de un caso clínico en el municipio de Pungarabato, Guerrero.	2004
5	Jiutepec	Aislado obtenido de un caso clínico en el municipio de Jiutepec, Morelos.	2006
6	Campeche	Aislado obtenido de un caso clínico en Campeche.	1995
7	Soto la Marina	Aislado obtenido de un caso clínico en el municipio de Soto la Marina, Tamaulipas.	2005
8	San Pablo Mixtepec	Aislado obtenido de un caso clínico en el municipio de San Pablo Mixtepec, Oaxaca.	2007
9	Semilla	(Seed) cepa mantenida en condiciones de cultivo <i>in vitro</i> en el laboratorio en INIFAP (Vega <i>et al.</i> 1985).	1985
10	México	Cepa donada por Ronald Smith, quien la obtuvo de un rastro en la Ciudad de México en 1975 (Citado por Mosqueda <i>et al.</i> 2004).	1979

Cuadro 2. Iniciadores utilizados para analizar el gen *sbp-1* de *Babesia bigemina*.

Nombre del iniciador	Secuencia	Longitud	Tm
<i>sbp-1aF</i>	CGTTGTCTACCCTCTCGGAAAC	22 bases	62
<i>sbp-1aR</i>	CTCGCCAAGGATGAAATGGT	20 bases	62
<i>sbp-1 intR</i>	GTTAAGGAAGCTGCAATGGTCTCT	24 bases	62
<i>sbp-1 intFa</i>	CGGGCATGACGCTACATTTGTTG	23 bases	59
<i>sbp-1 intRa</i>	CTCTGCCTCTGATGACGCTGTAG	23 bases	59

Extracción de ARN

Se realizó la extracción de ARN a partir de la muestra de eritrocitos infectados mantenidos en reactivo Trizol. La muestra fue homogenizada por 5 minutos a temperatura ambiente y se adicionaron 200µl de cloroformo (Sigma Cat. No. C2432) por cada mililitro de muestra. La mezcla se homogenizó por 15 segundos y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente para después ser centrifugada a 10,500 rpm por 15 minutos a 4°C. Después de la centrifugación se obtuvo una fase inferior oscura, una interfase blanca y una fase superior acuosa, esta última fase se colectó ya que es donde se contenía el ARN.

La metodología utilizada para la purificación de ARN es la adaptación del descrito en el manual del kit de extracción de ARN de Ambion (RNAqueous - 4PCR Kit Cat. No. AM1914). La fase acuosa colectada se procesó con la columna del kit y una vez purificado ARN, la muestra se trató con enzima DNasa del kit Deoxyribonuclease I (DNase I), RNase-free (Fermentas Cat. No. EN0529) durante 30 minutos a 37°C. De manera simultánea a la DNasa, se adicionó un inhibidor de RNasa del kit RNase OUT TM Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen Cat. No. 10777-019). La muestra se almacenó a -70°C hasta su uso (Mosqueda *et al.* 2004).

Análisis de Transcripción de *sbp-1* en *Babesia bigemina*

El ARN extraído de eritrocitos infectados se analizó mediante la técnica Transcripción Reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR). El protocolo utilizado para la amplificación del ARN se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3. Protocolo utilizado para la prueba de RT-PCR.

Reactivo	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3
2XReaction Mix	12.5µl	--	--
Master Mix	--	12.5µl	12.5µl
<i>sbp-1</i> intFa	1µl	1µl	1µl
<i>sbp-1</i> intRa	1µl	1µl	1µl
MgSO ₄ 5mM	1.5µl	--	--
RT/ <i>Taq</i>	1µl	--	--
H ₂ O libre de nucleasas	2µl	4.5µl	9.5µl
ARN Eritrocitos infectados	6µl	6µl	--
ADN Eritrocitos infectados	--	--	1µl
Volumen final	25µl	25µl	25µl

El Master Mix (Promega Cat. No. M7602) conteniendo una mezcla de *Taq* ADN Polimerasa en buffer (pH 8), dNTP's y MgCl₂, se usó en volumen y concentración recomendados por el kit. El 2X Reaction Mix conteniendo una mezcla de dNTP's y MgSO₄ en buffer (pH 8), la RT/*Taq* y el Sulfato de magnesio del kit SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum *Taq* (Invitrogen Cat. No. 10928-034), se utilizaron dentro de los rangos recomendados por el proveedor comercial.

Se analizó la presencia de ADN complementario (ADNc) de SBP-1 utilizando los iniciadores y el protocolo de ciclado específico para el gen. Los iniciadores *sbp-1* intFa y *sbp-1* intRa (Cuadro 2) amplifican un fragmento de 580 pb. Las condiciones de ciclado se describen en la figura 3.

acuosa se colectó, se adicionó un volumen de etanol absoluto (Sigma Cat. No. E7148) y se incubó a -20°C durante una noche. Se centrifugó la mezcla a 13,000 rpm por 60 minutos a 4°C y el sobrenadante se removió y se realizó un lavado con etanol al 70% por centrifugación a 13,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Después de la centrifugación se observó una pastilla color blanco que corresponde al ADN, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en agua libre de nucleasas. La muestra de ADN se almacenó a -20°C hasta su uso.

Amplificación el gen *sbp-1* de *Babesia bigemina* por PCR.

El protocolo de mezcla de reacción se muestra en el cuadro 4.

Cuadro 4. Protocolo utilizado para la prueba de PCR.

Reactivos	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3
PCR Master Mix ¹	12.5µl	12.5µl	12.5µl
<i>sbp-1</i> aF	1µl	1µl	1µl
<i>sbp-1</i> aR	1µl	1µl	1µl
H ₂ O libre de nucleadas	9.5µl	9.5µl	10.5µl
ADN Control Positivo	1µl	---	---
ADN Problema	---	1µl	---
Volumen Final	25µl	25µl	25µl

¹La mezcla del reactivo PCR Master mix (Promega, Cat. No. M7505) se usó en volumen y concentración recomendados por el proveedor.

Para realizar la amplificación de la secuencia completa del gen *sbp-1* de *Babesia bigemina* se utilizaron los iniciadores *sbp-1F* y *sbp-1R*, que amplifican un fragmento esperado de 1498 pb. El ciclado utilizado para amplificar el gen se muestra en la figura 4.

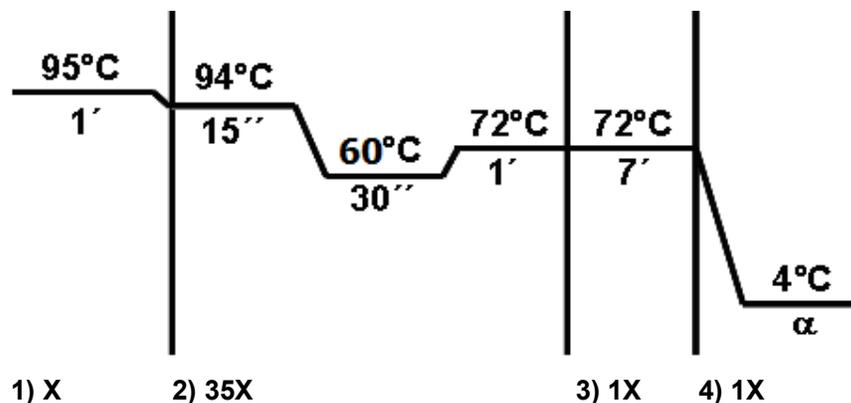


Figura 4. Protocolo de ciclado utilizado para la prueba de PCR. El protocolo de ciclado es específico para los iniciadores *sbp-1* aF y *sbp-1* aR y se diseñó con base en la temperatura de alineamiento específica de los iniciadores y de la longitud del fragmento amplificado. El tamaño del fragmento que se amplifica es de 1498 pb.

Una vez corrido el PCR, las muestras se analizaron en un gel de agarosa (Promega Cat. No. V3125) al 1% adicionado con 0.6µg/ml de bromuro de etidio (Amersham Biosciences Cat. No. 17-1328-01). Después de realizar la electroforesis en el gel de agarosa, las muestras fueron expuestas a una fuente de luz ultravioleta y las imágenes fueron tomadas en un fotodocumentador.

Clonación molecular del gen *sbp-1* de *Babesia bigemina*.

Para realizar la clonación molecular del gen *sbp-1* de *Babesia bigemina* de cada una de las poblaciones de parásitos, se utilizó la metodología descrita en el manual de clonación de Invitrogen (TOPO TA Cloning Five-minute cloning of *Taq* polymerase-amplified PCR products).

La metodología consiste en mezclar:

Reactivo	Volumen
Producto de PCR	0.5 – 4µl
Solución de sales	1µl
Agua	Adicionar a un volumen total de 5 µl
Vector TOPO	1µl
Volumen final	6µl

La mezcla obtenida se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se colocó en hielo. El vector con el inserto correspondiente al gen *sbp-1* se utilizó para realizar la transformación de las células *E. coli* (Cepa TOP10 químicamente competente, Marca Invitrogen) mediante choque térmico. Una muestra de 2µl de la mezcla con el vector se adicionó a un tubo conteniendo bacterias *E. coli* químicamente competentes y se mezcló cuidadosamente. Se incubó en hielo 30 minutos y posteriormente se sometió a un choque térmico por 30 segundos a 42°C. Posteriormente, el tubo se colocó en hielo. Se adicionaron 250µl de medio SOC a las bacterias y se incubaron a 37°C a 200rpm por 1 hora.

Cumplido el tiempo se dispersaron volúmenes de 10µl, 50µl, 70µl y 150µl en placas de medio LB/agar (20g de LB Broth (Sigma Cat. No. L32022) y 15g de Agar (Sigma Cat. No. A7002) en un litro de agua) adicionado con 50µg/ml de kanamicina (Gibco Cat. No. 11815-032) y se incubaron a 37°C durante una noche. Diez colonias fueron elegidas para crecerse en medio LB líquido contenido en un tubo de 15ml (Neptuno Cat. No. 2541) y un respaldo de la misma colonia clonal se estrió en una placa con medio LB/agar con kanamicina como respaldo. Se incubaron las diez colonias contenidas en medio LB líquido a 37°C a 200rpm durante una noche, mientras que la placa con las colonias estriadas se incubaron solamente a 37°C. Después de realizar la incubación, se centrifugaron los tubos a 4,000rpm por 10 minutos a 15°C. De la pastilla formada, se eliminó el sobrenadante y se extrajo el ADN plasmídico de la muestra utilizando un kit comercial (Wizard *Plus* SV Minipreps ADN Purification System, Promega Cat. No. A1460). El ADN obtenido se cuantificó por espectrofotometría y posteriormente se analizó al incubar una muestra de ADN plasmídico, con la enzima Eco-RI (Invitrogen Cat. No. 15202-13) de acuerdo a las características del plásmido que se describen en el manual de clonación invitrogen. Se incubaron 500ng de ADN con 20 unidades de enzima a 37°C por 3 horas. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1% adicionado con bromuro de etidio y se identificó el fragmento clonado. La muestra obtenida de ADN plasmídico conteniendo el inserto *sbp-1* se secuenció. Se secuenciaron dos clones por cada cepa o aislado utilizando los

iniciadores incluidos en el kit de clonación M13 Forward y M13 Reverse, y el iniciador *sbp-1* intR.

La secuenciación de los fragmentos de ADN se realizó en el Laboratorio de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (<http://www.ibt.unam.mx/sintesis/secuenciacion.html>) bajo las especificaciones solicitadas por el laboratorio. Para ello se enviaron de 500-700ng de ADN en un volumen final de 16 μ l de muestra en un tubo de PCR sin anotaciones en la tapa. Los iniciadores se enviaron a una concentración de 10pmol. Se secuenciaron dos clonas por cada aislado, y se solicitaron 3 secuencias por cada clona correspondientes a los 3 iniciadores (Figura 5). Esta metodología sirvió para obtener la secuencia completa del gen, ya que el servicio de secuenciación brinda un máximo de 700 bases por secuencia y con esto se garantiza obtener la secuencia completa del gen.

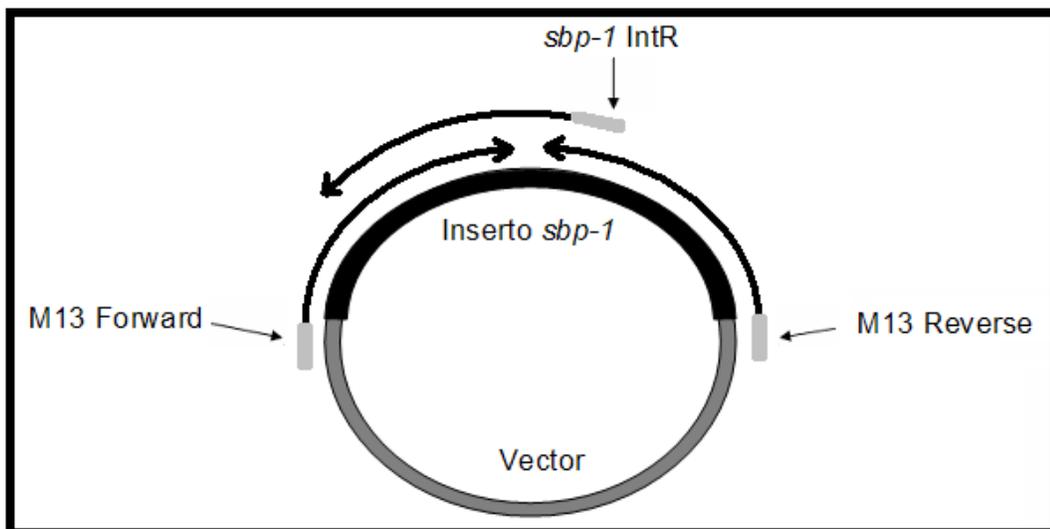


Figura 5. Alineamiento de los iniciadores en el Vector TOPO con la secuencia del gen *sbp-1* insertado. Las barras en color gris oscuro muestran parte de la región del vector y la barra en color negro corresponde a la secuencia del gen insertado. Las líneas de color gris claro corresponden a los iniciadores y las flechas, al sentido de la secuenciación que se esperaba.

Obtención de secuencias consenso del gen *sbp-1* de cada población de parásitos.

Para obtener las secuencias consenso de cada aislado se utilizó la metodología que se describe a continuación:

El formato en el que envían las secuencias por parte del departamento de secuenciación del IBT-UNAM es **ab1** por lo que se utilizó el programa Chromas Lite 2.01 (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html) para extraer la secuencia del archivo. Esto se realizó con las tres secuencias de una de las clonas de una población de parásitos. Las secuencias obtenidas se trabajaron en el programa Vector NTI Advance 10 (Invitrogen) para revisar la orientación correcta de las mismas. Una vez que fueron orientadas, se compararon con la secuencia reportada y se obtuvo la primera secuencia de una clona. El mismo proceso se siguió con las secuencias de la segunda clona y posteriormente se realizó un alineamiento de las 2 secuencias obtenidas y de este último alineamiento se obtuvo la secuencia consenso de la población de parásitos. Esta misma metodología se utilizó para cada población de parásitos.

Alineamiento múltiple de las secuencias del gen *sbp-1* de *Babesia bigemina*.

El alineamiento de secuencias se hizo con las secuencias consenso de las poblaciones de parásitos utilizando el programa Vector NTI Advance 10 que realiza un alineamiento automatizado. El programa permite realizar alineamientos múltiples con objeto de identificar si existe variación entre las secuencias de las distintas poblaciones de parásitos.

El alineamiento múltiple de las secuencias sirvió como base para diseñar un par de iniciadores que sirvieran para amplificar la región variable del gen *sbp-1*. Los iniciadores diseñados fueron *sbp-1* intFa y *sbp-1* intRa (Cuadro 2).

Análisis de repeticiones en tandem en la secuencia del gen *sbp-1* de *Babesia bigemina*.

El análisis de repetidos en la secuencia del gen se realizó con el programa Tandem Repeat Finder 2.0 (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>). El análisis consistió en evaluar la secuencia del gen en dicho programa que puede identificar los patrones de repetidos que se encuentren dentro de una secuencia de ADN. Las secuencias de repetidos que se analizaron, se agruparon en genotipos y posteriormente se determinó el genotipo comprendido por cada aislado de acuerdo al patrón de genotipo que mostró.

Obtención de la secuencia de la proteína predicha del gen *sbp-1* de *Babesia bigemina*.

Las secuencias consenso del gen *sbp-1* de *Babesia bigemina* de cada uno de los aislados, se empleó para obtener la secuencia predicha de aminoácidos del gen. El procedimiento para la obtención de la proteína predicha para cada una de las secuencias se realizó con el uso del programa ExPASy-Translate tool que se encuentra disponible en el sitio web: <http://www.expasy.ch/tool/dna.html> donde es posible introducir la secuencia del ADN y obtener la secuencia de aminoácidos.

Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de SBP-1 de *Babesia bigemina*.

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos se realizó con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3. El programa permite realizar alineamientos múltiples de forma manual lo que fue útil para poder identificar las variaciones existentes entre las secuencias de proteínas.

Análisis de repeticiones en tandem en la secuencia de aminoácidos de SBP-1 de *Babesia bigemina*.

El análisis de repetidos en tandem de la secuencia de aminoácidos de SBP-1 se realizó tomando como base la secuencia de repetidos encontrados en la secuencia nucleotídica. El análisis de la secuencia de repetidos sirvió

para determinar si existe la misma variación a nivel de aminoácidos que en la secuencia de nucleótidos.

Amplificación por PCR de la región variable del gen *sbp-1* de *Babesia bigemina*.

El diseño de los iniciadores *sbp-1* int Fa y *sbp-1* Ra se realizó con base en las secuencias conservadas que flanquean a la región variable del gen, de acuerdo con el alineamiento múltiple obtenido. La técnica consiste en amplificar la región variable de cada uno de los aislados y realizar la diferenciación de los genotipos con base en la variación del amplicón que se obtenga. La variación de cada amplicón se analizó en un gel de agarosa al 2%.

RESULTADOS

El gen *sbp-1* de *Babesia bigemina* se transcribe en estadios del parásito que se desarrollan en el hospedero bovino.

El análisis de transcripción de *sbp-1* en estadios de *Babesia bigemina* que se desarrollan en el hospedero bovino, se realizó a partir de ARN total extraído de una muestra de eritrocitos infectados. El análisis se realizó con la técnica RT-PCR y consistió en extraer el ARN total de la muestra de eritrocitos infectados y amplificar el ADNc utilizando los iniciadores *sbp-1* intFa y *sbp-1* intRa y con un protocolo de ciclado específico para los iniciadores (Figura 3).

En la muestra de ARN obtenido de eritrocitos infectados, se visualizó un amplicón de 580 pb (Figura 6, carril 1) que corresponde al tamaño esperado en una amplificación de ADN con los mismos iniciadores para la cepa México. Cuando se analizó la muestra de ARN en ausencia de transcriptasa reversa, no se visualizó ningún amplicón, confirmando ausencia de ADN genómico (Figura 6, carril 2). Como control positivo de la reacción se amplificó una muestra de ADN de la cepa México (Figura 6, carril 3).

Amplificación del gen *sbp-1* de los aislados mexicanos de *Babesia bigemina*.

La amplificación del gen *sbp-1* se realizó a partir de las extracciones de ADN realizadas por el método de Fenol-Cloroformo de cada uno de los aislados de *Babesia bigemina*. Se amplificó el fragmento del gen *sbp-1* utilizando los iniciadores *sbp-1* aF y *sbp-1* aR y el ciclado específicos para los iniciadores (Figura 4). Los resultados iniciales de amplificación mostraron una diferencia inicial notable entre los distintos aislados de campo así como con las cepas en este estudio. La figura 7 muestra el resultado obtenido de la amplificación del aislado Jiutepec, observándose un fragmento da 1500 pb aproximadamente (Carril 2) y la amplificación de *sbp-1* de la cepa México que se utilizó como control positivo para este caso.

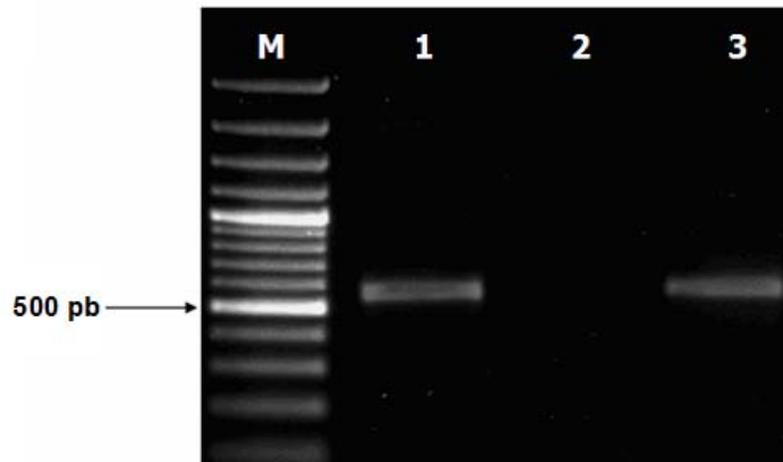


Figura 6. El gen *sbp-1* de *Babesia bigemina* se transcribe en estadios intraeritrocíticos. Carril 1.- ARN extraído de eritrocitos infectados de la cepa México, analizado por RT-PCR. Carril 2.- ARN total analizado bajo las mismas condiciones, en ausencia de transcriptasa reversa. Carril 3.- control positivo de la reacción utilizando muestra de ADN de la cepa México. M.- Marcado de peso molecular de 100pb. El fragmento esperado de 580pb se visualizó en un gel de agarosa adicionado con bromuro de etidio.

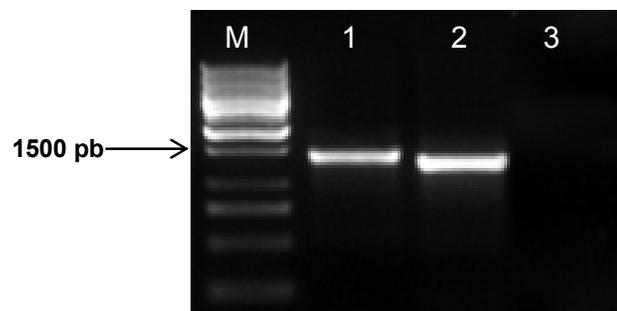


Figura 7. Amplificación del gen *sbp-1* en un aislado mexicano. Carril 1.- Amplificación del gen *sbp-1* de la cepa México como control positivo, Carril 2.- Amplificación del gen *sbp-1* del aislado Jiutepec, Carril 3.- Control Negativo donde no se utilizó ADN.

Análisis de la clonación molecular del gen *sbp-1*.

La clonación molecular se realizó utilizando el Vector Topo TA Cloning (Invitrogen) y una vez obtenidas las clonas, se realizó la extracción del ADN plasmídico, se cuantificó y se realizó un análisis del ADN utilizando la enzima de restricción EcoRI para confirmar la presencia del inserto. Para el caso del aislado Tepatitlan, se seleccionaron cuatro poblaciones clonales colectadas del cultivo en medio LB/agar y se crecieron en medio LB líquido (Ver metodología clonación molecular del gen *sbp-1*). Posteriormente a estas muestras se emplearon para realizar la extracción del ADN plasmídico. La concentración obtenida para cada muestra fue de: Clona 1: 188 ng/μl, Clona 2: 292.7 ng/μl, Clona 3: 292.7 ng/μl y Clona 4: 234.4 ng/μl. Las concentraciones fueron obtenidas con lecturas realizadas en un espectrofotómetro (BioRad) a una longitud de onda de 260 nm.

Las muestras de ADN plasmídico se incubaron con la enzima de restricción EcoRI y posteriormente las muestras se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa adicionado con bromuro de etidio. El resultado obtenido para el aislado Tepatitlán fue que las clonas 3 y 4 presentaban inserto que se observa en la figura 8. Carriles 3 y 4, donde es posible observar al vector de clonación en la parte superior y dos fragmentos en la parte inferior. En las muestras de las clonas 1 y 2 había ausencia de inserto ya que solo era posible observar el fragmento correspondiente al vector de clonación (Figura 8. Carriles 1 y 2). El inserto que se observa en las muestras positivas 3 y 4 después de incubarse con la enzima de restricción, corresponden a dos fragmentos; el primero es de un tamaño de 900 pb aproximadamente y el segundo de un tamaño de 600 pb, que en suma dan un tamaño total de 1400 pb que corresponde al fragmento del gen *sbp-1* amplificado en un inicio. Este resultado indicó la presencia de un sitio de restricción en el gen *sbp-1* para EcoRI. Con los resultados obtenidos se confirmó la clonación molecular del gen *sbp-1* de *Babesia bigemina* para el aislado Tepatitlán. Utilizando las muestras de ADN plasmídico, se prepararon alícuotas bajo las condiciones de volumen, concentración y almacenaje solicitadas por el laboratorio de secuenciación del IBT-UNAM para

posteriormente ser enviadas para su secuenciación. Se secuenciaron dos clonas para cada aislado.

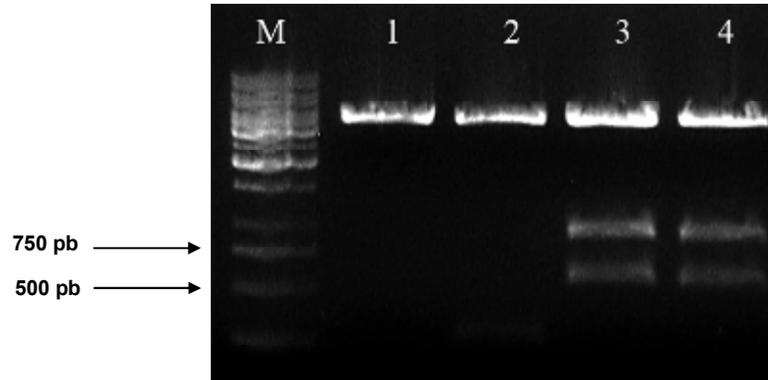


Figura 8. Análisis de la clonación molecular del gen *sbp-1* del aislado Tepatitlán. En la figura se observa el análisis hecho a 4 muestras de ADN plasmídico incubado con la enzima EcoRI, en los carriles 3 y 4 se observan 2 bandas adicionales con un peso molecular aproximado de 900pb y de 600pb cada una. La banda que se observa en la parte superior corresponde al vector de clonación.

Obtención de la secuencia consenso del gen *sbp-1* de *Babesia bigemina* para cada aislado y cepa Mexicanos.

La secuencia consenso de cada aislado fue el resultado del alineamiento hecho con las secuencias obtenidas de cada una de las clonas secuenciadas. El laboratorio de secuenciación del IBT-UNAM envía las secuencias en archivos con extensión ab1. Las secuencias se extrajeron utilizando el programa Chormas Lite Versión 2.01. El resultado fue que se obtuvieron 3 secuencias por cada clona analizada, es decir, 6 secuencias por aislado. Las tres secuencias de cada clona sirvieron para obtener la secuencia completa como se muestra en la figura 2. Para obtener la secuencia para una clona, se realizó un alineamiento utilizando la secuencia publicada del contig 4173 del genoma de *Babesia bigemina* como base y las tres secuencias de la clona. Esto sirvió para obtener una secuencia completa para la clona dada. El mismo proceso se realizó para ambas clonas y de esta manera se obtuvieron dos

secuencias por clona. Con las dos secuencias obtenidas por aislado se realizó un alineamiento de ellas para obtener una secuencia consenso por aislado. Las características de las secuencias de enlistan en el cuadro 5. Con la secuencia consenso del gen, se determinó la longitud del gen así como sitios de restricción para *EcoRI* y *NcoI* identificados por el programa Vector NTI Advance 10, el resultado mostró la variación en longitud que existe entre las distintas secuencias.

Los valores de longitud, así como los sitios de restricción identificados mostraron un grupo compuesto por 5 aislados comprendidos por Playa Vicente, Tepatitlán, Soto la Marina, Jiutepec y Campeche. En este grupo la longitud del gen fue de 1344 pb, el sitio de restricción para *EcoRI* fue en la posición 862 y el sitio de restricción para *NcoI* fue la posición 1088.

Estos valores cambiaron para los demás aislados siendo la cepa México quien presentó la mayor longitud del gen con 1398 pb. La secuencia del gen del aislado San Pablo Mixtepec tiene una longitud de 1371 pb, la secuencia del aislado Pungarabo es de 1305 pb, del aislado Tapalpa de 1290 y de la Cepa Vacunal Seed de 1035 pb siendo esta la más corta aquí reportada. Los sitios de restricción identificados en las secuencias, variaban de acuerdo a la longitud total del gen, es decir, cuando la longitud del gen era mayor como en el aislado San Pablo Mixtepec, las posiciones de los sitios de restricción eran mayores en comparación con otros aislados como Tapalpa o Jiutepec, sin embargo, el sitio de restricción para *EcoRI* se localizó a 482 pb del final del gen en todas las secuencias y el sitio de restricción para *NcoI* se localizó a 256 pb del final del gen.

Alineamiento Múltiple de las secuencias consenso del gen *sbp-1* de los aislados y cepas Mexicanos.

El alineamiento múltiple obtenido con el programa Vector NTI Advance 10 (Figura 9) muestra regiones variables cuando se comparan las 10 secuencias y la secuencia contig. Esto confirma la variabilidad que se sugería para el gen *sbp-1* de *Babesia bigemina*.

El resultado del alineamiento muestra la presencia de una región conservada que va de la posición 1 a la 360, una región variable que va de la posición 361 a la 734 y nuevamente una región conservada al final de las secuencias que va de la posición 735 a la 1398. El polimorfismo identificado entre las secuencias, se basó en variaciones puntuales de nucleótidos y de deleciones y/o inserciones en la región central de la secuencia codificante de *sbp-1*. El programa Vector NTI advance determina el porcentaje de identidad entre secuencias y esto sirvió para identificar que los aislados Playa Vicente, Tepatitlán, Soto la Marina, Jiutepec y Campeche conformaron un grupo de secuencia con una identidad del 99.5%. Cuando se comparó la secuencia de alguno de los aislados que conformaron este grupo con la secuencia del gen *sbp-1* de la cepa México el porcentaje de identidad fue del 96%. La identidad mostrada entre la secuencia de la cepa México con respecto al aislado San Pablo Mixtepec fue de 97.8%, cuando se comparó la cepa México con la secuencia del aislado Pungarabato la identidad fue de 90.2%. El porcentaje de identidad que se obtuvo entre la cepa México con el aislado Tapalpa fue de 92.1 y con la secuencia de la cepa vacunal Seed fue de 74%. El valor más bajo de identidad fue el obtenido entre las dos cepas analizadas, es decir, entre la cepa vacunal Seed y la cepa de desafío México. El análisis de identidad comparando a todas las secuencias con respecto a la cepa México mostró que cuando la diferencia de nucleótidos iba siendo mayor, el porcentaje de identidad iba disminuyendo exceptuando cuando se comparó a la cepa México con el aislado Pungarabato donde el valor no fue dado solamente por la variación en el número de nucleótidos, sino que también por el polimorfismo entre las secuencias.

Cuadro 5. Características de *sbp-1* en 10 poblaciones de parásitos.

Nombre	Longitud del gen en pb	Sitio <i>EcoRI</i>	Sitio <i>NcoI</i>
México	1398	916	1142
San Pablo Mixtepec	1371	889	1115
Playa Vicente	1344	862	1088
Tepatitlán	1344	862	1088
Soto la Marina	1344	862	1088
Jiutepec	1344	862	1088
Campeche	1344	862	1088
Pungarabato	1305	825	1051
Tapalpa	1290	810	1036
Seed	1035	555	781

La secuencia del gen *sbp-1* de *Babesia bigemina* presenta secuencia de repetidos en tandeo.

Con la secuencia consenso del gen *sbp-1* de los distintos aislados, se evaluó la presencia de repetidos en tandeo, con el programa Tandem Repeat Finder 2.0. El análisis mostró la presencia de secuencias repetidas en la secuencia del gen. El patrón de repetidos es de 27 nucleótidos y se observa variación en el número de repetidos entre algunos aislados (Cuadro 6).

Los repetidos se localizan en la región variable que se muestra en el alineamiento de la figura 9. La variación en la longitud que existe entre cada población de parásitos, corresponde a la diferencia en el número de repetidos observados.

			1		50
	Mexico sbp-1	(1)	ATGTCCAATCCGTATCAAGCGCAAGAGATGTAGATTCAACAGGTGTTAC		
San Pablo Mixtepec	sbp-1	(1)	ATGTCCAATCCGTATCAAGCGCAAGAGATGTAGATTCAACAGGTGTTAC		
Playa Vicente	sbp-1	(1)	ATGTCCAATCCGTATCAAGCGCAAGAGATGTAGATTCAACAGGTGTTAC		
Tepatitlán	sbp-1	(1)	ATGTCCAATCCGTATCAAGCGCAAGAGATGTAGATTCAACAGGTGTTAC		
Soto la Marina	sbp-1	(1)	ATGTCCAATCCGTATCAAGCGCAAGAGATGTAGATTCAACAGGTGTTAC		
Jiutepec	sbp-1	(1)	ATGTCCAATCCGTATCAAGCGCAAGAGATGTAGATTCAACAGGTGTTAC		
Campeche	sbp-1	(1)	ATGTCCAATCCGTATCAAGCGCAAGAGATGTAGATTCAACAGGTGTTAC		
Pungarabato	sbp-1	(1)	ATGTCCAGATCCGTATCAAGCGCAAGAGATGTAGATTCAACAGGTGTTAC		
Tapalpa	sbp-1	(1)	ATGTCCAATCCGTATCAAGCGCAAGAGATGTAGATTCAACAGGTGTTAC		
Contig 4173	sbp-1	(1)	ATGTCCAATCCGTATCAAGCGCAAGAGATGTAGATTCAACAGGTGTTAC		
Seed	sbp-1	(1)	ATGTCCAATCCGTATCAAGCGCAAGAGATGTAGATTCAACAGGTGTTAC		
Consensus		(1)	ATGTCCAATCCGTATCAAGCGCAAGAGATGTAGATTCAACAGGTGTTAC		
			51		100
	Mexico sbp-1	(51)	ATCAGACTCCAAGGCATTCCAACGGTACAGATGAGCTCTGTTTTCCG		
San Pablo Mixtepec	sbp-1	(51)	ATCAGACTCCAAGGCATTCCAACGGTACAGATGAGCTCTGTTTTCCG		
Playa Vicente	sbp-1	(51)	ATCAGACTCCAAGGCATTCCAACGGTACAGATGAGCTCTGTTTTCCG		
Tepatitlán	sbp-1	(51)	ATCAGACTCCAAGGCATTCCAACGGTACAGATGAGCTCTGTTTTCCG		
Soto la Marina	sbp-1	(51)	ATCAGACTCCAAGGCATTCCAACGGTACAGATGAGCTCTGTTTTCCG		
Jiutepec	sbp-1	(51)	ATCAGACTCCAAGGCATTCCAACGGTACAGATGAGCTCTGTTTTCCG		
Campeche	sbp-1	(51)	ATCAGACTCCAAGGCATTCCAACGGTACAGATGAGCTCTGTTTTCCG		
Pungarabato	sbp-1	(51)	ATCAGACTCCATAGGCATTCCAACGGTACAGATGAGCTCTGTTTTCCG		
Tapalpa	sbp-1	(51)	ATCAGACTCCAAGGCATTCCAACGGTACAGATGAGCTCTGTTTTCCG		
Contig 4173	sbp-1	(51)	ATCAGACTCCATAGGCATTCCAACGGTACAGATGAGCTCTGTTTTCCG		
Seed	sbp-1	(51)	ATCAGACTCCAAGGCATTCCAACGGTACAGATGAGCTCTGTTTTCCG		
Consensus		(51)	ATCAGACTCCAAGGCATTCCAACGGTACAGATGAGCTCTGTTTTCCG		
			101		150
	Mexico sbp-1	(101)	GAAGAGGTGAGGCTTGTGGGTGGGGTGGCATTGAAACTCCGCGGGCTCA		
San Pablo Mixtepec	sbp-1	(101)	GAAGAGGTGAGGCTTGTGGGTGGGGTGGCATTGAAACTCCGCGGGCTCA		
Playa Vicente	sbp-1	(101)	GAAGAGGTGAGGCTTGTGGGTGGGGTGGCATTGAAACTCCGCGGGCTCA		
Tepatitlán	sbp-1	(101)	GAAGAGGTGAGGCTTGTGGGTGGGGTGGCATTGAAACTCCGCGGGCTCA		
Soto la Marina	sbp-1	(101)	GAAGAGGTGAGGCTTGTGGGTGGGGTGGCATTGAAACTCCGCGGGCTCA		
Jiutepec	sbp-1	(101)	GAAGAGGTGAGGCTTGTGGGTGGGGTGGCATTGAAACTCCGCGGGCTCA		
Campeche	sbp-1	(101)	GAAGAGGTGAGGCTTGTGGGTGGGGTGGCATTGAAACTCCGCGGGCTCA		
Pungarabato	sbp-1	(101)	GAAGAGGTGAGGCTTGTGGGTGGGGTGGCATTGAAACTCCGCGGGCTCA		
Tapalpa	sbp-1	(101)	GAAGAGGTGAGGCTTGTGGGTGGGGTGGCATTGAAACTCCGCGGGCTCA		
Contig 4173	sbp-1	(101)	GAAGAGGTGAGGCTTGTGGGTGGGGTGGCATTGAAACTCCGCGGGCTCA		
Seed	sbp-1	(101)	GAAGAGGTGAGGCTTGTGGGTGGGGTGGCATTGAAACTCCGCGGGCTCA		
Consensus		(101)	GAAGAGGTGAGGCTTGTGGGTGGGGTGGCATTGAAACTCCGCGGGCTCA		
			151		200
	Mexico sbp-1	(151)	GAAAGGGTGCATTGCGTGTGCTTAGAGGTATGACACTTCTTCTCAGC		
San Pablo Mixtepec	sbp-1	(151)	GAAAGGGTGCATTGCGTGTGCTTAGAGGTATGACACTTCTTCTCAGC		
Playa Vicente	sbp-1	(151)	GAAAGGGTGCATTGCGTGTGCTTAGAGGTATGACACTTCTTCTCAGC		
Tepatitlán	sbp-1	(151)	GAAAGGGTGCATTGCGTGTGCTTAGAGGTATGACACTTCTTCTCAGC		
Soto la Marina	sbp-1	(151)	GAAAGGGTGCATTGCGTGTGCTTAGAGGTATGACACTTCTTCTCAGC		
Jiutepec	sbp-1	(151)	GAAAGGGTGCATTGCGTGTGCTTAGAGGTATGACACTTCTTCTCAGC		
Campeche	sbp-1	(151)	GAAAGGGTGCATTGCGTGTGCTTAGAGGTATGACACTTCTTCTCAGC		
Pungarabato	sbp-1	(151)	GAAAGGGTGCATTGCGTGTGCTTAGAGGTATGACACTTCTTCTCAGC		
Tapalpa	sbp-1	(151)	GAAAGGGTGCATTGCGTGTGCTTAGAGGTATGACACTTCTTCTCAGC		
Contig 4173	sbp-1	(151)	GAAAGGGTGCATTGCGTGTGCTTAGAGGTATGACACTTCTTCTCAGC		
Seed	sbp-1	(151)	GAAAGGGTGCATTGCGTGTGCTTAGAGGTATGACACTTCTTCTCAGC		
Consensus		(151)	GAAAGGGTGCATTGCGTGTGCTTAGAGGTATGACACTTCTTCTCAGC		
			201		250
	Mexico sbp-1	(201)	AATCGGCATAACGTTCTCCTCAGGTGCAGAGAGCCATACGTTTCCCCTG		
San Pablo Mixtepec	sbp-1	(201)	AATCGGCATAACGTTCTCCTCAGGTGCAGAGAGCCATACGTTTCCCCTG		
Playa Vicente	sbp-1	(201)	AATCGGCATAACGTTCTCCTCAGGTGCAGAGAGCCATACGTTTCCCCTG		
Tepatitlán	sbp-1	(201)	AATCGGCATAACGTTCTCCTCAGGTGCAGAGAGCCATACGTTTCCCCTG		
Soto la Marina	sbp-1	(201)	AATCGGCATAACGTTCTCCTCAGGTGCAGAGAGCCATACGTTTCCCCTG		
Jiutepec	sbp-1	(201)	AATCGGCATAACGTTCTCCTCAGGTGCAGAGAGCCATACGTTTCCCCTG		
Campeche	sbp-1	(201)	AATCGGCATAACGTTCTCCTCAGGTGCAGAGAGCCATACGTTTCCCCTG		
Pungarabato	sbp-1	(201)	AATCGGCATAGTTTCTCCTCAGGTGCAGAGAGCCATACGTTTCCCCTG		
Tapalpa	sbp-1	(201)	AATCGGCATAACGTTCTCCTCAGGTGCAGAGAGCCATACGTTTCCCCTG		
Contig 4173	sbp-1	(201)	AATCGGCATAACGTTCTCCTCAGGTGCAGAGAGCCATACGTTTCCCCTG		
Seed	sbp-1	(201)	AATCGGCATAACGTTCTCCTCAGGTGCAGAGAGCCATACGTTTCCCCTG		
Consensus		(201)	AATCGGCATAACGTTCTCCTCAGGTGCAGAGAGCCATACGTTTCCCCTG		

			251		300
	Mexico	sbp-1	(251)	AGGACATATCACAGACTTCAGCCAAGTCGGGTGACGGGCATGACGCTACA	
San Pablo	Mixtepec	sbp-1	(251)	AGGACATATCACAGACTTCAGCCAAGTCGGGTGACGGGCATGACGCTACA	
	Playa Vicente	sbp-1	(251)	AGGACATATCACAGACTTCAGCCAAGTCGGGTGACGGGCATGACGCTACA	
	Tepatitlán	sbp-1	(251)	AGGACATATCACAGACTTCAGCCAAGTCGGGTGACGGGCATGACGCTACA	
Soto la Marina	sbp-1	(251)	AGGACATATCACAGACTTCAGCCAAGTCGGGTGACGGGCATGACGCTACA		
	Jiutepec	sbp-1	(251)	AGGACATATCACAGACTTCAGCCAAGTCGGGTGACGGGCATGACGCTACA	
	Campeche	sbp-1	(251)	AGGACATATCACAGACTTCAGCCAAGTCGGGTGACGGGCATGACGCTACA	
	Pungarabato	sbp-1	(251)	AGGACATATCACAGACTTCAGCCAAGTCGGGTGACGGGCATGACGCTACA	
	Tapalpa	sbp-1	(251)	AGGACATATCACAGACTTCAGCCAAGTCGGGTGACGGGCATGACGCTACA	
	Contig 4173	sbp-1	(251)	AGGACATATCACAGACTTCAGCCAAGTCGGGTGACGGGCATGACGCTACA	
	Seed	sbp-1	(251)	AGGACATATCACAGACTTCAGCCAAGTCGGGTGACGGGCATGACGCTACA	
	Consensus		(251)	AGGACATATCACAGACTTCAGCCAAGTCGGGTGACGGGCATGACGCTACA	
				301	350
	Mexico	sbp-1	(301)	TTTGTGTATCCACATCGAATGATTCATTAGCAACGGTTTCTTCTGAAAT	
San Pablo	Mixtepec	sbp-1	(301)	TTTGTGTATCCACATCGAATGATTCATTAGCAACGGTTTCTTCTGAAAT	
	Playa Vicente	sbp-1	(301)	TTTGTGTATCCACATCGAATGATTCATTAGCAACGGTTTCTTCTGAAAT	
	Tepatitlán	sbp-1	(301)	TTTGTGTATCCACATCGAATGATTCATTAGCAACGGTTTCTTCTGAAAT	
Soto la Marina	sbp-1	(301)	TTTGTGTATCCACATCGAATGATTCATTAGCAACGGTTTCTTCTGAAAT		
	Jiutepec	sbp-1	(301)	TTTGTGTATCCACATCGAATGATTCATTAGCAACGGTTTCTTCTGAAAT	
	Campeche	sbp-1	(301)	TTTGTGTATCCACATCGAATGATTCATTAGCAACGGTTTCTTCTGAAAT	
	Pungarabato	sbp-1	(301)	TTTGTGTATCCACATCGAATGATTCATTAGCAACGGTTTCTTCTGAAAT	
	Tapalpa	sbp-1	(301)	TTTGTGTATCCACATCGAATGATTCATTAGCAACGGTTTCTTCTGAAAT	
	Contig 4173	sbp-1	(301)	TTTGTGTATCCACATCGAATGATTCATTAGCAACGGTTTCTTCTGAAAT	
	Seed	sbp-1	(301)	TTTGTGTATCCACATCGAATGATTCATTAGCAACGGTTTCTTCTGAAAT	
	Consensus		(301)	TTTGTGTATCCACATCGAATGATTCATTAGCAACGGTTTCTTCTGAAAT	
				351	400
	Mexico	sbp-1	(351)	CTCATTAGCAACTTCTGGGACATCTTCGGTAGGCTCATTGCAACGATT	
San Pablo	Mixtepec	sbp-1	(351)	CTCATTAGCAACTTCTGGGACATCTTCGGTAGGCTCATTGCAACGATT	
	Playa Vicente	sbp-1	(351)	CTCATTAGCAACTTCTGGGACATCTTCGGTAGGCTCATTGCAACGATT	
	Tepatitlán	sbp-1	(351)	CTCATTAGCAACTTCTGGGACATCTTCGGTAGGCTCATTGCAACGATT	
Soto la Marina	sbp-1	(351)	CTCATTAGCAACTTCTGGGACATCTTCGGTAGGCTCATTGCAACGATT		
	Jiutepec	sbp-1	(351)	CTCATTAGCAACTTCTGGGACATCTTCGGTAGGCTCATTGCAACGATT	
	Campeche	sbp-1	(351)	CTCATTAGCAACTTCTGGGACATCTTCGGTAGGCTCATTGCAACGATT	
	Pungarabato	sbp-1	(351)	CTCATTAGCAA-----c-----CGTTT	
	Tapalpa	sbp-1	(351)	CTCATTAGCAACTTCTGGGACATCTTCGGTAGGCTCATTGCAACGATT	
	Contig 4173	sbp-1	(351)	CTCATTAGCAG-----c-----CGTTT	
	Seed	sbp-1	(351)	CTCATTAGCAACTTCTGGGAC-----CGTTT	
	Consensus		(351)	CTCATTAGCAACTTCTGGGACATCTTCGGTAGGCTCATTGCAACGATT	
				401	450
	Mexico	sbp-1	(401)	CTTCTGAAATCTCATTAGCAACTTCTGGGACATCTTCGGTAGGCTCATT	
San Pablo	Mixtepec	sbp-1	(401)	CTTCTGAAATCTCATTAGCAACTTCTGGGACATCTTCGGTAGGCTCATT	
	Playa Vicente	sbp-1	(401)	CTTCTGAAATCTCATTAGCAACTTCTGGGACATCTTCGGTAGGCTCATT	
	Tepatitlán	sbp-1	(401)	CTTCTGAAATCTCATTAGCAACTTCTGGGACATCTTCGGTAGGCTCATT	
Soto la Marina	sbp-1	(401)	CTTCTGAAATCTCATTAGCAACTTCTGGGACATCTTCAGTAGGCTCATT		
	Jiutepec	sbp-1	(401)	CTTCTGAAATCTCATTAGCAACTTCTGGGACATCTTCGGTAGGCTCATT	
	Campeche	sbp-1	(401)	CTTCTGAAATCTCATTAGCAACTTCTGGGACATCTTCGGTAGGCTCATT	
	Pungarabato	sbp-1	(368)	CTTCTGACGCTCATTAGCAACAACT-----TCTTCTACGTTCTCATT	
	Tapalpa	sbp-1	(401)	CTTCTGAAATCTCATTAGCAACTTCTGGGACATCTTCGGTAGGCTCATT	
	Contig 4173	sbp-1	(368)	CTTCTGAAATCTCATTAGCAAGGGTT-----TCTTCTAGATCTGTTA	
	Seed	sbp-1	(372)	-----TCTTCTAGATCTGTTA	
	Consensus		(401)	CTTCTGAAATCTCATTAGCAACTTCTGGGACATCTTCGGTAGGCTCATT	
				451	500
	Mexico	sbp-1	(451)	GCAACAACCTTCTTCAGAAATCTCATTAGCAACGGTTGCTTCTGACGTCTC	
San Pablo	Mixtepec	sbp-1	(451)	GCAACAACCTTCTTCAGAAATCTCATTAGCAACGGTTGCTTCTGACGTCTC	
	Playa Vicente	sbp-1	(451)	GCAACAACCTTCTTCAGAAATCTCATTAGCAACGGTTGCTTCTGACGTCTC	
	Tepatitlán	sbp-1	(451)	GCAACAACCTTCTTCAGAAATCTCATTAGCAACGGTTGCTTCTGACGTCTC	
Soto la Marina	sbp-1	(451)	GCAACAACCTTCTTCAGAAATCTCATTAGCAACGGTTGCTTCTGACGTCTC		
	Jiutepec	sbp-1	(451)	GCAACAACCTTCTTCAGAAATCTCATTAGCAACGGTTGCTTCTGACGTCTC	
	Campeche	sbp-1	(451)	GCAACAACCTTCTTCAGAAATCTCATTAGCAACGGTTGCTTCTGACGTCTC	
	Pungarabato	sbp-1	(412)	GCAACAACCTTCTTCAGAAATCTCATTAGCAACGGTTTCTTCTGACGTCTC	
	Tapalpa	sbp-1	(451)	GCAACAACCTTCTTCAGAAATCTCATTAGCAACGGTTGCTTCTGACGTCTC	
	Contig 4173	sbp-1	(412)	GCAACAATTTCTTCAGAAATCTCGTTAGCAACAATTTCTTCTAGAAATCTC	
	Seed	sbp-1	(372)	-----TCTTCTAGAAATCTC	
	Consensus		(451)	GCAACAACCTTCTTCAGAAATCTCATTAGCAACGGTTGCTTCTGACGTCTC	

			501		550
	Mexico sbp-1	(501)	GTTAGCAACA	ACTTCTCTGACGTCTCGTTAGCAACA	ACTTCTTCAGAAA
San Pablo Mixtepec	sbp-1	(501)	GTTAGCAACA	ACTTCTCTGACGTCTCGTTAGCAACA	ACTTCTTCAGAAA
Playa Vicente	sbp-1	(501)	GTTAGCAACA	ACTTCTCTGACGTCTCGTTAGCAACA	ACTTCTTCAGAAA
Tepatitlán	sbp-1	(501)	GTTAGCAACA	ACTTCTCTGACGTCTCGTTAGCAACA	ACTTCTTCAGAAA
Soto la Marina	sbp-1	(501)	GTTAGCAACA	ACTTCTCTGACGTCTCGTTAGCAACA	ACTTCTTCAGAAA
Jiutepec	sbp-1	(501)	GTTAGCAACA	ACTTCTCTGACGTCTCGTTAGCAACA	ACTTCTTCAGAAA
Campeche	sbp-1	(501)	GTTAGCAACA	ACTTCTCTGACGTCTCGTTAGCAACA	ACTTCTTCAGAAA
Pungarabato	sbp-1	(462)	GTTAGCAACGGT	TTCTCTGACGTCTCGTTAGCAACA	ACTTCTTCAGCG
Tapalpa	sbp-1	(501)	GTTAGCAACA	ACTTCTCTGACGTCTCGTTAGCAACA	ACTTCTTCAGAAA
Contig 4173	sbp-1	(462)	GTTAGCAACA	ACTTCTCTGACGTCTCGTTAGCAACA	ACTTCTTCAGAAA
Seed	sbp-1	(372)	-----	-----	-----
Consensus		(501)	GTTAGCAACA	ACTTCTCTGACGTCTCGTTAGCAACA	ACTTCTTCAGAAA
			551		600
	Mexico sbp-1	(551)	TCTCATTAGCAGCGG	TTTCTTCTGAAATCTCATTAGCAGCGG	TTTCTTCTTCT
San Pablo Mixtepec	sbp-1	(551)	TCTCATTAGCAGCGG	TTTCTTCTGAAATCTCATTAGCAGCGG	TTTCTTCTTCT
Playa Vicente	sbp-1	(551)	TCTCATTAGCAGCGG	TTTCTTCTGAAATCTCATTAGCAGCGG	TTTCTTCTTCT
Tepatitlán	sbp-1	(551)	TCTCATTAGCAGCGG	TTTCTTCTGAAATCTCATTAGCAGCGG	TTTCTTCTTCT
Soto la Marina	sbp-1	(551)	TCTCATTAGCAGCGG	TTTCTTCTGAAATCTCATTAGCAGCGG	TTTCTTCTTCT
Jiutepec	sbp-1	(551)	TCTCATTAGCAGCGG	TTTCTTCTGAAATCTCATTAGCAGCGG	TTTCTTCTTCT
Campeche	sbp-1	(551)	TCTCATTAGCAGCGG	TTTCTTCTGAAATCTCATTAGCAGCGG	TTTCTTCTTCT
Pungarabato	sbp-1	(512)	TGTCGTTAGCA	ACGGTTTCTTCTGACGTCTCGTTAGCA	AACACTTCTTCTCA
Tapalpa	sbp-1	(519)	-----	-----	-----
Contig 4173	sbp-1	(512)	TCTCATTAGCA	ACTTCTTCTGACGTCTCGTTAGCA	ACTTCTTCTTCT
Seed	sbp-1	(372)	-----	-----	-----
Consensus		(551)	TCTCATTAGCAGCGG	TTTCTTCTGAAATCTCATTAGCAGCGG	TTTCTTCTTCT
			601		650
	Mexico sbp-1	(601)	GAAATCTCATTAGCA	GCGGTTTCTTCTGAAATCTCATTAGC	GACGGTTTCT
San Pablo Mixtepec	sbp-1	(601)	GAAATCTCATTAGCA	GCGGTTTCTTCTGAAATCTCATTAGC	-----
Playa Vicente	sbp-1	(601)	GAAATCTCATTAGCA	GCGGTTTCTTCTGAAATCTCATTAGC	-----
Tepatitlán	sbp-1	(601)	GAAATCTCATTAGCA	GCGGTTTCTTCTGAAATCTCATTAGC	-----
Soto la Marina	sbp-1	(601)	GAAATCTCATTAGCA	GCGGTTTCTTCTGAAATCTCATTAGC	-----
Jiutepec	sbp-1	(601)	GAAATCTCATTAGCA	GCGGTTTCTTCTGAAATCTCATTAGC	-----
Campeche	sbp-1	(601)	GAAATCTCATTAGCA	GCGGTTTCTTCTGAAATCTCATTAGC	-----
Pungarabato	sbp-1	(562)	GAAATCTCATTAGCA	GCGGTTTCTTCTGAAATCTCATTAGC	-----
Tapalpa	sbp-1	(547)	GAAATCTCATTAGCA	GCGGTTTCTTCTGAAATCTCATTAGC	-----
Contig 4173	sbp-1	(562)	GACGTTCTGTTAGCAAC	-----	AACTGATT
Seed	sbp-1	(372)	-----	-----	-----
Consensus		(601)	GAAATCTCATTAGCA	GCGGTTTCTTCTGAAATCTCATTAGC	-----
			651		700
	Mexico sbp-1	(651)	TCCTGAAATCTCATTAGC	AACGGTTTCTTCTGAAATCTCATTAGCA	ACGG
San Pablo Mixtepec	sbp-1	(642)	-----	AACGGTTTCTTCTGAAATCTCATTAGCA	GCGG
Playa Vicente	sbp-1	(642)	-----	AACGGTTTCTTCTGAAATCTCATTAGCA	-----
Tepatitlán	sbp-1	(642)	-----	AACGGTTTCTTCTGAAATCTCATTAGCA	-----
Soto la Marina	sbp-1	(642)	-----	AACGGTTTCTTCTGAAATCTCATTAGCA	-----
Jiutepec	sbp-1	(642)	-----	AACGGTTTCTTCTGAAATCTCATTAGCA	-----
Campeche	sbp-1	(642)	-----	AACGGTTTCTTCTGAAATCTCATTAGCA	-----
Pungarabato	sbp-1	(603)	-----	AACGGTTTCTTCTGAAATCTCATTAGCA	-----
Tapalpa	sbp-1	(588)	-----	AACGGTTTCTTCTGAAATCTCATTAGCA	-----
Contig 4173	sbp-1	(587)	-----	AACGGTTTCTTCTGAAATCTCATTAGCA	-----
Seed	sbp-1	(372)	-----	-----	-----
Consensus		(651)	-----	AACGGTTTCTTCTGAAATCTCATTAGCA	-----
			701		750
	Mexico sbp-1	(701)	TTTCTTCTGAAATCTCATTAGCA	ACTTCTGGGACGTCTTCGGTAGGCTCG	
San Pablo Mixtepec	sbp-1	(674)	TTTCTTCTGAAATCTCATTAGCA	ACTTCTGGGACGTCTTCGGTAGGCTCG	
Playa Vicente	sbp-1	(670)	-----	ACTTCTGGGACGTCTTCGGTAGGCTCG	
Tepatitlán	sbp-1	(670)	-----	ACTTCTGGGACGTCTTCGGTAGGCTCG	
Soto la Marina	sbp-1	(670)	-----	ACTTCTGGGACGTCTTCGGTAGGCTCG	
Jiutepec	sbp-1	(670)	-----	ACTTCTGGGACGTCTTCGGTAGGCTCG	
Campeche	sbp-1	(670)	-----	ACTTCTGGGACGTCTTCGGTAGGCTCG	
Pungarabato	sbp-1	(631)	-----	ACTTCTGGGACGTCTTCGGTAGGCTCG	
Tapalpa	sbp-1	(616)	-----	ACTTCTGGGACGTCTTCGGTAGGCTCG	
Contig 4173	sbp-1	(604)	-----	ACTTCTGGGACGTCTTCGGTAGGCTCG	A
Seed	sbp-1	(372)	-----	-----	GTCTTCGGTAGGCTCG
Consensus		(701)	-----	ACTTCTGGGACGTCTTCGGTAGGCTCG	

			751		800
	Mexico sbp-1	(751)	TCTGAACGTTCTAAAC	TTGCGTTGAGAGGCTC	AGGTGTCTCTAAACACAGG
San Pablo Mixtepec sbp-1	(724)	TCTGAACGTTCTAAAC	TTGCGTTGAGAGGCTC	AGGTGTCTCTAAACACAGG	
Playa Vicente sbp-1	(697)	TCTGAACGTTCTAAAC	TTGCGTTGAGAGGCTC	AGGTGTCTCTAAACACAGG	
Tepatitlán sbp-1	(697)	TCTGAACGTTCTAAAC	TTGCGTTGAGAGGCTC	AGGTGTCTCTAAACACAGG	
Soto la Marina sbp-1	(697)	TCTGAACGTTCTAAAC	TTGCGTTGAGAGGCTC	AGGTGTCTCTAAACACAGG	
Jiutepec sbp-1	(697)	TCTGAACGTTCTAAAC	TTGCGTTGAGAGGCTC	AGGTGTCTCTAAACACAGG	
Campeche sbp-1	(697)	TCTGAACGTTCTAAAC	TTGCGTTGAGAGGCTC	AGGTGTCTCTAAACACAGG	
Pungarabato sbp-1	(658)	TCTGAACGTTCTAAAC	TTGCGTTGAGAGGCTC	AGGTGTCTCTAAACACAGG	
Tapalpa sbp-1	(643)	TCTGAACGTTCTAAAC	TTGCGTTGAGAGGCTC	AGGTGTCTCTAAACACAGG	
Contig 4173 sbp-1	(631)	TCTGAACGTTCTAAAC	TTGCGTTGAGAGGCTC	AGGTGTCTCTAAACACAGG	
Seed sbp-1	(388)	TCTGAACGTTCTAAAC	TTGCGTTGAGAGGCTC	AGGTGTCTCTAAACACAGG	
Consensus	(751)	TCTGAACGTTCTAAAC	TTGCGTTGAGAGGCTC	AGGTGTCTCTAAACACAGG	
			801		850
	Mexico sbp-1	(801)	CGTATTCTCAACAGAATCGACATTTTCATCCACTG	ACTCCTCTACAGCGT	
San Pablo Mixtepec sbp-1	(774)	CGTATTCTCAACAGAATCGACATTTTCATCCACTG	ACTCCTCTACAGCGT		
Playa Vicente sbp-1	(747)	CGTATTCTCAACAGAATCGACATTTTCATCCACTG	ACTCCTCTACAGCGT		
Tepatitlán sbp-1	(747)	CGTATTCTCAACAGAATCGACATTTTCATCCACTG	ACTCCTCTACAGCGT		
Soto la Marina sbp-1	(747)	CGTATTCTCAACAGAATCGACATTTTCATCCACTG	ACTCCTCTACAGCGT		
Jiutepec sbp-1	(747)	CGTATTCTCAACAGAATCGACATTTTCATCCACTG	ACTCCTCTACAGCGT		
Campeche sbp-1	(747)	CGTATTCTCAACAGAATCGACATTTTCATCCACTG	ACTCCTCTACAGCGT		
Pungarabato sbp-1	(708)	CGTATTCTCAACAGAATCGACATTTTCATCCACTG	ACTCCTCTACAGCGT		
Tapalpa sbp-1	(693)	CGTATTCTCAACAGAATCGACATTTTCATCCACTG	ACTCCTCTACAGCGT		
Contig 4173 sbp-1	(681)	CGTATTCTCAACAGAATCGACATTTTCATCCACTG	ACTCCTCTACAGCGT		
Seed sbp-1	(438)	CGTATTCTCAACAGAATCGACATTTTCATCCACTG	ACTCCTCTACAGCGT		
Consensus	(801)	CGTATTCTCAACAGAATCGACATTTTCATCCACTG	ACTCCTCTACAGCGT		
			851		900
	Mexico sbp-1	(851)	CATCAGAGGCAGAGTCC	CACAGCAAGGTTGCTGT	CTCCAGCCATTTCTCTGG
San Pablo Mixtepec sbp-1	(824)	CATCAGAGGCAGAGTCC	CACAGCAAGGTTGCTGT	CTCCAGCCATTTCTCTGG	
Playa Vicente sbp-1	(797)	CATCAGAGGCAGAGTCC	CACAGCAAGGTTGCTGT	CTCCAGCCATTTCTCTGG	
Tepatitlán sbp-1	(797)	CATCAGAGGCAGAGTCC	CACAGCAAGGTTGCTGT	CTCCAGCCATTTCTCTGG	
Soto la Marina sbp-1	(797)	CATCAGAGGCAGAGTCC	CACAGCAAGGTTGCTGT	CTCCAGCCATTTCTCTGG	
Jiutepec sbp-1	(797)	CATCAGAGGCAGAGTCC	CACAGCAAGGTTGCTGT	CTCCAGCCATTTCTCTGG	
Campeche sbp-1	(797)	CATCAGAGGCAGAGTCC	CACAGCAAGGTTGCTGT	CTCCAGCCATTTCTCTGG	
Pungarabato sbp-1	(758)	CATCAGAGGCAGAGTCC	CACAGCAAGGTTGCTGT	CTCCAGCCATTTCTCTGG	
Tapalpa sbp-1	(743)	CATCAGAGGCAGAGTCC	CACAGCAAGGTTGCTGT	CTCCAGCCATTTCTCTGG	
Contig 4173 sbp-1	(731)	CATCAGAGGCAGAGTCC	CACAGCAAGGTTGCTGT	CTCCAGCCATTTCTCTGG	
Seed sbp-1	(488)	CATCAGAGGCAGAGTCC	CACAGCAAGGTTGCTGT	CTCCAGCCATTTCTCTGG	
Consensus	(851)	CATCAGAGGCAGAGTCC	CACAGCAAGGTTGCTGT	CTCCAGCCATTTCTCTGG	
			901		950
	Mexico sbp-1	(901)	TTAACACTTTCCATTGAATTCGTAGCCAC	AATGTCTTCATCAGCATTATG	
San Pablo Mixtepec sbp-1	(874)	TTAACACTTTCCATTGAATTCGTAGCCAC	AATGTCTTCATCAGCATTATG		
Playa Vicente sbp-1	(847)	TTAACACTTTCCATTGAATTCGTAGCCAC	AATGTCTTCATCAGCATTATG		
Tepatitlán sbp-1	(847)	TTAACACTTTCCATTGAATTCGTAGCCAC	AATGTCTTCATCAGCATTATG		
Soto la Marina sbp-1	(847)	TTAACACTTTCCATTGAATTCGTAGCCAC	AATGTCTTCATCAGCATTATG		
Jiutepec sbp-1	(847)	TTAACACTTTCCATTGAATTCGTAGCCAC	AATGTCTTCATCAGCATTATG		
Campeche sbp-1	(847)	TTAACACTTTCCATTGAATTCGTAGCCAC	AATGTCTTCATCAGCATTATG		
Pungarabato sbp-1	(808)	TTAACACTTTCCATTGAATTCGTAGCCAC	AATGTCTTCATCAGCATTATG		
Tapalpa sbp-1	(793)	TTAACACTTTCCATTGAATTCGTAGCCAC	AATGTCTTCATCAGCATTATG		
Contig 4173 sbp-1	(781)	TTAACACTTTCCATTGAATTCGTAGCCAC	AATGTCTTCATCAGCATTATG		
Seed sbp-1	(538)	TTAACACTTTCCATTGAATTCGTAGCCAC	AATGTCTTCATCAGCATTATG		
Consensus	(901)	TTAACACTTTCCATTGAATTCGTAGCCAC	AATGTCTTCATCAGCATTATG		
			951		1000
	Mexico sbp-1	(951)	GTCAATTGTGGATTGCATAGAGATGGATATGTCCCTTTTAAT	AACGGCTT	
San Pablo Mixtepec sbp-1	(924)	GTCAATTGTGGATTGCATAGAGATGGATATGTCCCTTTTAAT	AACGGCTT		
Playa Vicente sbp-1	(897)	GTCAATTGTGGATTGCATAGAGATGGATATGTCCCTTTTAAT	AACGGCTT		
Tepatitlán sbp-1	(897)	GTCAATTGTGGATTGCATAGAGATGGATATGTCCCTTTTAAT	AACGGCTT		
Soto la Marina sbp-1	(897)	GTCAATTGTGGATTGCATAGAGATGGATATGTCCCTTTTAAT	AACGGCTT		
Jiutepec sbp-1	(897)	GTCAATTGTGGATTGCATAGAGATGGATATGTCCCTTTTAAT	AACGGCTT		
Campeche sbp-1	(897)	GTCAATTGTGGATTGCATAGAGATGGATATGTCCCTTTTAAT	AACGGCTT		
Pungarabato sbp-1	(858)	GTCAATTGTGGATTGCATAGAGATGGATATGTCCCTTTTAAT	AACGGCTT		
Tapalpa sbp-1	(843)	GTCAATTGTGGATTGCATAGAGATGGATATGTCCCTTTTAAT	AACGGCTT		
Contig 4173 sbp-1	(831)	GTCAATTGTGGATTGCATAGAGATGGATATGTCCCTTTTAAT	AACGGCTT		
Seed sbp-1	(588)	GTCAATTGTGGATTGCATAGAGATGGATATGTCCCTTTTAAT	AACGGCTT		
Consensus	(951)	GTCAATTGTGGATTGCATAGAGATGGATATGTCCCTTTTAAT	AACGGCTT		

			1001		1050
	Mexico sbp-1	(1001)	TAGAGACCATTGCAGCTTCCTTAACCTCAGTTGCTACCTCTTCGACTTCC		
San Pablo Mixtepec	sbp-1	(974)	TAGAGACCATTGCAGCTTCCTTAACCTCAGTTGCTACCTCTTCGACTTCC		
Playa Vicente	sbp-1	(947)	TAGAGACCATTGCAGCTTCCTTAACCTCAGTTGCTACCTCTTCGACTTCC		
Tepatitlán	sbp-1	(947)	TAGAGACCATTGCAGCTTCCTTAACCTCAGTTGCTACCTCTTCGACTTCC		
Soto la Marina	sbp-1	(947)	TAGAGACCATTGCAGCTTCCTTAACCTCAGTTGCTACCTCTTCGACTTCC		
Jiutepec	sbp-1	(947)	TAGAGACCATTGCAGCTTCCTTAACCTCAGTTGCTACCTCTTCGACTTCC		
Campeche	sbp-1	(947)	TAGAGACCATTGCAGCTTCCTTAACCTCAGTTGCTACCTCTTCGACTTCC		
Pungarabato	sbp-1	(908)	TAGAGACCATTGCAGCTTCCTTAACCTCAGTTGCTACCTCTTCGACTTCC		
Tapalpa	sbp-1	(893)	TAGAGACCATTGCAGCTTCCTTAACCTCAGTTGCTACCTCTTCGACTTCC		
Contig 4173	sbp-1	(881)	TAGAGACCATTGCAGCTTCCTTAACCTCAGTTGCTACCTCTTCGACTTCC		
Seed	sbp-1	(638)	TAGAGACCATTGCAGCTTCCTTAACCTCAGTTGCTACCTCTTCGACTTCC		
Consensus		(1001)	TAGAGACCATTGCAGCTTCCTTAACCTCAGTTGCTACCTCTTCGACTTCC		
			1051		1100
	Mexico sbp-1	(1051)	GCAGTTGTCTTTTCTTCTTCAACGGCCTCTTCTGATAGCATTGCAGATGG		
San Pablo Mixtepec	sbp-1	(1024)	GCAGTTGTCTTTTCTTCTTCAACGGCCTCTTCTGATAGCATTGCAGATGG		
Playa Vicente	sbp-1	(997)	GCAGTTGTCTTTTCTTCTTCAACGGCCTCTTCTGATAGCATTGCAGATGG		
Tepatitlán	sbp-1	(997)	GCAGTTGTCTTTTCTTCTTCAACGGCCTCTTCTGATAGCATTGCAGATGG		
Soto la Marina	sbp-1	(997)	GCAGTTGTCTTTTCTTCTTCAACGGCCTCTTCTGATAGCATTGCAGATGG		
Jiutepec	sbp-1	(997)	GCAGTTGTCTTTTCTTCTTCAACGGCCTCTTCTGATAGCATTGCAGATGG		
Campeche	sbp-1	(997)	GCAGTTGTCTTTTCTTCTTCAACGGCCTCTTCTGATAGCATTGCAGATGG		
Pungarabato	sbp-1	(958)	GCAGTTGTCTTTTCTTCTTCAACGGCCTCTTCTGATAGCATTGCAGATGG		
Tapalpa	sbp-1	(943)	GCAGTTGTCTTTTCTTCTTCAACGGCCTCTTCTGATAGCATTGCAGATGG		
Contig 4173	sbp-1	(931)	GCAGTTGTCTTTTCTTCTTCAACGGCCTCTTCTGATAGCATTGCAGATGG		
Seed	sbp-1	(688)	GCAGTTGTCTTTTCTTCTTCAACGGCCTCTTCTGATAGCATTGCAGATGG		
Consensus		(1051)	GCAGTTGTCTTTTCTTCTTCAACGGCCTCTTCTGATAGCATTGCAGATGG		
			1101		1150
	Mexico sbp-1	(1101)	CTCAACTTCCTCGGTAACCGACTTGTCAATTCACGTCCTCACCCATGGGGT		
San Pablo Mixtepec	sbp-1	(1074)	CTCAACTTCCTCGGTAACCGACTTGTCAATTCACGTCCTCACCCATGGGGT		
Playa Vicente	sbp-1	(1047)	CTCAACTTCCTCGGTAACCGACTTGTCAATTCACGTCCTCACCCATGGGGT		
Tepatitlán	sbp-1	(1047)	CTCAACTTCCTCGGTAACCGACTTGTCAATTCACGTCCTCACCCATGGGGT		
Soto la Marina	sbp-1	(1047)	CTCAACTTCCTCGGTAACCGACTTGTCAATTCACGTCCTCACCCATGGGGT		
Jiutepec	sbp-1	(1047)	CTCAACTTCCTCGGTAACCGACTTGTCAATTCACGTCCTCACCCATGGGGT		
Campeche	sbp-1	(1047)	CTCAACTTCCTCGGTAACCGACTTGTCAATTCACGTCCTCACCCATGGGGT		
Pungarabato	sbp-1	(1008)	CTCAACTTCCTCGGTAACCGACTTGTCAATTCACGTCCTCACCCATGGGGT		
Tapalpa	sbp-1	(993)	CTCAACTTCCTCGGTAACCGACTTGTCAATTCACGTCCTCACCCATGGGGT		
Contig 4173	sbp-1	(981)	CTCAACTTCCTCGGTAACCGACTTGTCAATTCACGTCCTCACCCATGGGGT		
Seed	sbp-1	(738)	CTCAACTTCCTCGGTAACCGACTTGTCAATTCACGTCCTCACCCATGGGGT		
Consensus		(1101)	CTCAACTTCCTCGGTAACCGACTTGTCAATTCACGTCCTCACCCATGGGGT		
			1151		1200
	Mexico sbp-1	(1151)	CTGCTGGCTCGTCATGTTTCGACAGCAGCCTCAACCGCTTCATGGGATATG		
San Pablo Mixtepec	sbp-1	(1124)	CTGCTGGCTCGTCATGTTTCGACAGCAGCCTCAACCGCTTCATGGGATATG		
Playa Vicente	sbp-1	(1097)	CTGCTGGCTCGTCATGTTTCGACAGCAGCCTCAACCGCTTCATGGGATATG		
Tepatitlán	sbp-1	(1097)	CTGCTGGCTCGTCATGTTTCGACAGCAGCCTCAACCGCTTCATGGGATATG		
Soto la Marina	sbp-1	(1097)	CTGCTGGCTCGTCATGTTTCGACAGCAGCCTCAACCGCTTCATGGGATATG		
Jiutepec	sbp-1	(1097)	CTGCTGGCTCGTCATGTTTCGACAGCAGCCTCAACCGCTTCATGGGATATG		
Campeche	sbp-1	(1097)	CTGCTGGCTCGTCATGTTTCGACAGCAGCCTCAACCGCTTCATGGGATATG		
Pungarabato	sbp-1	(1058)	CTGCTGGCTCGTCATGTTTCGACAGCAGCCTCAACCGCTTCATGGGATATG		
Tapalpa	sbp-1	(1043)	CTGCTGGCTCGTCATGTTTCGACAGCAGCCTCAACCGCTTCATGGGATATG		
Contig 4173	sbp-1	(1031)	CTGCTGGCTCGTCATGTTTCGACAGCAGCCTCAACCGCTTCATGGGATATG		
Seed	sbp-1	(788)	CTGCTGGCTCGTCATGTTTCGACAGCAGCCTCAACCGCTTCATGGGATATG		
Consensus		(1151)	CTGCTGGCTCGTCATGTTTCGACAGCAGCCTCAACCGCTTCATGGGATATG		
			1201		1250
	Mexico sbp-1	(1201)	GGGCTAATTTTCTCGGTTTCCTGAGCCAAAGATGACCTCCTCATCGGCTTC		
San Pablo Mixtepec	sbp-1	(1174)	GGGCTAATTTTCTCGGTTTCCTGAGCCAAAGATGACCTCCTCATCGGCTTC		
Playa Vicente	sbp-1	(1147)	GGGCTAATTTTCTCGGTTTCCTGAGCCAAAGATGACCTCCTCATCGGCTTC		
Tepatitlán	sbp-1	(1147)	GGGCTAATTTTCTCGGTTTCCTGAGCCAAAGATGACCTCCTCATCGGCTTC		
Soto la Marina	sbp-1	(1147)	GGGCTAATTTTCTCGGTTTCCTGAGCCAAAGATGACCTCCTCATCGGCTTC		
Jiutepec	sbp-1	(1147)	GGGCTAATTTTCTCGGTTTCCTGAGCCAAAGATGACCTCCTCATCGGCTTC		
Campeche	sbp-1	(1147)	GGGCTAATTTTCTCGGTTTCCTGAGCCAAAGATGACCTCCTCATCGGCTTC		
Pungarabato	sbp-1	(1108)	GGGCTAATTTTCTCGGTTTCCTGAGCCAAAGATGACCTCCTCATCGGCTTC		
Tapalpa	sbp-1	(1093)	GGGCTAATTTTCTCGGTTTCCTGAGCCAAAGATGACCTCCTCATCGGCTTC		
Contig 4173	sbp-1	(1081)	GGGCTAATTTTCTCGGTTTCCTGAGCCAAAGATGACCTCCTCATCGGCTTC		
Seed	sbp-1	(838)	GGGCTAATTTTCTCGGTTTCCTGAGCCAAAGATGACCTCCTCATCGGCTTC		
Consensus		(1201)	GGGCTAATTTTCTCGGTTTCCTGAGCCAAAGATGACCTCCTCATCGGCTTC		

			1251		1300
	Mexico sbp-1	(1251)	GGGATTTGGCACTCAGAAATAAGTCTTCTGCCGTAACGCTGAGAGGTT		
San Pablo Mixtepec	sbp-1	(1224)	GGGATTTGGCACTCAGAAATAAGTCTTCTGCCGTAACGCTGAGAGGTT		
Playa Vicente	sbp-1	(1197)	GGGATTTGGCACTCAGAAATAAGTCTTCTGCCGTAACGCTGAGAGGTT		
Tepatitlán	sbp-1	(1197)	GGGATTTGGCACTCAGAAATAAGTCTTCTGCCGTAACGCTGAGAGGTT		
Soto la Marina	sbp-1	(1197)	GGGATTTGGCACTCAGAAATAAGTCTTCTGCCGTAACGCTGAGAGGTT		
Jiutepec	sbp-1	(1197)	GGGATTTGGCACTCAGAAATAAGTCTTCTGCCGTAACGCTGAGAGGTT		
Campeche	sbp-1	(1197)	GGGATTTGGCACTCAGAAATAAGTCTTCTGCCGTAACGCTGAGAGGTT		
Pungarabato	sbp-1	(1158)	GGGATTTGGCACTCAGAAATAAGTCTTCTGCCGTAACGCTGAGAGGTT		
Tapalpa	sbp-1	(1143)	GGGATTTGGCACTCAGAAATAAGTCTTCTGCCGTAACGCTGAGAGGTT		
Contig 4173	sbp-1	(1131)	GGGATTTGGCACTCAGAAATCAAGTCTTCTGCCGTAACGCTGAGAGGTT		
Seed	sbp-1	(888)	GGGATTTGGCACTCAGAAATAAGTCTTCTGCCGTAACGCTGAGAGGTT		
Consensus		(1251)	GGGATTTGGCACCTCAGAAATAAGTCTTCTGCCGTAACGCTGAGAGGTT		
			1301		1350
	Mexico sbp-1	(1301)	CCTGCGCAACAAGTGCCGCTTCGCTCTCTACGCCCTTGCTCTACTCCG		
San Pablo Mixtepec	sbp-1	(1274)	CCTGCGCAACAAGTGCCGCTTCGCTCTCTACGCCCTTGCTCTACTCCG		
Playa Vicente	sbp-1	(1247)	CCTGCGCAACAAGTGCCGCTTCGCTCTCTACGCCCTTGCTCTACTCCG		
Tepatitlán	sbp-1	(1247)	CCTGCGCAACAAGTGCCGCTTCGCTCTCTACGCCCTTGCTCTACTCCG		
Soto la Marina	sbp-1	(1247)	CCTGCGCAACAAGTGCCGCTTCGCTCTCTACGCCCTTGCTCTACTCCG		
Jiutepec	sbp-1	(1247)	CCTGCGCAACAAGTGCCGCTTCGCTCTCTACGCCCTTGCTCTACTCCG		
Campeche	sbp-1	(1247)	CCTGCGCAACAAGTGCCGCTTCGCTCTCTACGCCCTTGCTCTACTCCG		
Pungarabato	sbp-1	(1208)	CCTGCGCAACAAGTGCCGCTTCGCTCTCTACGCCCTTGCTCTACTCCG		
Tapalpa	sbp-1	(1193)	CCTGCGCAACAAGTGCCGCTTCGCTCTCTACGCCCTTGCTCTACTCCG		
Contig 4173	sbp-1	(1181)	CCTGCGCAACAAGTGCCGCTTCGCTCTCTACGCCCTTGCTCTACTCCG		
Seed	sbp-1	(938)	CCTGCGCAACAAGTGCCGCTTCGCTCTCTACGCCCTTGCTCTACTCCG		
Consensus		(1301)	CCTGCGCAACAAGTGCCGCTTCGCTCTCTACGCCCTTGCTCTACTCCG		
			1351		1398
	Mexico sbp-1	(1351)	GTGGCATCCAATTCATCGTCTACCTGCTCCAACACTTCAGAATCGTAG		
San Pablo Mixtepec	sbp-1	(1324)	GTGGCATCCAATTCATCGTCTACCTGCTCCAACACTTCAGAATCGTAG		
Playa Vicente	sbp-1	(1297)	GTGGCATCCAATTCATCGTCTACCTGCTCCAACACTTCAGAATCGTAG		
Tepatitlán	sbp-1	(1297)	GTGGCATCCAATTCATCGTCTACCTGCTCCAACACTTCAGAATCGTAG		
Soto la Marina	sbp-1	(1297)	GTGGCATCCAATTCATCGTCTACCTGCTCCAACACTTCAGAATCGTAG		
Jiutepec	sbp-1	(1297)	GTGGCATCCAATTCATCGTCTACCTGCTCCAACACTTCAGAATCGTAG		
Campeche	sbp-1	(1297)	GTGGCATCCAATTCATCGTCTACCTGCTCCAACACTTCAGAATCGTAG		
Pungarabato	sbp-1	(1258)	GTGGCATCCAATTCATCGTCTACCTGCTCCAACACTTCAGAATCGTAG		
Tapalpa	sbp-1	(1243)	GTGGCATCCAATTCATCGTCTACCTGCTCCAACACTTCAGAATCGTAG		
Contig 4173	sbp-1	(1231)	GTGGCATCCAATTCATCGTCTACCTGCTCCAACACTTCAGAATCGTAG		
Seed	sbp-1	(988)	GTGGCATCCAATTCATCGTCTACCTGCTCCAACACTTCAGAATCGTAG		
Consensus		(1351)	GTGGCATCCAATTCATCGTCTACCTGCTCCAACACTTCAGAATCGTAG		

Figura 9. Alineamiento múltiple de las secuencias del gen *sbp-1* de aislados mexicanos de *Babesia bigemina*. El color amarillo indica una misma base para esa posición en todas las secuencias, el color azul indica la base que predomina en una posición y la ausencia de color indica una base no predominante en una posición.

Cuadro 6. Número de repetidos presentes en las secuencias del gen *sbp-1*

Población	Número de repetidos detectados
Cepa México	14 repetidos
San Pablo Mixtepec	13 repetidos
Playa Vicente	12 repetidos
Tepatitlán	12 repetidos
Soto la Marina	12 repetidos
Jiutepec	12 repetidos
Campeche	12 repetidos
Pungarabato	11 repetidos
Tapalpa	10 repetidos
Cepa Seed	No se detectaron repetidos

La secuencia de la cepa México fue la que contenía el mayor número de repetidos con 14, mientras que la cepa vacunal Seed no presentó ningún repetido, esto se encuentra relacionado con la variación que existe entre ambas secuencias, ya que Seed no presentó la región variable. El grupo conformado por Playa Vicente, Tepatitlán, Soto la Marina, Jiutepec y Campeche presentaron un patrón de 12 repetidos, Pungarabato presentó 11 repetidos y para el aislado Tapalpa se identificaron 10 repetidos. La composición de repetidos para cada secuencia analizada varió tanto en el número de repetidos, así como en la composición de la secuencia de los repetidos. Con la variabilidad que existe en los repetidos, se identificaron distintos patrones de secuencia que se enlistan en el cuadro 7.

El enlistado de secuencias muestra la variación que existe entre ellas a nivel nucleotídico, así como en su longitud. La longitud predominante de los repetidos fue de 27 nucleótidos, sin embargo, para la secuencia del repetido λ la longitud es de 33 nucleótidos. Es posible identificar nucleótidos conservados en la misma posición en cada secuencia, no obstante cada secuencia presenta variaciones con respecto a las demás. Con la secuencia definida para cada repetido, se realizó el arreglo de las secuencias de repetidos para cada aislado.

Esto permitió diferenciar el genotipo que presentaba cada uno de los aislados (Cuadro 8).

Cuadro 7. Secuencias de los distintos repetidos identificados en las secuencias del gen *sbp-1* de *Babesia bigemina* en las poblaciones de parásitos mexicanos.

Número	Nombre	Secuencia
1	α	TCATTAGCAACGGTTTCTTCTGACGTC
2	β	TCATTAGCAACGGTTTCTTCTGAAATG
3	γ	TCATTAGCAACAACACTTCTTCTGACGTC
4	δ	TCATTAGCAACAACACTTCTTCAGAAATC
5	ε	TCATTAGCAACGGTTTCTTCTGACGTG
6	ξ	TCGTTAGCAACGGTTTCTTCTGACGTG
7	η	TCGTTAGCAACAACACTTCTTCTGACGTG
8	θ	TCGTTAGCAACAACACTTCTTCAGAAATC
9	ι	TCATTAGCAGCGGTTTCTTCTGAAATC
10	κ	TCATTAGCAACGGTTTCTTCTGAAATC
11	λ	TCATTAGCAACTTCTGGGACATCTTCGGTAGGC
12	μ	TCATTTGCAACGATTTCTTCTGAAATC
13	ν	TCATTAGCAACGGTTGCTTCTGACGTC
14	ρ	TCATTAGCGACGGTTTCTCCTGAAATC
15	σ	TCGTTAGCAACAACACTTCTTCTGACGTC
16	τ	TCATTAGCAGCGGTTTCTTCAGAAATC

El patrón de repetidos presentó un arreglo que consistió en una base muy marcada de secuencias comprendida por “κ”, “λ”, “μ”, “λ”, “δ”, “ν”, “σ”, “θ”, “ι” y “κ”. Partiendo de esta base, se fueron desprendiendo variaciones que consistieron en repetición de secuencias o ausencia de algunas secuencias de los repetidos como en los casos de la cepa México y del aislado Tapalpa, respectivamente. Dos patrones de secuencia que resultan notorios son los observados en las secuencias Pungarabato y Seed. En la primera, el patrón de repetidos es distinto a la base antes mencionada y fue de quien mayor

diversidad de secuencias de repetidos se generaron mientras que en la segunda, donde a pesar de que el análisis de búsqueda de secuencias de repetidos no genera ningún resultado, es posible identificar la secuencia “κ” en la misma posición que en las demás secuencias.

Cuadro 8. Arreglo de repetidos de las secuencias del gen *sbp-1* de las distintas poblaciones de parásitos mexicanos.

Población de parásitos	Número de repetidos	Patrón de repetidos
México	14	κ λ μ λ δ ν γ θ ι ι ρ κ κ
San Pablo Mixtepec	13	κ λ μ λ δ ν σ θ ι ι κ κ ι
Playa Vicente	12	κ λ μ λ δ ν σ θ τ ι κ κ
Tepatitlán	12	κ λ μ λ δ ν σ θ τ ι ι κ
Jiutepec	12	κ λ μ λ δ ν σ θ ι ι κ κ
Campeche	12	κ λ μ λ δ ν σ θ ι ι κ κ
Soto la Marina	12	κ λ μ λ δ ν σ θ ι ι κ κ
Pungarabato	11	β α γ δ ε ξ η ξ θ ι κ
Tapalpa	10	κ λ μ λ δ ν θ ι ι κ
Seed	No existen repetidos	κ

Obtención de la secuencia de la proteína predicha del gen *sbp-1* de *Babesia bigemina*.

La secuencia de aminoácidos se obtuvo de cada secuencia de nucleótidos del gen *sbp-1* y se observó un patrón de longitud que varió entre los aislados, siendo la secuencia de la cepa México en la que se identificó mayor longitud con 466 aminoácidos y la cepa vacunal Seed la que mostró el menor número de aminoácidos con 345 (Cuadro 9). El grupo comprendido por los aislados Playa Vicente, Tepatitlán, Soto la Marina, Jiutepec y Campeche presentaron secuencias de 448 aminoácidos mientras que los aislados San Pablo Mixtepec, Pungarabato y Tapalpa cuentan con 457, 435 y 430 aminoácidos respectivamente. Con las secuencias de la proteína predicha se realizó el alineamiento múltiple correspondiente para analizar si la variación

que se encontró con las secuencias nucleotídicas, se conserva a nivel de aminoácidos.

Cuadro 9. Longitud de la proteína SBP-1 en 10 poblaciones de parásitos de *Babesia bigemina*.

Población de parásitos	Longitud de la secuencia
México	466
San Pablo Mixtepec	457
Tepatitlán	448
Jiutepec	448
Campeche	448
Playa Vicente	448
Soto la Marina	448
Pungarabato	435
Tapalpa	430
Seed	345

Alineamiento múltiple de las secuencias de la proteína SBP-1 de los aislados y cepas mexicanas.

El alineamiento múltiple realizado con el programa BioEdit (7.0.1) muestra la variación entre la secuencia de la proteína predicha SBP-1 entre los distintos aislados (Figura 10).

El alineamiento obtenido con las secuencias de las proteínas predichas para cada aislado se realizó de manera manual y el resultado coincide con el obtenido a nivel nucleotídico. Se observan dos regiones conservadas al inicio y al final de las proteínas y una región polimórfica en la parte central. La región que presenta el polimorfismo se encuentra de la posición 115 a la 240, donde es posible identificar inserciones y/o deleciones y variaciones puntuales de aminoácidos. En la posición 408 se identificó un codón de paro que solamente no se encuentra presente en el aislado Pungarabato, ni en la secuencia del contig obtenida del genoma de *Babesia bigemina*. No obstante, el codón de

pero antes reportado (Mosqueda *et al* 2007) corresponde a la posición 406, en donde está presente en todas las secuencias de aminoácidos.

```

          10      20      30      40      50
Mexico SBP-1      MSKSVSSARDVDSTGVTSDSKGIPTGTDPELLFSORGEACGWGGIETSAGS
San Pablo Mixtepec SBP-1
Tepatitlan SBP-1
Jiutepec SBP-1
Campeche SBP-1
Playa Vicente SBP-1
Soto la Marina
Pungarabato SBP-1      .R. . . . . I. . . . .
Tapalpa SBP-1
Seed SBP-1
Contig 4173 SBP-1      . . . . . I. . . . .

          60      70      80      90     100
Mexico SBP-1      ERVALRVLRGNTLSSSAIGITFSSGABESAYVSPEDISQTSAKSGDGHDAT
San Pablo Mixtepec SBP-1
Tepatitlan SBP-1
Jiutepec SBP-1
Campeche SBP-1
Playa Vicente SBP-1
Soto la Marina
Pungarabato SBP-1      . . S. . . . . V. . . . . H. . . . .
Tapalpa SBP-1
Seed SBP-1
Contig 4173 SBP-1      . . S. . . . . A. . . . . SH. . . . .

          110     120     130     140     150
Mexico SBP-1      FWSTSNDSLATVSSSEISLATSGTSSVGSFATISSEISLATSGTSSVGSLL
San Pablo Mixtepec SBP-1
Tepatitlan SBP-1
Jiutepec SBP-1
Campeche SBP-1
Playa Vicente SBP-1
Soto la Marina
Pungarabato SBP-1      . . . . . M. . . . .
Tapalpa SBP-1
Seed SBP-1
Contig 4173 SBP-1      . . . . . T. . . . .

          160     170     180     190     200
Mexico SBP-1      ATTSSEISLATVASDVSLATTSSDVSLATTSSSEISLAAVSSEISLAAVSS
San Pablo Mixtepec SBP-1
Tepatitlan SBP-1
Jiutepec SBP-1
Campeche SBP-1
Playa Vicente SBP-1
Soto la Marina
Pungarabato SBP-1      . V. DV. . . TS. . . . . EI. . . V. DV. . T. DV. . TT.
Tapalpa SBP-1      . . . . . EI. . AV. . . . . T.
Seed SBP-1
Contig 4173 SBP-1      ~~~~~ . . A. S. EI. . AV. EI. . I. . . . TI. . . . TI.

```

	210	220	230	240	250
Mexico SBP-1	EISLAAVSS	EISLATVSP	EISLATVSS	EISLATVSS	EISLATSGTSSVGS
San Pablo Mixtepec SBP-1T.....S.....A.....
Tepatitlan SBP-1S.....
Jiutepec SBP-1T.....S.....
Campeche SBP-1T.....S.....
Playa Vicente SBP-1S.....
Soto la MarinaT.....S.....
Pungarabato SBP-1	DV...T...DV...	T.S.....A.....
Tapalpa SBP-1
Seed SBP-1
Contig 4173 SBP-1	...ETI.....	I.SDV...I..	DV...TD.
	260	270	280	290	300
Mexico SBP-1	SERSKLALRGS	GVSNTE	GVFSTESTFS	SDSSTASSE	AESTARLLSPAISW
San Pablo Mixtepec SBP-1
Tepatitlan SBP-1G.....
Jiutepec SBP-1A.....
Campeche SBP-1
Playa Vicente SBP-1
Soto la Marina
Pungarabato SBP-1
Tapalpa SBP-1
Seed SBP-1
Contig 4173 SBP-1V.....K.....T.....
	310	320	330	340	350
Mexico SBP-1	LTLSEFVATM	SSSALWSIV	DCIEMDMS	LLITALE	TIAASLTSVATSSTS
San Pablo Mixtepec SBP-1
Tepatitlan SBP-1
Jiutepec SBP-1
Campeche SBP-1
Playa Vicente SBP-1
Soto la Marina
Pungarabato SBP-1
Tapalpa SBP-1
Seed SBP-1
Contig 4173 SBP-1
	360	370	380	390	400
Mexico SBP-1	AWFSSSTASS	DSIADG	STSSVTD	LSFTSSPM	GGAAGSSCSTAASWDM
San Pablo Mixtepec SBP-1
Tepatitlan SBP-1
Jiutepec SBP-1
Campeche SBP-1
Playa Vicente SBP-1
Soto la Marina
Pungarabato SBP-1
Tapalpa SBP-1
Seed SBP-1
Contig 4173 SBP-1

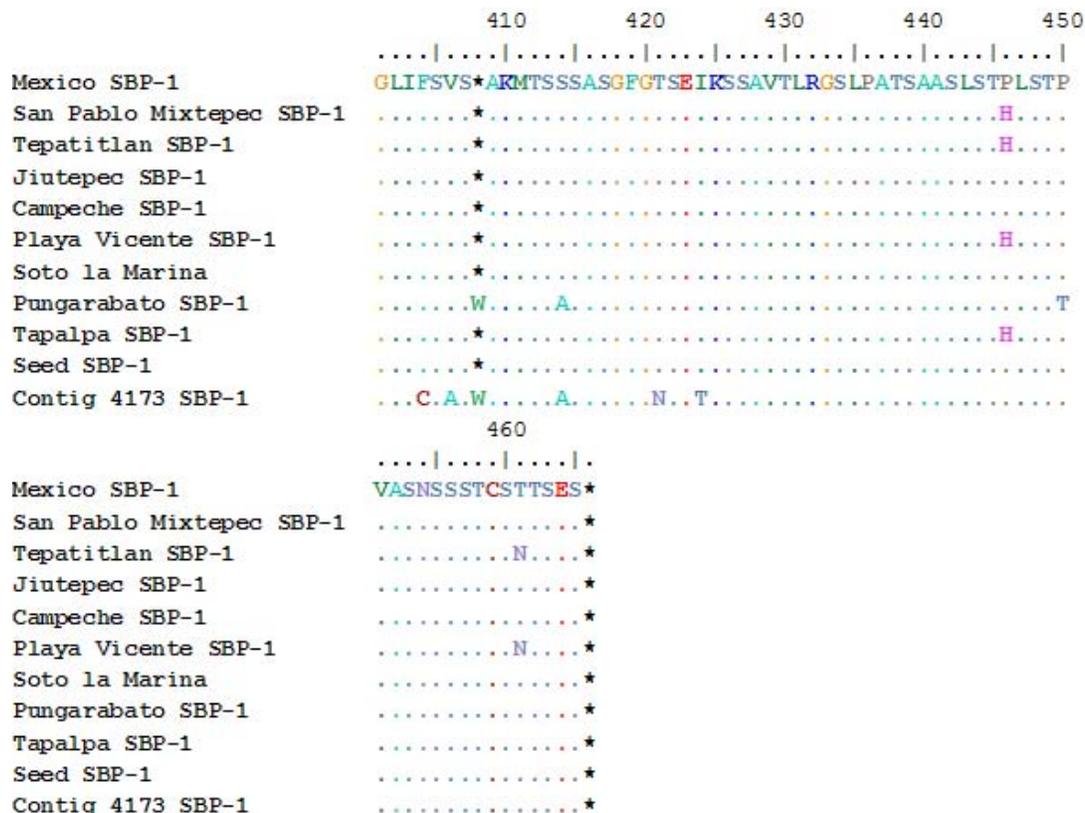


Figura 10. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína predicha SBP-1 de *Babesia bigemina*. El alineamiento múltiple realizado en el programa BioEdit 7.0.5.2 muestra los puntos variables en la secuencia de aminoácidos. Los aminoácidos se muestran en nomenclatura iupac, (.) significa un mismo aminoácido para dicha posición, (~) significa ausencia de aminoácido de la secuencia en dicha posición, y cuando existe un aminoácido distinto en una posición se utiliza su nomenclatura.

Identificación de los repetidos en tandem en las secuencias de aminoácidos de la proteína predicha SBP-1 de *Babesia bigemina*.

Utilizando la secuencia de aminoácidos obtenida para cada secuencia de ADN se realizó el mismo análisis de repetidos en tandem. El análisis se realizó manualmente considerando el arreglo obtenido de las secuencias de

ADN y se lograron identificar 10 secuencias distintas que conformaron los distintos patrones de repetidos (Cuadro 10)

Cuadro 10. Secuencias de los distintos repetidos identificados en las secuencias de la proteína SBP-1 de *Babesia bigemina* en las poblaciones de parásitos mexicanos.

Número	Nombre	Secuencia
1	A	SLATVSSEI
2	B	SLATSGTSSVG
3	C	SFATISSEI
4	D	SLATTSSEI
5	E	SLATVASDV
6	F	SLATTSSDV
7	G	SLAAVSSEI
8	H	SLATVSPEI
9	I	SLATVSSEM
10	J	SLATVSSDV

Cuadro 11. Arreglo de repetidos de las secuencias de la proteína SBP-1 de las distintas poblaciones de parásitos mexicanos.

Población de parásitos	Número de repetidos	Patrón de repetidos
México	14	ABCBDEFDHHHIAA
San Pablo Mixtepec	13	ABCBDEFDHHAAH
Playa Vicente	12	ABCBDEFDHHHA
Tepatitlán	12	ABCBDEFDHHHA
Jiutepec	12	ABCBDEFDHHHA
Campeche	12	ABCBDEFDHHHA
Soto la Marina	12	ABCBDEFDHHHA
Pungarabato	11	JKFDKKFKDHA
Tapalpa	10	ABCBDEDHHA
Seed	No existen repetidos	A

Las secuencias de los repetidos presentaron un arreglo similar al obtenido con los nucleótidos, partiendo de una base general comprendida por los aminoácidos “S”, “L”, “A”, “T”, “V”, “S”, “S”, “E” e “I”, con algunas sustituciones y variaciones en longitud. Las secuencias de los repetidos se basaron en un arreglo de 9 aminoácidos en 9 de las secuencias (Las secuencias denominadas A, C, D, E, F, G, H, I y J; Cuadro 10) y una secuencia de 11 aminoácidos (La secuencia denominada B; Cuadro 10). Con las secuencias de los repetidos identificadas, se determinó el patrón de repetidos de cada una de las secuencias el cual se muestra en el cuadro 11.

El arreglo de los repetidos partió de una base comprendida por las secuencias “A”, “B”, “C”, “D”, “E”, “F” y “H” que variaban en la frecuencia en que se presentaban, siendo caso particular a secuencia del aislado Pungarabato, donde el patrón de los repetidos fue completamente distinto al de las demás secuencias. Para el caso de la secuencia de Seed, no se identificaron repetidos sin embargo, en su secuencia se identificó al repetido “A”.

Amplificación de la región variable del gen *sbp-1* de los aislados de *Babesia bigemina*.

Con el resultado de la presencia de transcritos del gen con los iniciadores *sbp-1* int Fa y *sbp-1* int Ra, se confirmó la amplificación de los fragmentos de la región variable, donde se presentan los repetidos en tandeo del gen. El tamaño del fragmento obtenido para cada una de las poblaciones de parásitos se muestra en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Fragmento amplificado con los iniciadores que flanquean la región variable del gen *sbp-1* de *Babesia bigemina*.

Nombre	Posición de inicio del iniciador <i>sbp-1</i> int Fa	Posición del final del iniciador <i>sbp-1</i> int Ra	Longitud del amplicón
Cepa México	284	864	580
San Pablo Mixtepec	284	837	553
Playa Vicente	284	810	526
Tepatitlán	284	810	526
Soto la Marina	284	810	526
Jiutepec	284	810	526
Campeche	284	810	526
Pungarabato	284	771	487
Tapalpa	284	756	472
Cepa Seed	284	501	217

Con los iniciadores que *sbp-1* intFa y *sbp-1* intRa se calcula una amplificación de 580 pb para la cepa México y un fragmento de 217 pb para la cepa vacunal Seed. Esta diferencia es muy notoria y fácil de identificar en un simple gel de agarosa al 2%. Con respecto al aislado San Pablo Mixtepec, se espera obtener un fragmento de 553 pb, mientras que para el grupo comprendido por Playa Vicente, Tepatitlán, Soto la Marina, Jiutepec y Campeche se espera una amplificación de 526 pb, para el aislado Pungarabato se esperaba un fragmento amplificado de 487 pb y para Tapalpa de 472 pb. La Figura 10 muestra el resultado obtenido de la amplificación de la región variable del gen *sbp-1*, para cada una de las poblaciones de parásitos

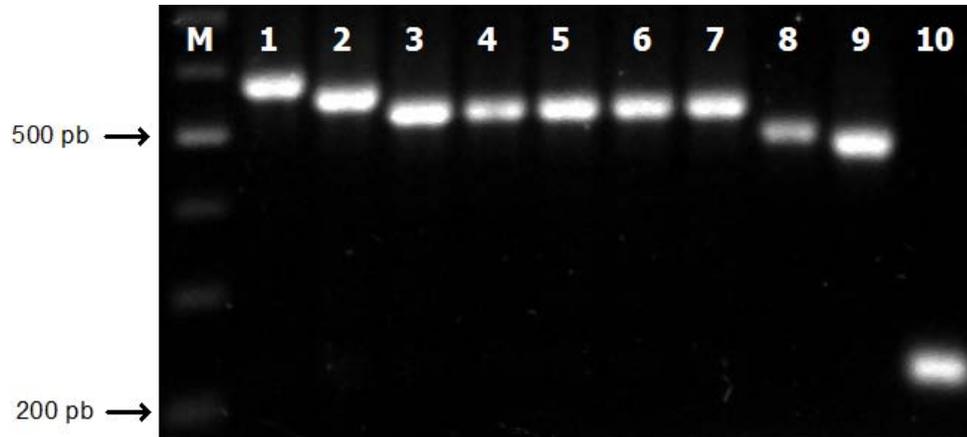


Figura 11. Amplificación de la región variable del gen *sbp-1* en diez poblaciones de *Babesia bigemina*. Carriles 1 y 10 muestran los amplicones obtenidos de las cepas México y Seed. Carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 muestran los amplicones obtenidos de los aislados San Pablo Mixtepec, Playa Vicente, Tepatitlán, Soto la Marina, Jiutepec, Campeche, Pungarabato y Tapalpa, respectivamente.

El resultado de la amplificación de la región variable del gen *sbp-1* en los distintos aislados, coincidió con los tamaños esperados (Cuadro 12). La figura 11 muestra el arreglo de los amplicones para cada una de las poblaciones. El resultado muestra que la electroforesis en geles de agarosa al 2% permite diferenciar entre las poblaciones que presentan variación en longitud de secuencia. La diferencia más marcada es la que existe entre las cepas México y Seed (Figura 11. Carriles 1 y 10, respectivamente). De igual manera, la diferencia existente entre la cepa México y la cepa Seed con respecto a todos los aislados permite hacer una diferenciación con los presentes resultados evaluados por electroforesis.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.

En la actualidad, el estudio de antígenos que permitan diferenciar entre distintas poblaciones de parásitos ha sido un factor importante para el desarrollo de análisis epidemiológicos y de distribución geográfica de enfermedades. Los estudios destinados a identificar las diferencias entre poblaciones se han basado en el uso de marcadores moleculares que presentan polimorfismos y que son conservados.

El gen *sbp-1* de *Babesia bovis* ha sido analizado y dentro de las características observadas, mostró polimorfismo entre poblaciones de distintas zonas geográficas (Hines *et al.* 1995). Posteriormente, se mostró que *sbp-1* era conservado a través de pases seriados en bovinos y también cuando se alternaron pases en bovino y garrapata (Lew *et al.* 1997b, Bock *et al.* 2000). Estas características hacen a *sbp-1* un candidato ideal para el diseño de marcadores moleculares. Debido al polimorfismo mostrado por el gen *sbp-1* en *Babesia bovis*, Lew *et al.* en 1997 realizaron estudios de diferenciación de poblaciones utilizando el polimorfismo del gen como marcador molecular, lo cual les permitió diferenciar entre distintas poblaciones de parásitos. En 2006 Mosqueda *et al.*, identificaron una secuencia de ADN en el genoma de *Babesia bigemina* que presentó homología con el gen *sbp-1* de *Babesia bovis*. Esto propone al gen *sbp-1* de *Babesia bigemina* para usarse en el desarrollo de marcadores que permitan identificar poblaciones de parásitos usando técnicas moleculares. Por tal motivo, en el presente trabajo se planteó como objetivo general discriminar aislados mexicanos de *Babesia bigemina* utilizando técnicas de biología molecular utilizando la secuencia que codifica al gen *sbp-1*.

Se comprobó la transcripción del gen *sbp-1* de *Babesia bigemina* utilizando la técnica RT-PCR obteniendo amplicones de tamaño esperado. Como control positivo, se analizó una muestra de ARN purificado a partir de eritrocitos infectados que fueron obtenidos de un bovino inoculado con la cepa de desafío México (Figura 6, Carril 1); la misma muestra de ARN fue analizada sin la adición de transcriptasa reversa para confirmar la no contaminación con

ADN (Figura 6, Carril 2) para evitar resultados que se interpretarían como falsos positivos. Con este análisis se concluye que *sbp-1* es un gen y que se transcribe en estadios del parásito que se desarrollan en el hospedero bovino.

Como primer objetivo del proyecto se plateó amplificar, clonar y secuenciar el gen *sbp-1* de ADN de 10 aislados mexicanos de *Babesia bigemina*. Actualmente se ha reportado la amplificación del gen *sbp-1* de *Babesia bigemina* a partir de una cepa mexicana (Mosqueda *et al* 2006). La misma metodología descrita para la amplificación de *sbp-1*, se utilizó para la amplificación del gen a partir de las 10 poblaciones de parásitos de *Babesia bigemina* evaluadas en el presente trabajo. El resultado obtenido a partir de la amplificación de un fragmento, utilizando los iniciadores (Cuadro 2) y el protocolo de ciclado específicos (Figura 3), mostró un amplicón de 1500 pb, tamaño correspondiente al reportado por los autores antes mencionados lo que confirma la amplificación del gen *sbp-1* a partir de eritrocitos infectados de *Babesia bigemina* (Figura 7).

La clonación molecular del gen se realizó con un kit comercial y consistió en la transformación de células utilizando un plásmido conteniendo al gen *sbp-1* como inserto. Las células transformadas se seleccionaron para obtener poblaciones clonales y posteriormente se crecieron en un medio líquido. La purificación del ADN plasmídico se realizó a partir de las células conteniendo el plásmido con el gen insertado y para determinar la presencia de *sbp-1* se realizó un análisis de restricción enzimática. El análisis consistió en incubar el ADN purificado con la enzima de restricción EcoRI y después se analizó la muestra mediante electroforesis en gel de agarosa adicionado con bromuro de etidio. El resultado del análisis de las muestras conteniendo el ADN plasmídico con el inserto de *sbp-1* mostró dos fragmentos en el gel que se observan a una altura de 900 pb y de 600 pb que en suma dan el valor del tamaño amplificado inicialmente con el PCR, lo que nos indica la presencia de un sitio de restricción para EcoRI, con esto se confirma la clonación molecular del gen *sbp-1* de *Babesia bigemina*.

La secuenciación de los fragmentos clonados se realizó en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional

Autónoma de México. Las secuencias obtenidas se compararon con la reportada en el genoma de *Babesia bigemina* en el contig 4173 correspondiente al gen *sbp-1*. La comparación sirvió para obtener la secuencia completa del gen y confirmar que la secuencia correspondiera a *sbp-1* de *Babesia bigemina*. Los resultados obtenidos de la secuenciación confirmaron la variación existente entre los aislados observada con la amplificación mediante el PCR. Las secuencias mostraron variación en número de nucleótidos (Cuadro 5) donde la mayor longitud la mostró la secuencia de la cepa México con 1398pb mientras que la secuencia de menor longitud fue de la cepa Seed con 1035pb. Las distintas longitudes encontradas entre las poblaciones de parásitos mostraron un grupo de conformado por Playa Vicente, Tepatitlán, Soto la Marina, Jiutepec y Campeche las cuales presentaron una longitud de 1344pb, otras variantes las presentaron San Pablo Mixtepec con 1371pb, Pungarabato con 1305pb y Tapalpa con 1290pb. Conjuntamente con las secuencias obtenidas con el programa Vector NTI 10, se obtuvieron sitios de restricción dentro de la secuencia, los cuales presentaron un mismo patrón de variación acorde a la diferencia entre la longitud de las secuencias.

Con estos resultados se concluye que la amplificación, clonación y secuenciación de gen *sbp-1* de *Babesia bigemina* se realizó de manera exitosa con la metodología descrita anteriormente de acuerdo a los resultados presentados.

Como segundo objetivo se planteó analizar las secuencias del gen *sbp-1* de *Babesia bigemina* e identificar el polimorfismo entre los 10 aislados mexicanos mediante el alineamiento múltiple de secuencias. El programa Vector NTI 10 permite realizar un alineamiento múltiple de secuencias donde es posible observar las regiones polimórficas y las regiones conservadas. El alineamiento múltiple obtenido a partir de las 10 secuencias mexicanas y la secuencia contig de *Babesia bigemina*, muestra las regiones conservadas en el primer y tercer tercio de la secuencia codificante, mientras que en la región intermedia del gen se observa la región variable (Figura 9). Con el alineamiento múltiple, se observa variación en la región interna, siendo esta variación,

polimorfismo debido a inserción/delección y/o mutación puntual. Las diferencias entre las secuencias no se observan a nivel regional ya que al comparar las dos secuencias obtenidas del estado de Jalisco (Tapalpa y Tepatitlán), la variación es muy notoria siendo de 54 bases (Cuadro 5). En contraste se observa un grupo formado por Playa Vicente, Tepatitlán, Soto la Marina, Jiutepec y Campeche donde cada secuencia es idéntica en longitud y son muy pocas variaciones las que se pueden observar entre las secuencias, llegando a ser puntuales dichas diferencias.

El análisis comparativo en el alineamiento muestra una variabilidad muy distintiva en aislados de un mismo estado (Jalisco) y a diferencia de ello muy similar entre aislados obtenidos de varios estados de la república (Veracruz, Morelos, Campeche, Tamaulipas y Jalisco). Esto se observa de manera similar a los datos obtenidos por De la Fuente *et al* (2003) quienes reportan que el gen *msh-1a* de *Anaplasma marginale* mostró polimorfismo entre aislados obtenidos de una misma región geográfica, lo cual impidió el uso del gen como marcador geográfico de aislados para esa especie. En ese trabajo, los autores sugieren que la movilización de animales es la causa de dicho polimorfismo. Las diferencias observadas en el gen *msh-1a* es similar a lo observado en el presente trabajo para *sbp-1* de *Babesia bigemina*. Dentro de los hallazgos más relevantes está el observado entre las cepas de referencia; la cepa México que es una cepa de desafío y la cepa vacunal Seed, donde se presenta la variación más grande en diferencia de tamaños entre las secuencias siendo ésta de 363 bases. La diferencia que existe entre las secuencias se presenta en la región intermedia del gen.

Cada secuencia de ADN obtenida de los aislados se analizó con uso del programa Tandem Repeat Finder, con la finalidad de buscar secuencias repetidas en el gen (incluye aquí la referencia de la gente que desarrolló el TRFP). El resultado arrojado por el programa confirmó la presencia de secuencias repetidas del gen para todos los aislado con excepción de la Cepa vacunal Seed, donde no se identificaron secuencias repetidas (Cuadro 6). Los repetidos se identificaron en la región intermedia del gen coincidiendo con la región en donde la secuencia del gen *sbp-1* para la cepa Seed presentó la

mayor variabilidad en tamaño con respecto a las demás secuencias. El patrón de repetidos encontrados en las secuencias fue de 27 bases y se identificaron 16 genotipos distintos que se enlistan en el cuadro 7. Cada uno de los genotipos presentó variación con respecto a los otros que van desde una sola base (ε y ξ en cuadro 7), hasta variaciones ocasionadas por delección y/o inserción (λ con respecto a los demás genotipos Cuadro 7). Los genotipos sirvieron para facilitar la identificación de arreglos de repetidos de cada secuencia. No obstante que existe diferencia entre los distintos genotipos, se observa un patrón de repetidos estable, es decir, que existe una secuencia base (Genotipo κ , Cuadro 7), el cual es posible identificarlo en la secuencia de *sbp-1* de la cepa vacunal (Cuadro 8) donde no se identificaron secuencias repetidas con el programa Tandem Repeat Finder (Cuadro 6). Esto indica que a pesar de las variaciones existentes entre los distintos aislados, existe un mismo patrón de secuencia para cada repetido presente en las distintas poblaciones de parásitos. Posterior al análisis de las secuencias, se realizó un análisis de las proteínas predichas de SBP-1 y, al igual que con la secuencia de nucleótidos, se realizó un alineamiento múltiple y en este caso de forma manual con el programa Bioedit 7.0.1 tomando como base las secuencias repetidas que se identificaron a partir del gen (Figura 10). El alineamiento con aminoácidos muestra un arreglo que consta de una región conservada al inicio y fin de la proteína y una región variable intermedia, esto es muy similar a lo observado con el arreglo nucleotídico, sin embargo, es posible identificar que las variaciones están dadas por delecciones y/o inserciones que se detectan a partir de la posición del aminoácido 120 del alineamiento y terminan en la posición 238 (Figura 10). Sin embargo, estas variaciones son más definidas que las observadas en el alineamiento obtenido a partir de la secuencia de ADN donde se encuentran dispersas entre la posición 505 y 723 al observarse regiones aisladas de nucleótidos donde existe una posición consenso, así como regiones donde no se comparten posiciones entre las secuencias. Esto comparado con el alineamiento a nivel de proteínas, cambia de manera considerable observando estas variaciones en relación al arreglo de secuencias repetidas en tandem. Cuando se analizaron los resultados de los

genotipos de los repetidos a nivel de aminoácidos se observó que el número de secuencias se redujo de 16 obtenidas a nivel de nucleótidos a 10 secuencias repetidas en tandeo distintas a nivel de aminoácidos con lo cual se corrobora lo degenerado del código genético, es decir, que distintos codones codifican a un mismo aminoácido. Estos resultados confirman la variabilidad propuesta del gen *sbp-1* de *Babesia bigemina* en distintas poblaciones de parásitos de la Republica Mexicana, con ello se puede concluir que el gen *sbp-1* de *Babesia bigemina* presenta regiones polimórficas que se pueden utilizar para establecer metodologías para discriminar entre poblaciones de parásitos.

En comparación con los resultados obtenidos en otras poblaciones de parásitos donde se evalúan estructuras y diversidad de candidatos vacunales para determinar el polimorfismo de poblaciones de parásitos como en *Plasmodium falciparum* y el caso de *Anaplasma marginale* (Joshi *et al.* 2006, M Chenet *et al.* 2007, De la Fuente *et al.* 2003 y De la Fuente *et al.* 2007), los resultados aquí mostrados confirman la variabilidad existente entre poblaciones de parásitos que se han identificado dentro de una misma zona geográfica. Sin embargo, los patrones de repetidos que se observan, presentan un polimorfismo que presenta una misma longitud promedio que para el caso de nucleótidos es de 27pb y de aminoácidos son 9, siendo la variación que presentan entre las secuencias de número de repetidos principalmente. Esto comparado con los resultados obtenidos por De la Fuente *et al.* (2007) donde analizaron las secuencias de repetidos del gen *msh-1a* y determinaron que las características podían servir para estudios filogeográficos de acuerdo a la heterogeneidad observada en distintas poblaciones en zonas endémicas, podría ser causado por la movilización de los animales y el mantenimiento de distintas poblaciones de parásitos en un mismo huésped y su continua distribución dentro de una misma región a través de los mismos vectores o el movimiento de los animales. Dentro de los mismos resultados obtenidos por el autor antes mencionado, donde observan agrupaciones de genotipos por distintos orígenes geográficos, se puede suponer un patrón similar ya que un análisis observado a partir de dos secuencias de otros países (Australia e Italia) donde también se identificaron secuencias repetidas, éstas mostraron un

patrón distinto de repetidos (datos no mostrados). Estudios donde se analicen secuencias de distintas regiones geográficas a nivel mundial permitirán definir si el gen *sbp-1* es un candidato a utilizar para caracterizar poblaciones de parásitos de distintas partes del mundo.

Como tercer objetivo del estudio se planteó establecer una metodología que permitiera diferenciar entre las poblaciones de parásitos de *Babesia bigemina* utilizando técnicas de biología molecular. Con el polimorfismo identificado a nivel nucleotídico en *sbp-1*, se identificó una región conservada en la posición 284 y 864 del alineamiento (Figura 9). En estas posiciones conservadas se diseñaron iniciadores para amplificar la región de repetidos de *sbp-1*. Identificadas estas posiciones se diseñaron iniciadores con características de alineamiento específicas para el gen *sbp-1* de *Babesia bigemina* los cuales se utilizaron para amplificar la región comprendida por las secuencias repetidas en tandem. Los fragmentos amplificados con estos iniciadores son de 580pb para la cepa México, de 553pb para el aislado San Pablo Mixtepec, 526pb para los aislados Playa Vicente, Tepatitlán, Soto la Marina, Jiutepec y Campeche, de 487 para Pungarabato, de 472 para el aislado Tapalpa y de 217pb para la cepa Vacunal Seed (Cuadro 12). Las variaciones que se observan entre los distintos tamaños de amplicones pueden ser analizadas en un gel de agarosa al 2% tal y como se observa en la figura 11. Esta imagen muestra los distintos tamaños de los amplicones y permite diferenciar entre ellos. Con los resultados obtenidos se concluye que la metodología de amplificar la región variable del gen *sbp-1* de *Babesia bigemina* permite diferenciar entre poblaciones de parásitos Mexicanos. De manera interesante se observa que existe variación suficiente para diferenciar de manera contundente a las poblaciones de parásitos correspondientes a las cepas de referencia México y Seed, siendo estas utilizadas en desafíos y en ensayos de vacunación respectivamente. Con ellos es posible monitorear de manera independiente el desarrollo de cada una de ellas en el hospedero bovino y determinar en los casos donde se observe enfermedad, cuál es la causante de la misma. De manera similar es posible diferenciar a cualquiera de estas dos cepas en comparación con cualquiera de las poblaciones de

parásitos que se analizaron en el presente trabajo. Con estos resultados es posible definir si poblaciones que se mantienen en experimentación presentan contaminación con alguna otra población de parásitos lo cual pueda alterar los resultados esperados. Dentro de las limitaciones del estudio se encuentran las encontradas con el grupo de poblaciones de parásitos definido por Playa Vicente, Tepatitlán, Soto la Marina, Jiutepec y Campeche, donde no es posible determinar con la metodología aquí propuesta, a cual de las poblaciones nos referimos con la simple amplificación de la región polimórfica, pero que sin embargo si será posible hacerlo mediante análisis de secuenciación de la regiones polimórficas.

Uno de los datos sobresalientes obtenidos con el presente estudio es la variabilidad tan grande que existe entre la secuencia de *sbp-1* de la cepa vacunal Seed con respecto a las demás secuencias donde no existen repetidos. Esta información asociada a la falta de virulencia de la cepa, así como el continuo cultivo *In vitro* donde se ha mantenido e impidiendo su ciclo biológico natural a través de garrapatas pudiese ser la causa de esta variación en secuencia. Sin embargo, se requieren mas estudios que comprueben esta hipótesis donde se evalúe el gen *sbp-1* en poblaciones avirulentas y en poblaciones que se encuentren sometidas a un continuo cultivo *In vitro* lo cual brinde información al respecto. De la misma manera y al igual a lo observado con el gen que codifica a la proteína de los cuerpos esféricos 1 en *Babesia bovis* (Lew *et al.* 1997b y Bock *et al.* 2000), se requieren estudios donde se evalúe si el gen varía a través de pases continuos entre bovinos y en pases a través de bovino-garrapata.

Con el estudio que se realizó en el presente trabajo se concluye que el gen *sbp-1* de *Babesia bigemina* presenta polimorfismo que puede utilizarse para la discriminación de aislados mexicanos. Esto comprueba la hipótesis planteada y con los datos y la metodología propuesta en el presente trabajo propone el uso del gen *sbp-1* como marcador molecular que se utilice para la discriminación de poblaciones de parásitos. Finalmente, se proponen metodologías que servirán para mejorar las medidas de control, al contribuir al diagnóstico de la babesiosis bovina mejorando así las estrategias para prevenir la enfermedad en México.

Bibliografía

Alonso M, Blandino T, Mendoza E, Savon L, Camacho M. Development of a *Babesia bovis* live attenuated vaccine. Arch Med Res. 1994;25(2):273-277.

Álvarez MJA, Ramos AJA, Rojas EE, Mosqueda JJ, Vega CA Olvera AM, *et al.* Field challenge of cattle vaccinated with a combined *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* frozen immunogen. Ann NY Acad Sci 2004;1026: 277-283.

Balashov YC. Bloodsucking ticks (Ixodidae)- vectors of diseases of man and animals. Entom Soc Amer 1968;8(5):264-273.

Bannister L and Mitchell G. 2003. The ins, outs and roundabouts of malaria. Trends Parasitol 2003;19(5):209-213.

Benavides E, Vizcaino O, Britto CM, Romero A, Rubio A. Attenuated Trivalent Vaccine against Babesiosis and Anaplasmosis in Colombia. Ann NY Acad Sci 2000;916:613-616.

Bishop JP, Adams LG. *Babesia bigemina*: Immune response of cattle inoculated with irradiated parasites. Exp Parasitol 1974;35(1):35-43.

Bock RE, de Vos AJ, Kington TG, Shiels IA, Dalgliesh RJ. Investigations of breakdowns in protection provided by living *Babesia bovis* vaccine. Vet Parasitol 1992;43:45-56.

Bock RE, Lew AE, Minchin CM, Jeston PJ, Jorgensen WK. Application of PCR assays to determine the genotype of *Babesia bovis* parasites isolated from cattle with clinical babesiosis soon after vaccination against tick fever. Aust Vet J 2000;78(3):179-181.

Bock RE, Jackson L, de Vos A, Jorgensen W. Babesiosis of cattle. *Parasitol* 2004;129:S247-S269.

Boonchit S, Alhassan A, Chan B, Xuan X, Yokoyama N, Ooshiro M, *et al.*. Expression of C-terminal truncated and full-length *Babesia bigemina* rhoptry-associated protein 1 and their potential use in enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol* 2006;137: 28-35.

Boonchit S, Xuan X, Yokoyama N, Goff WL, Waghela SD, Wagner D, Igarashi I. Improved enzyme-linked immunosorbent assay using C-terminal truncated recombinant antigens of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein-1 for detection of specific antibodies. *J Clin Microbiol* 2004;42:1601-1604.

Böse R, Jorgensen WK, Dalgliesh RJ, Friedhoff KT, de Vos AJ. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet Parasitol* 1995;57(1-3):61-74.

Brown WC, Palmer GH. Designing blood stage-vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitol Today* 1999;15:275-281.

Brown WC, Norimine J, Goff WL, Suarez CE, McElwain TF. Prospects for recombinant vaccines against *Babesia bovis* and related parasites. *Parasite Immunol* 2006;28(7):315-327.

Bruce MC, Macheso A, Galinski MR, Barnwell JW. Characterization and application of multiple genetic markers for *Plasmodium malariae*. *Parasitol* 2007;134(5):637-650.

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

Cantó AGJ, Álvarez MJA, Rojas REE, Ramos AJA, Mosqueda GJJ, Vega MCA, Figueroa MJV. Protección contra la babesiosis bovina con una vacuna mixta de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* derivada de cultivo *in vitro* bajo una confrontación de campo. Inmunización en un área libre de la enfermedad. Vet Méx 2003;34(4):323-332.

Chulmin K, Alhassan A, Verdida RA, Yokohama N, Xuan X, Fujisaki K, Kawazu S, Igarashi I. Development of two immunochromatographic test for the serodiagnosis of bovine babesiosis. Vet Parasitol 2007;148:137-143.

Dalgliesh RJ, Stewart NP. Failure of vaccine strains of *Babesia bovis* to regain infectivity for ticks during long-standing infections in cattle. Aust Vet J 1977;53:429-431.

De la Fuente J, Van Den Bussche RA, Prado TM, Kocan KM. *Anaplasma marginale msp-1a* Genotypes evolved under positive selection pressure but are not marker for Geographic isolates. 2003; 41 (4):1609-1616.

De la Fuente J, Ruybal P, Mtshali MS, Naranjo V, Shuqing L, Mangold AJ, *et al.* Analysis of World strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. Vet Microbiol 2007;119:382-390.

East IJ, Zakrzewski H, Gale KR. Vaccination against *Babesia bovis*: T cell from protected and unprotected animals show different cytokine profiles. Int J Parasitol 1997;27:1537-1545.

Ferdig MT, Su X-z. Microsatellite marker and genetic mapping in *Plasmodium falciparum*. Parasitol Today 2000;16:307-312.

Figueroa JV, Chieves LP, Johnson GS, Buening GM. Detection of *Babesia bigemina* infected carriers by polymerase chain reaction amplification. J Clin Microbiol 1992;30: 2576-2582.

Friedhoff KT. Interaction between parasite and tick vector. *Int J Parasitol* 1990;20(4): 525-535.

Friedhoff KT. Transmission of *Babesia*, In Ristic, M (editor) *Babesiosis of domestic animals and man*. Boca Raton, Florida. CRC press; 1988;23-52.

Harper GS, Hibbs AR, East IJ, Waltisbuhl DJ, Jorgensen WK, Riddles PW. *Babesia bovis*: Biosynthesis and localization of the 12D3 antigen in bovine erythrocytes. *Int J Parasitol* 1996;26(11):1255-1262.

Hines SA, Palmer GH, Brown WC, McElwain TF, Suarez CE, Vidotto O, Rice-Ficht AC. Genetic and antigenic Characterization of *Babesia bovis* merozoite spherical body protein Bb-1. *Mol Biochem Parasitol* 1995;69:149-159.

Homer MJ, Aguiler-Delfin I, Telford III SR, Krause PJ, Persing DH. Babesiosis. *Clin Microbiol Rev* 2000;13(3):451-469.

Howell JM, Ueti MU, Palmer GH, Scoles GA, Knowles DP. Persistently infected calves as reservoirs for acquisition and transovarial transmission of *Babesia bovis* by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45(10): 3155-3159.

Janeway C. A., Travers P., Walport M. and Capra J. D. *Immunobiology: The immune system in health and disease*. 4^{ed}. Current Biology Publications 1999;40-53.

Lawrence JA, MalikaJ, Whiteland AP, Kafuwa P. Efficacy of an Australian *Babesia bovis* vaccine strain in Malawi. *Vet Rec.* 1993;132(12):295-296.

Li J, Zhang Y, Sullivan M, Hong L, Huang L, Lu F, McCutchan TF, Su X-z. Typing *Plasmodium yoelii* microsatellites using a simple and affordable fluorescent labeling method. *Mol Biochem Parasitol* 2007;55: 94-102.

Levine ND. Taxonomy of the piroplasms. *Trans Am Microsc Soc.* 1971;90-2.

Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg B *et al.* A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool* 1980;27:37-58.

Levy MG, Ristic M. *Babesia bovis*: Continuous cultivation in a microaerophilous stationary phase culture. *Science* 1980;207: 1218-1220.

Lew AE, Dalrymple BP, Jeston PJ, Bock RE. PCR methods for the discrimination of *Babesia bovis* isolates. *Vet. Parasitol.* 1997a;71:223-237.

Lew AE, Bock RE, Croft JM, Minchin CM, Kingston TG, Dalgliesh R. Genotypic diversity in field isolates of *Babesia bovis* from cattle with babesiosis after vaccination. *Aust Vet J* 1997b;75(8):575-578.

Mathews CK, van Holde KE, Aher KG. *Bioquímica*. 3rd ed Madrid, España. Pearson; 2005.

McElwain TF, Perryman LE, Musoke AJ, McGuire TC. Molecular characterization and immunogenicity of neutralization-sensitive *Babesia bigemina* merozoite surface proteins. *Mol Biochem Parasitol* 1991;47: 213-222.

McCosker PJ. The global importance of babesiosis, En Ristic M. and Kreier JP. (ed). *Babesiosis*. Academic Press, New York. 1981;1-24.

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

Mlambo G, Sullivan D, Mutambu SL, Soko W, Mbedzi J, Chivenga J, Jaenisch T, Gemperli A and Kumar N. Analysis of genetic polymorphism in select vaccine candidate antigens and microsatellite loci in *Plasmodium falciparum* from endemic areas at varying altitudes. *Acta Tropica* 2007;102: 201-205.

Mosqueda GJJ, Falcon NA, Ramos AJA, Alvarez MJA y Figueroa MJV. Estrategias genómicas para la identificación de antígenos de *Babesia bigemina*. En memorias: XLII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Veracruz: 2006;17.

Mosqueda J, Ramos JA, Falcon A, Alvarez JA, Aragon V and Figueroa JV. Sporozoite isolation from *Boophilus microplus* nymphs and initial immunomolecular characterization. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1026:222-231.

OIE. Bovine babesiosis. *In* Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 5 ed 2004 Cap-2.3.8.

Picca A, Helguera M, Salomón N y Carrera A. II: Herramientas básicas: No 3. Marcadores moleculares. En Echenique V, Rubinstein C y Mroginski L (Editores): Biotecnología y mejoramiento vegetal. INTA, Buenos Aires, Argentina 2004;61-68.

Potgieter FT, Els HJ. The fine structure of intra-erythrocytic stages of *Babesia bigemina*. *Onderstepoort J Vet Res* 1977;44(3):157-168.

Potgieter FT, Els HJ, Van Vuuren AS. The fine structure of merozoites of *Babesia bovis* in the gut epithelium of *Boophilus microplus*. *Onderstepoort J vet Res* 1976;43(1):1-10.

Purnel RE. Babesiosis in various host. En Ristic M. and Kreier JP. (ed). *Babesiosis*. New York, Academic Press, 1981;25-63.

Rodríguez SD, Buening GM., Green TJ, Carson CA. Cloning of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation. Infect Immun 1983;42(1):15-18.

Rodriguez SD, Palmer GH, McElwain TF, McGuire TC, Ruef BJ, Chitko-McKown CG, Brown WC. CD4⁺ T-Helper lymphocyte responses against *Babesia bigemina* rhoptry-associated proteina 1. Infect Immun 1996;64(6):2079-2087.

Ruef BJ, Ward TJ, Oxner CR, Conley PG, Brown WC, Rice-Ficht AC. A unique *Babesia bovis* spherical body protein is conserved among geographic isolates and localizes to the infected erythrocyte membrane. Mol Biochem Parasitol 2000;105(1):1-12.

SAGARPA 2007:

http://senasicaw.senasica.sagarpa.gob.mx/portal/html/salud_animal/campanas_zoosanitarias/campana_nacional_contra_la_garrapata_boophilus_en_mexico.html.

Sam-Yellowe TY. Rhoptry Organelles of the Apicomplexa: Their Role in Host Cell Invasion and Intracellular Survival. Parasitol Today 1996;12(8): 308-316.

Schettters TPM, Montenegro-James S. Vaccines against babesiosis using soluble parasite antigens. Parasitol Today 1995;11(12):456-462.

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

Solorio-Rivera JL, Rodríguez-Vivas RI. Epidemiología de la babesiosis bovina. I. Componentes epidemiológicos. Rev. Biomed. 1997a;8:37-47

Solorio-Rivera JL, Rodriguez-Vivas RI. Epidemiología de la babesiosis bovina. II. Indicadores epidemiológicos y elementos para el diseño de estrategias de control. Rev Biomed 1997b;8:95-105.

Spitalska E, Torina A, Cannella V, Caracappa S and Sparagabo OAE. Discriminatio between *Theileria lestoquardi* and *Theileria annulata* in their vector and hosts by RFLP based on the 18rRNA gene. Parasitol. Res. 2004;94:318-320.

Struhl K. Enzymatic Manipulation of DNA and RNA. 2003. En Ausubel FM., *et al.* (ed). Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, inc Press, 2003; Cap 3:45-63.

Taylor LH, Katzer F, Shiels BR and Welburn SC. Genetic and phenotypic analysis of Tunisian *Theileria annulata* clones. Parasitol 2002;126(3): 241-252.

Tetzlaff CL, Rice-Ficht AC, Woods VM and Brown WC. Induction of Proliferative Responses of T cell from *Babesia bovis*-Immune cattle with a recombinant 77-kilodalton Merozoite Protein (Bb-1). Infect Immun. 1992;60(2): 644-652.

Toro BM, Montenegro-James B, Leon AE, Lopez BA, García JA, Urbina A y Llovera L. 1990. Vacuna bivalente inactivada contra la babesiosis bovina: eficacia, estabilidad y duración de inmunidad. Vet. Trop. 15:3-16.

Vega CA, Buebibng GM, Green TJ and Carson CA. In vitro cultivation of *Babesia bigemina*. Am J Vet Res. 1985;46(2):416-20.

Voytas D. Agarose gel electrophoresis. En Ausubel FM., *et al.* (ed). Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons inc Press, 2003;Unit 2.5A.

Waye JS, Eng B. Allele-specific mutation detection by PCR-ARMS and PCR-ASO. En Patrinos GP, Ansorge W (ed). Molecular diagnostics. Elsevier Academic press. 2005;cap: 2:15-22

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

Weir W, Ben-Miled L, Karagenc T, Katzer F, Darghounth M, Shiels B and Tait A. Genetic exchange and sub-structuring in *Theileria annulata* populations. Mol Biochem Parasitol. 2007;154:170-180

Wolford JK, Yeatts KA. Pyrosequencing. En Patrinos GP, Ansorge W (ed). Molecular diagnostics. Elsevier Academic press. 2005; Cap11:127-138.

Wright IG. Biochemical characteristics of *Babesia* and physicochemical reactions in the host. En Ristic M. and Kreier JP. (ed). Babesiosis. Academic Press, New York. 1981:171-205

Wright IG, Casu R, Commins MA, Dalrymple BP, Gale KR, Goodger BV, *et al.* The development of a recombinant *Babesia* vaccine. Vet Parasitol. 1992;44(1-2):3-13.

Young AS, Morzaria SP. Biology of *Babesia*. Parasitol Today 1986;2(8):211-218.