



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

**“Identificación de marcadores moleculares para la detección de
especies patógenas del género *Anaplasma* en el sector pecuario en
México”**

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Lic. en C. Karla Mariana Martínez Rodríguez

Director de Tesis: Dr. Armando Hernández Mendoza (CIDC, UAEM)

Co-Director de Tesis: Dr. Fernando Martínez Ocampo (SECIHTI)

Cuernavaca, Morelos 26 abril, 2026



Comité evaluador de los exámenes tutoriales

Sinodal: Dr. Otoniel Rodríguez Jorge (CIDC, UAEM)

Sinodal: Dr. Edgar Dantán González (CEIB, UAEM)

Comité evaluador del examen de grado

PRESIDENTE: Dra. María Eugenia Núñez Valdez (CIDC, UAEM)

SECRETARIO: Dra. Sonia Dávila Ramos (CIDC,UAEM)

VOCAL: Dra. Rosa Estela Quiroz Castañeda (CENID-SAI, INIFAP)

SUPLENTE: Dra. Rosalba Salgado Morales (CEIB – UAEM)

SUPLENTE: Dr. Gamaliel López Leal (CIDC – UAEM)

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mi madre Isabel Rodríguez Martínez,

a mi hermana Ana Carolina,

a mi abuela Ofelia Martínez y a mi tío Jorge Rodríguez por

su apoyo durante esta meta.

A mi pareja de vida Oswaldo Martínez Villasana, por su incondicional apoyo durante estos dos años, no tengo palabras para saber que tan agradecida estoy contigo.

A mis amigas Abigail , Kenya, Itzel y Celia que me han acompañado desde hace más de 10 años de amistad y contando.

A mis amigos de maestría David Fuentes Castro, Lázaro Raúl Del Busto Benítez y a Ingrid Yaritzit Carreón Cortés por incluirme a diversos eventos y su compañía, sin ustedes, no me hubiera divertido tanto, espero que nuestra amistad perdure por muchos años más.

AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS

A mi profesor de tesis Armando Hernández Mendoza, quién me acompañó en mi formación académica, muchas gracias.

Al Dr. Fernando Martínez Ocampo quien fue el que me guió en estos dos años con el proyecto en aspectos de programación y conocimiento.

Al Dr. Abraham Omar Rivera Ramírez quien fue de gran apoyo con sus conocimientos en análisis pangenómicos y filogenómicos.

Al M. en T.I. Juan Manuel Hurtado Ramírez quien fue la persona encargada de administrar los servidores informáticos utilizados para el desarrollo del presente trabajo.

A Jorge por ayudarnos con nuestro equipo de computo.

A la Dra. Rosa Estela Quiroz Castañeda, Investigador titular C, por brindarme la oportunidad de realizar una estancia de Investigación.

Al M en B. Christian Jesús Flores Bahena por ser mi guía en el laboratorio.

Al Organismo Auxiliar de Sanidad Animal, "Profesionales Pecuarios de Morelos A. C.", quien es el que se encarga de la vigilancia y las sanidades en el área pecuaria, aquí en el estado por su valiosa aportación en la toma de muestras de sangre de bovino para este proyecto.

*Agradecimientos a SECIHTI por la beca proporcionada con el número de No. CVU:
1281589*

INDICE

RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
MARCO TEÓRICO	8
IMPACTOS ECONÓMICOS EN EL SECTOR PECUARIO.....	12
ANAPLASMA EN MÉXICO.....	13
Patogenicidad y virulencia	14
Islas de Patogenicidad.	14
Avances genómicos recientes	16
HIPÓTESIS.....	20
JUSTIFICACIÓN	20
OBJETIVOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
RESULTADOS	29
Caracterización genómica por grupo de célula infectada	38
Hospederos.....	49
Distribución geográfica del género <i>Anaplasma</i> a nivel Mundial	50
Análisis Pangenómicos.....	52
Pangenoma del grupo eritrocitos, primer grupo (<i>A.centrale</i> , <i>A. capra</i> , <i>A.ovis</i> , <i>A. marginale</i>).....	56
Pangenoma del grupo leucocitos (<i>A. phagocytophilum</i> y <i>A. bovis</i>).....	57
Pangenoma segundo grupo leucocitos, plaquetas, indefinido, endosimbionte (<i>A. bovis</i> , <i>A. phagocytophilum</i> , <i>A. platys</i> , <i>Candidatus Anaplasma</i> , <i>A. endosimbionte</i>)	58
Genómica comparativa	59
Genómica comparativa del género <i>Anaplasma</i>	61
Resistencia a antibióticos.	73
Identificación de factores de Virulencia.	73
Base de datos de islas de patogenicidad	84
Identificación de los marcadores moleculares	84
Marcador molecular para género	85
Tabla de los diseños de primers externos e internos para la PCR anidada.	8
TOMA DE MUESTRA.....	9
Extracción de DNA.....	100
DISCUSIÓN	101

Conclusiones 112

Perspectivas..... 113

BIBLIOGRAFÍA 114

RESUMEN

Las especies del género *Anaplasma* son bacterias intracelulares obligadas que causan anaplasmosis, una enfermedad con alto impacto en la salud humana y animal. Dentro de este género existen siete especies oficiales: *A. platys*, *A. phagocytophilum*, *A. ovis*, *A. bovis*, *A. centrale*, *A. marginale*, *A. capra*. Este género es responsable de la anaplasmosis, una enfermedad que genera grandes pérdidas económicas a nivel mundial, y se ha reportado en Asia, África, Australia, el sur de Europa y América Central y del Sur. En México, la investigación se ha centrado principalmente en *Anaplasma marginale* y la anaplasmosis bovina, reportándose en 2012 un total de 28 cepas mexicanas. En este contexto, el presente trabajo resalta la importancia de identificar marcadores moleculares específicos que permitan diferenciar las especies patógenas del género *Anaplasma* en diversos hospederos, mediante el uso de herramientas bioinformáticas basadas en genómica comparativa y análisis pangenómicos. Por lo que al tener la posibilidad de diagnosticarlo con precisión a nivel de género, grupo y especie ayudaría a obtener nuevos ensamblajes de genomas de cepas mexicanas enriqueciendo la información en las bases de datos actuales para ampliar el estudio de la diversidad genética, evolutiva y epidemiológica de *Anaplasma*. Se caracterizaron sus genomas además de que se identificaron su potencial patógeno zoonótico y virulencia. Estos marcadores moleculares se llevarían a sintetizar para ponerlos a prueba en el laboratorio y en un futuro identificar más cepas de este Género enriqueciendo la base de datos.

INTRODUCCIÓN

La anaplasmosis es una enfermedad infecciosa de relevancia en la salud animal y humana, causada por bacterias intracelulares obligadas del género *Anaplasma*, las cuales son transmitidas principalmente por vectores (garrapatas). Esta enfermedad se distribuye a nivel mundial, en regiones tropicales y subtropicales, donde las condiciones ambientales favorecen la presencia de vectores. En el sector pecuario, la anaplasmosis representa un problema de gran impacto económico debido a la disminución en la productividad y mortalidad del ganado, costos de tratamiento y restricciones sanitarias que afectan la comercialización de animales.

El género *Anaplasma* pertenece a la familia de *Anaplasmataceae* y se caracteriza por su capacidad de infectar distintos tipos celulares, incluyendo eritrocitos, leucocitos y plaquetas, teniendo una importante diversidad biológica por lo que es importante enfocar estudios en su identificación, caracterización y vigilancia epidemiológica. Actualmente se conoce diversas especies dentro de este género, tales como *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *A. bovis*, *A. phagocytophilum*, *A. platys* y *A. capra*, algunas son potenciales patógenos zoonóticos. A pesar de su importancia, en México los estudios se han enfocado principalmente en *A. marginale* limitando su estudio en el país.

En la actualidad, las herramientas de genómica comparativa, análisis pangenómicos y filogenómicos han revolucionado el estudio de la vida bacteriana, permitiendo explorar la diversidad genética, relaciones evolutivas y mecanismos de patogenicidad con mayor precisión facilitando la identificación de marcadores moleculares específicos, ayudando a tener métodos de diagnósticos más precisos y específicos. Por lo tanto, el presente trabajo se enfoca en el análisis genómico del género *Anaplasma*, utilizando herramientas bioinformáticas para la construcción de una base de datos de ensamblajes genómicos disponibles, el análisis pangenómico y filogenómico, así como la identificación de proteínas asociadas a la patogenicidad, resistencia a antibióticos y evasión del sistema inmune. A partir de estos análisis, se busca identificar marcadores moleculares específicos a nivel de género, grupo y especie, que permitan mejorar la detección y diferenciación de estas bacterias en el sector pecuario en México.

Adicionalmente, como parte de la validación experimental, se diseñaron primers específicos, se tomaron muestras de sangre de ganado bovino en diferentes entidades de Morelos con el objetivo de evaluar la utilidad de estos candidatos a marcadores moleculares por medio de la implementación de técnicas de PCR anidada, teniendo un análisis integrador que combina análisis *in silico* y validación experimental, contribuyendo al desarrollo de herramientas diagnósticas más precisas y robustas.

En conjunto, este estudio aporta información relevante sobre la diversidad genómica del género *Anaplasma* y sienta las bases para futuros estudios enfocados en la vigilancia epidemiológica, el diagnóstico molecular y el control de la enfermedad anaplasmosis en México, contribuyendo al fortalecimiento del sector pecuario y a la detección de patógenos con potencial zoonótico.

MARCO TEÓRICO

El género *Anaplasma*

El género *Anaplasma* está conformado por bacterias intracelulares obligadas pertenecientes a la clase Alphaproteobacteria, familia *Anaplasmataceae* y orden de las *Rickettsiales*. Una bacteria gram-negativa que requieren a una célula hospedadora para su supervivencia y replicación. Este género fue descrito por primera vez en 1910 por Sir Arnold Theiler en Sudáfrica. Su nombre proviene del griego an (sin) y plasma (forma). Actualmente, se reconocen siete especies principales: *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *A. bovis*, *A. phagocytophilum*, *A. platys* y *A. capra*, aunque existe otras variantes aún no clasificadas (Cao XQ, Gu XL, Zhang L, *et al.*, 2023).

Anaplasmosis

Las bacterias del género *Anaplasma* son responsables de la anaplasmosis, una enfermedad infecciosa transmitida principalmente por garrapatas. Su presentación clínica depende de la especie involucrada. Por ejemplo, *A. marginale* causa anaplasmosis bovina, *A. platys* afecta a perros y *A. phagocytophilum* está asociado a infecciones en humanos (S. Marcus Makgabo, Kelly A. Brayton; *et al.*, 2023).

Generalmente se trata de una enfermedad febril inespecífica, lo que dificulta su diagnóstico. En los últimos años, los casos han aumentado a nivel mundial, resaltando la necesidad de desarrollar estrategias de control y tratamientos (Uminski K, Kadkhoda K, Houston BL; 2018).

Anaplasma platys

A. platys fue identificado en 1978 en Estados Unidos como agente relacionado con *Ehrlichia platys*. Actualmente, se reconoce como el causante de la trombocitopenia cíclica infecciosa canina, caracterizada por la disminución periódica de plaquetas. Los signos clínicos incluyen depresión, anorexia, fiebre, palidez de mucosas y alteraciones hemorrágicas como petequias y equimosis, además de linfadenomegalia, esplenomegalia y hepatomegalia

(Tateishi T, Viviana, LÍ E, Olga, *et al.*, 2015).

Este patógeno es transmitido por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, la cual puede alcanzar altas densidades en ambientes domésticos. *A. platys* es endémica de regiones tropicales y subtropicales, incluyendo países del Mediterráneo y América (Sainz Á, Roura X, Miró G, *et al.*, 2015).

Aunque tradicionalmente no se consideraba zoonótico, se ha reportado casos en humanos, lo que sugiere su potencial como patógeno emergente (Arraga-Alvarado CM, Quorollo BA, Parra OC, *et al.*, 2014).

Anaplasma capra

A. capra fue identificada entre 2012 y 2015 en China mediante análisis moleculares de los genes 16S rRNA y *gltA*. Inicialmente considerada una especie desconocida, posteriormente fue reconocida como un nuevo miembro del género (Li H, Zheng YC, Ma L; *et al.*, 2015).

Esta especie se desarrolla en regiones con clima monzónico subtrópicas, lo que favorece la actividad de garrapatas (Peng Y, Wang K, Zhao S; *et al.*, 2018). Se ha identificado en múltiples hospederos, incluyendo humanos, rumiantes, perros y fauna silvestre.

En estudios in vitro han demostrado su capacidad para infectar células humanas, lo que confirma su potencial zoonótico (Peng Y, Lu C, Yan Y, Shi K, *et al.*, 2021). Además, ha sido detectada en diversas especies de garrapatas distribuidas en diferentes regiones del mundo (Jouglin M, Blanc B, de la Cotte N, Bastian S *et al.*, 2019).

Anaplasma phagocytophilum

A. phagocytophilum es un patógeno de importancia médica y veterinaria que infecta a neutrófilos. A lo largo del tiempo ha recibido diferentes denominaciones, hasta su clasificación actual basada en análisis filogenético (Severo MS, Stephens KD, Kotsyfakis M, *et al.*, 2012).

Es el agente causal de la anaplasmosis granulocítica humana (HGA) y presenta un amplio rango de hospederos. En humanos, la infección puede manifestarse con fiebre, cefalea, mialgias y, en algunos casos, síntomas gastrointestinales o respiratorios (Stuen S, Granquist EG, Silaghi C; 2013; Dumler JS, Choi KS, Garcia-Garcia JC, Barat NS *et al.*, 2005)

El diagnostico puede realizarse mediante diversas técnicas, siendo la PCR una de las más sensibles y rápidas (Guzman N, Yarrarapu SNS, Beidas SO, 2023). Esta bacteria posee mecanismos de evasión inmunológica, como la inhibición de la apoptosis en neutrófilos (Aktaş M, Özübek S, Uluçesme MC; 2021).

Anaplasma ovis

A. ovis infecta principalmente ovejas y otros rumiantes. Generalmente provoca infecciones leves, aunque puede generar pérdidas económicas debido a su amplia distribución (Liu, Z., Peasley, A.M., Yang, J. *et al.*, 2019).

La infección se transmite por garrapatas y puede causar fiebre, anemia, disminución de peso, aborto y reducción en la producción (ElHamdi, S., Mhadhbi, M., Ben Said *et al.*, 2022). Además, pueden presentarse coinfección con otras especies del género, lo que agrava el cuadro clínico (M'ghirbi Y, Oporto B, Hurtado A, Bouattour A; 2022). Aunque su impacto en humanos no está completamente definido, existen reportes de infección detectada mediante PCR (Chochlakis D, Ioannou I, Tselentis Y, Psaroulaki A; 2010).

Anaplasma bovis

Anaplasma bovis infecta monocitos y macrófagos, principalmente en animales de África, Asia y América. Puede provocar fiebre, anorexia, diarrea y, en casos severos, la muerte (Ybañez AP, Inokuma H; 2016).

Su transmisión está asociada a diversas especies de garrapatas, cuya distribución depende de factores climáticos (Park J, Han DG, Ryu JH, Chae JB, Chae JS *et al.*, 2018).

Se han reportado casos en humanos, lo que sugiere su potencial zoonótico (Lu M, Chen Q, Qin X, *et al.*, 2021). Además, se ha observado coinfección frecuente con *A. ovis* en rumiantes (Liu Z, Ma M, Wang Z, Wang J, Peng Y *et al.*, 2012).

Anaplasma centrale

Anaplasma centrale es una bacteria intracelular transmitida por garrapatas que infecta eritrocitos (Ashraf S, Parveen A, Asif M, Alanazi AD, *et al.*, 2021). A nivel molecular, presenta una alta similitud con *A. marginale*, especialmente en el gen 16S rRNA, con una identidad cercana al 98.08% (Inokuma H, Terada Y, Kamio T *et al.*, 2001).

Debido a esta relación, *A. centrale* ha sido utilizada como una vacuna viva contra la anaplasmosis bovina causada por *A. marginale*. Sin embargo, este tipo de vacuna implica riesgos, como la posible transmisión de otros patógenos o el desarrollo de enfermedades hemolíticas en crías de madres vacunadas (Bell-Sakyi L, Palomar AM, Bradford EL, *et al.*, 2015).

Además, esta especie ha sido detectada en animales domésticos y silvestres, incluyendo coinfecciones con otros patógenos. Se ha observado que factores como el clima y la estación del año influyen en la intensidad de infección, posiblemente debido a cambios en la respuesta inmune del hospedador (Sisson D, Beechler B, Jabbar A, *et al.*, 2023).

Anaplasma marginale

Anaplasma marginale es el principal agente etiológico de la anaplasmosis bovina, una enfermedad ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales. Su transmisión ocurre principalmente a través de garrapatas del género *Rhipicephalus*, aunque también puede darse de forma mecánica mediante insectos hematófagos o instrumentos contaminados (Atif, 2015).

Este patógeno infecta eritrocitos y células endoteliales, causando anemia, abortos, disminución en la producción y, en casos severos, la muerte del animal. Los bovinos que sobreviven pueden convertirse en portadores persistentes, facilitando la transmisión del patógeno (Spare MR y Hanzlicek GA, 2019).

A nivel molecular, una de las principales herramientas para su identificación son las proteínas de superficie mayor (MSP), particularmente MSP1a, que presenta variabilidad en su secuencia y participa en la interacción con el hospedador. Estas proteínas están sujetas a presión selectiva, lo que favorece su evolución (de la Fuente J, Van Den Bussche RA *et al.*, 2003).

IMPACTOS ECONÓMICOS EN EL SECTOR PECUARIO

La anaplasmosis es una enfermedad que genera grandes pérdidas económicas a nivel mundial, y se ha reportado en Asia, África, Australia, el sur de Europa, América Central y del Sur. Existen diferentes métodos que intentan controlar la infección de las especies del género *Anaplasma*, como la crianza de razas de ganado resistentes a las garrapatas y libre de *Anaplasma*, la estabilidad endémica, el uso de antibióticos, la identificación de vectores regionales, la modificación del hábitat, el control biológico, la quimioterapia y las vacunas, por mencionar algunos ejemplos. En el año 2021, en Estados Unidos calcularon los costos de aplicar una variedad de métodos de control de la anaplasmosis para un productor de vacas y terneros. Se basaron en los costos clínicos promedios esperados de morbilidad y mortalidad futuras, con la variación en los costos del tratamiento y las tasas de mortalidad. Estos cálculos revelaron que las pérdidas de producción alimentaria representan la mayor pérdida económica ocasionada por la anaplasmosis. Calcularon que la pérdida económica esperada por la anaplasmosis es de \$660 dólares por cabeza de ganado. La muerte del ganado contribuye con un 66% de las pérdidas económicas por la anaplasmosis, seguida del 16% por el tratamiento, el 11% por casos crónicos y el 7% por abortos (Railey y Marsh; 2021).

El impacto socioeconómico de la enfermedad y las restricciones al comercio internacional de animales infectados llevaron al Código Sanitario Animal de la Oficina Internacional de Epizootias a categorizar la anaplasmosis como una enfermedad que requería una notificación de su presencia. Debido a que los brotes son estacionales y las tasas de infección son estables, la importancia de la anaplasmosis se subestima en áreas endémicas (M'ghirbi Y, Bèji M, Oporto B, Khrouf F, *et al.*, 2016). Las garrapatas, vectores del género *Anaplasma*, como *Rhipicephalus microplus* y *Hyalomma anatolicum*, representan un factor importante en el impacto económico del sistema de producción ganadera, debido a la disminución de la productividad y la rentabilidad. Estas especies, ampliamente distribuidas a nivel mundial, están asociadas con pérdidas económicas globales estimadas entre 22 y 30 mil millones de dólares anuales por enfermedades transmitidas por garrapatas (TBDs). En particular, se ha reportado que en Brasil las pérdidas atribuibles a *R. microplus* alcanzan los 32.4 millones de dólares, mientras que en Estados Unidos ascienden a aproximadamente 3.0 millones (Singh *et al.*, 2022)

ANAPLASMA EN MÉXICO

En México los costos de control y tratamiento de las garrapatas y las enfermedades que transmiten conducen a pérdidas económicas que van desde los 600 a 942 mil 230 millones de pesos por año. En México, el reporte de Censo Ganadero estima que la población de ganado vacuno hasta el 2020 es de aproximadamente de 35,653,619 de cabezas de los cuales el 75% comparten zonas endémicas con la garrapata, lo que evidencia las pérdidas económicas causadas por este parásito. En este contexto, el género *Anaplasma* destaca por su importancia como agente etiológico de enfermedades en animales y por su potencial zoonótico, particularmente en el caso de *A. phagocytophilum*, causante de la anaplasmosis granulocítica humana (HGA) (Aguilar Díaz, José Hugo, Quiroz Castañeda Rosa Estela, Miranda Estephan *et al.*, 2021).

Entre los años 2017 y 2019 se llevaron a cabo análisis de sangre de 1924 pacientes de los cuales 1014 se analizaron las muestras, finalmente 85 estaban dentro del rango 1:384 a 1:896 de las pruebas serológicas, de las pruebas positivas solo el 7.10 % fueron usadas en pruebas de PCR los cuales confirmaron de que se trataba de *A. phagocytophilum*, los pacientes se caracterizaron por no tener antecedentes de haber viajado al extranjero, y sus manifestaciones clínicas eran náuseas, epistaxis, trombocitopenia, mareos, petequias, hígado y/o bazo agrandado, es el único reporte que se tiene hasta la fecha en México, sin embargo es importante señal para que las instituciones de salud incluyan los diagnósticos de estudios de HGA para enfermedades infecciosas en México (Sosa-Gutierrez CG, Cervantes-Castillo MA, Laguna-Gonzalez R *et al.*, 2021). Por otra parte, la región mexicana cuenta con una variedad de climas y temperaturas favoreciendo escenarios variados para la distribución de garrapatas y patógenos, tal es el caso de la Comarca Lagunera y sus cercanías, caracterizado por su variación de temperaturas extremas, considerado como un clima seco templado y tiene una limitación de recursos híbridos, además de que su región mantiene a más de 100 mil cabezas de ganado vacuno productor de leche considerada como una de las más importantes de México (Inzunza-López, Jairo Omar, López-Ariza; 2011). Esta región formada por los estados del norte Coahuila y Durango, se tiene el primer reporte en muestras de sangre de la garrapata *R. sanguineos* colectados en caninos examinados por muestras de PCR y análisis filogenético con el gen 16S rRNA de las cuales tres muestras corresponden para *A. platys*, siendo la primera caracterización molecular y filogenética en el estudio de *A. platys* en perros en México (Consuelo Almazán, Vicente H. González-Álvarez, Isabel G; *et al.*, 2016).

En México, los estudios se han enfocado en *A. marginale* y la anaplasmosis bovina. En el año 2012, se reportaron 28 cepas mexicanas de *A. marginale* de diferentes estados como Morelos, Yucatán, Veracruz, Chiapas, Estado de México, Hidalgo, Aguascalientes y Tamaulipas. El estudio se enfocó en la principal proteína de superficie 1a (MSP1a) como marcador molecular para identificar las diferentes cepas de *A. marginale* en los rebaños del ganado bovino (Jiménez Ocampo R, *et al.*, 2012).

Por otra parte, en el año 2015, se identificaron nuevas cepas de *A. marginale* en dos rebaños de bovinos: la Joya (Jalisco) y el Verdineño (Nayarit) (Castañeda-Ortiz EJ, *et al.*, 2015). Por último, también se han realizado estudios a nivel genómico. Una colaboración entre el INIFAP y la UAEM, reportaron los genomas de nueve cepas mexicanas de *A. marginale* que provenían de ocho diferentes estados de la República Mexicana. El análisis muestra una comparación entre los genomas de las nueve cepas mexicanas y cepas de Brasil, Estados Unidos, Australia y Puerto Rico. Reportaron que las cepas mexicanas no sólo están relacionadas entre sí, sino que también están relacionadas genéticamente con otras regiones geográficas a nivel mundial (Martínez Ocampo F. 2022).

Patogenicidad y virulencia

La patogenicidad se define como la capacidad de un microorganismo para causar enfermedad en un hospedador, mientras que la virulencia se refiere al grado o intensidad con la que dicho microorganismo produce daño (Casadevall A y Pirofski LA, 2000). Ambos conceptos son fundamentales para comprender la interacción entre patógeno y hospedador, así como los mecanismos involucrados en el desarrollo de enfermedades infecciosas.

En bacterias intracelulares como las del género *Anaplasma*, la patogenicidad está estrechamente relacionada con su capacidad para invadir, sobrevivir y replicarse dentro de células del hospedador, como eritrocitos, leucocitos o plaquetas. Este proceso implica la acción de diversos factores de virulencia que permiten la adhesión celular, la colonización y la persistencia dentro del organismo (Finlay BB y Falkow S, 1997).

Islas de Patogenicidad.

Las islas de patogenicidad son regiones del genoma bacteriano que contienen grupos de genes asociados con la capacidad de causar enfermedad. Estas regiones suelen adquirirse mediante transferencia horizontal de genes y presentan características distintivas, como un contenido de GC diferente al resto del genoma y la presencia de elementos genéticos móviles, como

integrasas o transposasas (Hacker J y Kaper JB, 2000).

Los genes localizados en estas islas codifican diversos factores de virulencia, incluyendo proteínas de adhesión, sistemas de secreción, toxinas y mecanismos de evasión del sistema inmune. Debido a su origen evolutivo, las islas de patogenicidad pueden variar entre especies e incluso entre cepas de una misma especie, lo que contribuye a la diversidad en la capacidad patogénica (Schmidt H y Hensel M, 2004).

Avances genómicos recientes

En el año 2023 sólo se contaba con seis de las siete especies que integran el género *Anaplasma*. Posteriormente, en febrero de 2024, se realiza una actualización en la que se publicó el primer ensamblaje de *A. bovis* extraído de una cabra en china, teniendo el genoma más pequeño del género *Anaplasma* y un contenido de GC relativamente menor. El análisis filogenético de la secuencia ortóloga de copia única mostró que *A. bovis* estaba estrechamente relacionado con *A. platys* y *A. phagocytophilum*, pero relativamente lejos de las especies intraeritrocíticas de *Anaplasma*, también se mostró la formación de dos clados, el primer clado se conformaba por *A. capra*, *A. centrale*, *A. ovis* *A. marginale* y en el segundo clado estaba conformado por *A. bovis*, *A. platys* y *A. phagocytophilum*, es decir en el primer clado se unen las especies que infectan a los eritrocitos y el segundo clado a los que infecta a los leucocitos y plaquetas. *A. bovis* tenía 116 ortogrupos únicos y carecía de 51 ortogrupos en comparación con otras especies de *Anaplasma*. Los factores de virulencia de *A. bovis* fueron significativamente menores que los de *A. phagocytophilum*, lo que sugiere una menor patogenicidad de *A. bovis* (Han XY, Du LF, Lin ZT; *et al.*, 2024).

En el año 2025 se hizo nuevamente una revisión en la página de NCBI y encontramos 6 nuevos ensamblajes a nivel contig de *A. ovis* provenientes de china cuyas cepas son NX044, NX047, NX082, NX071, NX057, NX067, los cuales también se agregaron a este análisis (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=142058>).

HIPÓTESIS

El análisis genómico y filogenético *in silico* del género *Anaplasma* permitirá identificar marcadores moleculares específicos de especie que mejoren la detección y diferenciación de bacterias patógenas presentes en el sector pecuario en México.

JUSTIFICACIÓN

La anaplasmosis es una enfermedad de importancia en el sector pecuario debido a las pérdidas económicas que ocasionan a nivel mundial. En México, si bien la mayoría de los estudios y reportes se han enfocado en *A. marginale*, esta especie es la única que cuenta con genomas ensamblados en México, disponibles para su análisis bioinformático. Este género puede infectar diferentes tipos de células, como los eritrocitos, leucocitos y plaquetas, lo que sugiere una diversidad de estos patógenos.

Actualmente, la detección de la enfermedad anaplasmosis se realiza mediante métodos serológicos y moleculares, como PCR dirigida a genes conservados. Entre los marcadores moleculares más utilizados, se encuentran los genes *msp4*, *msp2*, el gen 16S rRNA, *groEL* y *virD4*. Sin embargo, estos presentan limitaciones importantes. El gen 16S rRNA, aunque es ampliamente utilizado, posee una alta conservación entre especies, lo que dificulta la discriminación específica. El gen *msp4* ha sido empleado en estudios filogenéticos debido a su estabilidad presentando una alta conservación genética entre las especies cercanas, lo que limita su especificidad. Se hizo un análisis mediante un BLAST del gen *msp4* de *A. marginale* (Oklahoma) en donde evidenció una identidad del ~92% y 100% de cobertura con secuencias de *Anaplasma ovis*, así como otras similitudes con otras especies como *A. centrale* lo que demuestra su baja capacidad discriminatoria. Por otro lado, el gen *msp2* presenta una alta variabilidad genética y está sujeto a eventos de recombinación y variación genética. Lo que dificulta su uso como marcador estable y reproducible. El gen *groEL*, aunque es útil en estudios filogenéticos, presenta una conservación amplia entre diferentes especies del mismo género. Finalmente, el gen *virD4*, asociado al sistema de secreción tipo IV, ha sido utilizado principalmente en *A. marginale*, por lo que se restringe su aplicación como marcador universal dentro del género.

Estas limitaciones evidencian que los marcadores moleculares tradicionales no cumplen con los criterios de especificidad y en consecuencia detectar diagnósticos erróneos dificultando la implementación de estrategias de control adecuadas.

Además de que en México no se han realizados suficientes estudios de genómica comparativa de este género que permita conocer la diversidad de estos patógenos, es necesario llevar a cabo análisis genómicos comparativos por medio de análisis *in silico* para mejorar la detección y diagnóstico de la enfermedad anaplasmosis, siendo más precisas ayudando a la prevención en el sector pecuario en México.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar marcadores moleculares específicos de especie, mediante el análisis de genómica comparativa, que permitan la detección de bacterias patógenas del género *Anaplasma* en el sector pecuario en México.

Objetivos particulares

- Determinar las relaciones filogenómicas entre las especies del género *Anaplasma*.
- Caracterizar el pangenoma del género *Anaplasma*.
- Identificar marcadores moleculares específicos de especie mediante análisis *in silico*.
- Validar experimentalmente los marcadores moleculares mediante PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Creación de una base de datos del género *Anaplasma*

Se realizó una exhaustiva búsqueda de secuencias genómicas del género *Anaplasma* disponibles en bases de datos reconocidas a nivel internacional: NCBI (National Center Biotechnology Information), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, ENA (European Nucleotide Archive) <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home> y DDBJ (DNA Data Bank of Japan) <https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>, posteriormente se diseñaron tablas para clasificar las secuencias de los genomas del género *Anaplasma* según la siguiente información: nombre de la especie, total de genomas obtenidos, nombre de la secuencia ensamblada, su número de acceso GenBank, nombre del organismo, tipo de especie y nivel de ensamblaje en que se encuentra (completos, cromosoma, scaffold, contig). Los genomas se obtuvieron en formato *.fna, y con esta información se creó una base de datos alojada en un servidor perteneciente al Centro de Investigación de Dinámica Celular en el laboratorio de Bioinformática y Genómica Comparativa. Las secuencias se organizaron en directorios clasificados por género, especie y tipo de ensamblaje. Para evaluar la calidad de los genomas obtenidos, se empleó el programa CheckM v1.1, el cual permite identificar una amplia gama de errores de los genomas aislados disponibles públicamente (Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT *et al.*, 2015).

Con el fin de caracterizar los genomas, se descargó la sección Assembly statistics report en formato (.txt) desde la base de datos. A través de un script, comandos básicos en la terminal de linux y el archivo de entrada en formato (.txt) se extrajo información relevante sobre el ensamblaje, el nombre del organismo, el tipo de muestra, hospedero, el número de acceso a GenBank, la longitud del genoma, el número de replicones (cromosomas y plásmidos) o fragmentos de DNA (Scaffolds y Contigs).

Para determinar el contenido de G+C de los genomas se utilizó el programa Quast, empleando los genomas como archivos (*.fna) de entrada.

Análisis pangenómico

Para validar su taxonomía de las especies del género *Anaplasma*, se llevaron a cabo dos análisis principales: i) análisis filogenómico y ii) análisis filogenético. El análisis filogenómico se realizó mediante la concatenación de secuencias del genoma core (también llamado genoma núcleo o básico), utilizando los programas Prokka, Roary y get homologues.

Prokka predijo e identificó genes, secuencias codificantes (CDS), genes de RNA ribosomal (rRNA), secuencias repetidas, RNAs de transferencia (tRNAs) y RNAs mensajeros de transferencia (tmRNAs) (Seemann T; 2014). Los archivos de salida de Prokka en formato *.gff se emplearon como entrada en Roary, que ayudó en la construcción de pangenomas e identificación de genes core, es decir, aquellos genes compartidos por los genomas de interés (Page et al., 2015). Finalmente, los archivos de salida de Roary se introdujeron en la herramienta visual phandango (<https://jameshadfield.github.io/phandango/#/>), el cual se podría presenciar la presencia y ausencia de genes del género *Anaplasma*.

Los archivos de salida en formato *.gbk de Prokka sirvieron como archivos de entrada para el programa get homologues.

Esta última herramienta identificó los clústeres de genes ortólogos mediante una colección de scripts en Perl implementados en GET_HOMOLOGUE, aplicando tres algoritmos: Bidirectional Best Hit (BDBH), clusters of Orthologous Genes (GOG triangles) y Ortho Markov Cluster (OMCL) con un valor de inflación de 1.5. La agrupación de las secuencias codificantes (CDSs) en grupos de ortología se llevó a cabo usando los siguientes parámetros: un umbral de valor E de $> 1 \times 10^{-5}$ para búsquedas blastp, una cobertura mínima de alineamientos del 75% y la búsqueda de dominios pfam y el filtro de composición (-D) para refinar las definiciones de ortología basadas en similitud.

El genoma núcleo, definido como el conjunto de clústeres ortólogos presentes en todos los genomas, se determinó usando el script compare_clusters.pl con el consenso de los tres algoritmos y la opción -y 0 (para reportar todos los clústeres), -m (para generar la matriz de intersección del pangenoma) y -T (para construir un árbol de pangenoma basado en parsimonia). Los subconjuntos restantes del pangenoma-softcore (presente en $\geq 95\%$ de los genomas), Shell (presente en >2 pero $<95\%$ de los genomas) y cloud (presente en ≤ 2 genomas) se clasificaron usando el parse_pengome_matrix.pl script con la opción -s.

Análisis filogenómico

Los genes ortólogos de copia única se identificaron usando los tres algoritmos de búsqueda y agrupamiento implementados en GET_HOMOLOGUES v3.7.1. El conjunto consenso de genes ortólogos obtenidos a partir de estos algoritmos se utilizó para reconstruir la filogenia del género *Anaplasma* con el pipeline GET_PHYLOMARKERS v2.1.0. Las secuencias proteicas de los genes ortólogos se alinearon inicialmente usando Clustal Omega, y los alineamientos resultantes se convirtieron a alineamientos basados en codones con PAL2NAL (<https://github.com/liaochenlanruo/PAL2NAL>). Posteriormente, estos alineamientos codónicos se evaluaron en busca de evidencia de recombinación mediante la prueba PHI, y aquellos que mostraron señales significativas de recombinación se excluyeron de análisis posteriores.

Para cada alineamiento sin recombinación, se infirieron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud (ML) usando IQ-TREE v2.3.1, que realiza selección automática de modelos con ModelFinder. Los árboles génicos resultantes se examinaron después para detectar posibles valores atípicos mediante el paquete de R kdetrees v0.1.5. Posteriormente, la señal filogenética de cada árbol génico se evaluó con base en sus valores medios de soporte de rama, conservando sólo aquellos con un soporte medio de bipartición tipo Shimodaira–Hasegawa (SH-aLRT) 0.75 (parámetro: -m 0.75). Finalmente, los alineamientos que pasaron todos los filtros de calidad se concatenaron y se usaron para una reconstrucción final del árbol de especies por máxima verosimilitud con IQ-TREE, incluyendo el ajuste del modelo, para estimar la filogenia basada en genomas. Además, se aplicaron pruebas de pares emparejados máximos (maximal matched-pairs tests) para evaluar posibles violaciones de los supuestos de Estacionariedad, Reversibilidad y Homogeneidad (SRH) que subyacen a los modelos filogenéticos de ML, tal como se implementa en IQ-TREE. Asimismo, se empleó ASTRAL-

IV para estimar el árbol de especies directamente a partir de los árboles génicos ML filtrados, proporcionando estimaciones de longitud de rama (tanto terminales como internas) en unidades de sustituciones por sitio.

Análisis filogenético

Para en análisis filogenético se enfocó en el gen 16 sRNA para las especies que no cuentan con un genoma disponible, utilizando como herramientas bioinformáticas los programas JModelTest, PhyML y FigTree; que permitieron identificar las relaciones evolutivas de las especies del género *Anaplasma*.

Genómica comparativa

Adicionalmente, se realizó un segundo análisis de validación taxonómica mediante genómica comparativa, con el programa ANI (identidad de promedio de nucleótidos) utilizando como archivos de entrada los genomas en formato*.fna de las diferentes especies del género *Anaplasma*.

Finalmente, con el servidor Proksee se utilizó para la visualización del genoma y la comparación genómica del Género *Anaplasma* con la herramienta blast ring formando mapas interactivos circulares.

Identificación de las proteínas relacionadas con la patogenicidad, resistencia a antibióticos y evasión del sistema inmune.

Para la identificación de proteínas asociadas con la patogenicidad, resistencia a antibióticos y la posible evasión del sistema inmune en los genomas del género *Anaplasma* se utilizaron bases de datos especializadas. Entre ellas, se incluye PathogenFinder, una herramienta bioinformática que predice la probabilidad de que una bacteria sea patógena para humanos, basándose en la presencia de familias de proteínas asociadas a organismos patógenos, basada en un análisis estadístico (Cosentino, S., Voldby Larsen *et al*; 2013).

ResFinder, desarrollado en Perl, el cual detecta genes de resistencia a los antimicrobianos en datos de secuenciación (Florensa AF, Kaas RS, *et al.*, 2022), se utilizó CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) y de VirulenceFinder, bases de datos relacionada a la resistencia de antibióticos e identificación de genes de virulencia. Para dilucidar los mecanismos patógenos en enfermedades infecciosas se utilizó VFDB (Virulence Factor Database) esto con el fin del desarrollo de nuevos enfoques de tratamiento y prevención de enfermedades (Chen L, Yang J, Yu J, Yao Z *et al*;2005) y PAIDB (Pathogenicity Island Database) dedicada a proporcionar información completa sobre las islas de patogenicidad y candidatos en genomas procarióticos (Yoon SH, Park YK, Kim JF; 2015), por mencionar algunos.

Identificación de los marcadores moleculares

Se calcularon matrices pangenómicas a partir de múltiples análisis comparativos, tanto a nivel de cepas dentro de la misma especie, como entre clados de diferentes especies, así como para el conjunto completo de genomas pertenecientes al género *Anaplasma*. Mediante matrices pangenómicas se identificaron posibles marcadores moleculares a nivel de género y especie con la ayuda del programa phandango. Una vez identificados los marcadores, fueron mapeados a 100pb upstream y downstream en los genomas para el diseño de oligonucleótidos externos y con el programa Ugene se identificaron los oligos internos para la PCR anidada. Estos oligos se diseñaron de tamaño de 18-25 oligonucleótidos, con una temperatura de “annealing” aproximadamente de 60 °C y un 40-60% de contenido de GC.

Extracción de DNA

Para la validación de los oligos sintetizados, se recolectaron y procesaron muestras de sangre de ganado bovino provenientes de distintas unidades de producción del estado de Morelos, específicamente en los municipios de Temoac, Zacualpan de Amilpas y Cuernavaca. Las muestras se obtuvieron por punción de la vena coccígea (ubicada en la base de la cola del animal). Durante la recolección, se registraron datos como edad, sexo y fecha de muestreo.

Las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos de 4 mL, los cuales contienen el anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), que evita la coagulación de la sangre y preserva las células sanguíneas (eritrocitos, leucocitos y plaquetas).

El DNA genómico bacteriano fue extraído mediante el método tradicional de fenol-cloroformo. Se trabajó con seis muestras de 200 µL de sangre y sus respectivos duplicados, obteniéndose un total de 12 muestras. Estas se identificaron con el número de arete del bovino: 0700 CS, 9845 CS, 6567 CS, 0715 SN/SA, 0378 CS y 3450 CS.

El procedimiento de extracción inició con la fase de la lisis, se adición de 200 µL de Tris-EDTA 0.5 M (EDTA 5 mM, Tris 0.025 M pH 8) a cada muestra, el cual actúa como agente quelante que se une a iones metálicos, protege el DNA y facilita la lisis celular. Se agregaron 40 µL de proteinasa K y se mezclaron en el vórtex y se incubaron durante 30 minutos a 56 °C.

Después de la incubación, se añadieron 400 µL de fenol-cloroformo, se mezcló nuevamente en vórtex por 10 segundos y se centrifugó por 3 minutos con 30 segundos a 14,000 rpm a temperatura ambiente (aprox. 25 °C). En la etapa de precipitación y lavado de DNA, se recuperaron 400 µL del sobrenadante, a los que se añadió una solución salina (NaCl) en volumen 1:1 se mezclaron manualmente por inversión y se añadió dos volúmenes de alcohol isopropílico. Se mezclaron y se precipitaron a -20 °C toda la noche, al finalizar la incubación se centrifugaron por 15 minutos a 14,000 rpm.

El sobrenadante fue decantado cuidadosamente para conservar el pellet de DNA. Este se lavó con 1 mL de etanol al 70 % y se centrifugó por 1 minuto con 30 segundos a 14,000 rpm. El etanol fue eliminado, y el pellet se dejó secar sobre papel absorbente durante 5 minutos. Finalmente, se incubó brevemente para evaporar completamente el etanol residual y se resuspendió el DNA en agua libre de nucleasas.

Para la visualización del DNA extraído, se preparó un gel de agarosa al 1 %, utilizando 0.35 g de agarosa en 35 mL de solución tampón TAE 1×. Se añadió Diamond™ Nucleic Acid Dye a la mezcla para permitir la visualización del DNA bajo luz ultravioleta (UV). Las muestras se cargaron en el gel y se sometieron a electroforesis a 90 volts y 400 miliamperios durante 20 minutos. Las bandas se visualizaron mediante luz UV.

Además de la visualización en gel, se realizó una cuantificación de la pureza del DNA mediante espectrofotometría, evaluando las relaciones de absorción 260/280 nm (indicador de proteínas) y 260/230 nm (indicador de contaminantes como fenol y sales).

Finalmente, se realizaron pruebas de PCR utilizando los oligos diseñados y validados con controles positivos provistos por la Unidad de Anaplasmosis del CENID-SAI (INIFAP). La técnica empleada fue PCR anidada, seleccionada por su alta especificidad en la detección de *Anaplasma* spp.

PCR anidada

Se llevó a cabo una PCR anidada para la detección de *Anaplasma marginale*, especie de mayor estudio en México y para la cual disponemos de controles positivos. Para la PCR anidada emplea dos rondas de amplificación y se disponen de dos pares de oligonucleótidos reportados en la literatura (Leandro Silva Andrade, Rayanne Soalheiro de Souza, *et al.*, 2024). En la primera reacción se amplificó para el gen *msp4*, obteniendo un fragmento de 872pb con los siguientes oligonucleótidos externos:

Forward: 5'-GGGAGCTCCTATGAATTACAGAGAATTGTTTC-3'

Reverse: 5'-CCGGATCCTTAGCTGAACAGGAATCTTGC-3'

Para la segunda reacción también sobre el gen *msp4*, se obtuvo un producto de 294pb utilizando los oligonucleótidos internos:

Forward: 5'-CGCCAGCAAACCTTTTCCAAA-3'

Reverse: 5'-ATATGGGGACACAGGCAAAT-3'

Una vez teniendo los oligonucleótidos sintetizados, se preparó el “mix” de reacción para un volumen total de 24µL multiplicado por 3. En un tubo estéril se añadió 15µl de máster mix (*Taq* DNA polimerasa, dNTP, MgCl₂ y tampón de reacción) 7 µl de agua libre de nucleasas, 1 µl de los oligos (F y R), una vez obtenido esta muestra se mezcla suavemente y se distribuye 23 µl en cada tubo de PCR (C- (agua), C+ (positivo a *A. marginale*)) a cada uno de esos tubos se le añade 1 µl del DNA molde extraído de las muestras de sangre y se coloca en el termociclador automático.

Para la segunda PCR, se preparó el mix de igual forma que en la primera sólo que el molde de DNA sería el producto de la primera PCR y se colocó en el termociclador automático. Finalmente se preparó el gel de agarosa al 1.2% utilizando .36 gr de agarosa y 30 ml de TAE al 1% y se visualizó bajo la luz UV.

Una vez obtenidas muestras positivas a *A. marginale*, el siguiente paso del proyecto consistiría en sintetizar los oligonucleótidos diseñados a partir de los análisis pangenómicos y evaluarlos utilizando controles positivos y negativos, con el fin de determinar su capacidad para detectar la secuencia del gen objetivo y su correcta amplificación.

RESULTADOS

Creación de una base de datos del género *Anaplasma*

Se realizó una búsqueda de secuencias genómicas del género *Anaplasma* en las principales bases de datos internacionales: NCBI (National Center Biotechnology Information), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, ENA (European Nucleotide Archive) <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home> y DDBJ (DNA Data Bank of Japan) <https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>. En la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) se identificaron un total de 66 ensamblajes genómicos del género *Anaplasma* (**Tabla 1**). La clasificación de estos ensamblajes según su nivel (completo, cromosoma, scaffold y contig) se presenta detalladamente en la **Tabla 2**. En la base de datos ENA (European Nucleotide Archive, EMBL-EBI) se registraron 73 genomas correspondientes a distintas especies del género *Anaplasma*, teniendo el total por especie se muestra en la **Tabla 3** y los niveles de ensamblaje se describen en la **Tabla 4**. Finalmente, en la base de datos DDBJ (DNA Data Bank of Japan) se obtuvieron 24 ensamblajes genómicos, los cuales se presentan en la **Tabla 5**.

Tabla 1. Información general obtenida en la base de datos de NCBI, genomas del género *Anaplasma* con la siguiente información: especie, hospedador, genomas disponibles, tipo de célula que infecta, tipo de vector, clima.

Especie	Hospedero	Genomas disponibles en NCBI (datos obtenidos 2026)	Tipo de célula que infecta	Tipo de vector	Clima
<i>Anaplasma platys</i>	Perros	1	Plaquetas	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Tropicales y subtropicales
<i>Anaplasma capra</i>	Ovejas, Cabras	2	Eritrocitos (Glóbulos rojo)	<i>Ixodes persulcatus</i> , <i>Haemaphysalis longicornis</i> , <i>H. concinna</i> , <i>H. quinghaiensis</i> y <i>Rhipicephalus microplus</i>	Clima monzónico subtropical, templado, seco y pocas lluvias.
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Amplio rango de huéspedes: pequeños mamíferos, rumiantes, caballos, aves, gatos, perros, humanos.	33	Neutrófilos	<i>Ixodes</i> (<i>scapularis</i> , <i>ricinus</i> , <i>persulcatus</i> , <i>trianguliceps</i> , <i>hexagonus</i> , <i>spinipalpis</i> , <i>ovatus</i>)	Países tropicales
<i>Anaplasma ovis</i>	Ovejas, Cabras, Bovinos	8	Eritrocitos	<i>Ixodes</i> , <i>Dermacentor</i> , <i>Rhipicephalus</i> y <i>Amblyomma</i>	Áreas tropicales y subtropicales

<i>Anaplasma bovis</i>	Ovejas, Cabras	1	Monocitos	<i>R. appendiculatus</i> , <i>Am.gemma</i> , <i>A. variegatum</i> , <i>R. evertsi evertsi</i> , <i>Hyalomma truncatum</i> , <i>hy. Rufipes</i> y <i>Rhipicephalus praetextatus</i>	Subtropical y temperaturas cálidas
<i>Anaplasma centrale</i>	Bovinos	1	Eritrocitos	<i>Ixodes scapularis</i>	Clima seco
<i>Anaplasma marginale</i>	Bovinos	24	Eritrocitos	<i>Dermacentor</i> , <i>Rhipicephalus</i> , <i>Rhipicephalus microplus</i>	Áreas tropicales y subtropicales
<i>Anaplasma endosimbionte de Hyalomma asiaticum</i>	Corzo	1	No definido	<i>Hyalomma asiaticum</i>	Clima seco
<i>Anaplasma sp.</i>	No definido	1	No definido	No definido	No definido
<i>Candidatus Anaplasma sp.</i>	Cabra	1	No definido	No definido	No definido
<i>Anaplasma odocoilei</i>	No definido	0	No definido	No definido	No definido
Total de genomas		73			

Tabla 2. Nivel de ensamblaje de los genomas del género *Anaplasma*.

Obtenida en la base de datos de NCBI, de los genomas del género *Anaplasma* con la siguiente información: genomas totales, ensamblaje a nivel completo, ensamblaje a nivel cromosomal, ensamblaje a nivel Scaffold, ensamblaje a nivel contig.

Especie					Genomas disponibles en NCBI (datos obtenidos en 2026)
Base de datos NCBI	Genomas totales	Completos	Cromosomas	Scaffold	Contings
<i>Anaplasma platys</i>	1		1		
<i>Anaplasma capra</i>	2			2	
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	33	6	1	6	22
<i>Anaplasma ovis</i>	8	1		1	6
<i>Anaplasma bovis</i>	1				1
<i>Anaplasma centrale</i>	1	1			
<i>Anaplasma marginale</i>	24	2	4	1	17
<i>Candidatus anaplasma sp</i>	1				1
<i>Anaplasma endosimbionte de Hyalomma asiaticum</i>	1				1
<i>Anaplasma sp.</i>	1				1
<i>Anaplasma odocoilei</i>	0				0
Total	73				

Tabla 3. Total, de genomas del género *Anaplasma* obtenida en la base de datos de ENAEMBL-EBI

<i>Anaplasma platys</i>	
Base de datos Especie ENA EMBL-EBI	Total de Genomas
<i>Anaplasma capra</i>	2
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	38
<i>Anaplasma ovis</i>	3
<i>Anaplasma bovis</i>	0
<i>Anaplasma centrale</i>	1
<i>Anaplasma marginale</i>	24
<i>Anaplasma sp.</i>	1
<i>Candidatus Anaplasma sp. TIGMIC</i>	1

Tabla 4. Nivel de ensamblaje obtenida en la base de datos ENAEMBL-EBI, de los genomas del género *Anaplasma*, con la siguiente información: genomas totales, ensamblaje a nivel completo, ensamblaje a nivel cromosomal, ensamblaje a nivel Scaffold, ensamblaje a nivel contig

Base de Datos Especie ENA EMBL-EBI	Total de genomas	Completo	Cromosomas	Scaffold	Contigs
<i>Anaplasma platys</i>	1	0	1	0	0
<i>Anaplasma capra</i>	2	0	0	2	0
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	38	6	1	9	22
<i>Anaplasma ovis</i>	3	2		1	
<i>Anaplasma bovis</i>	1	0	0	0	1
<i>Anaplasma centrale</i>	1	1			
<i>Anaplasma marginale</i>	24	2	4	1	17
<i>Anaplasma sp.</i>	1			1	
<i>Candidatus Anaplasma sp. TIGMIC</i>	1				1
Total de ensamblaje	72				

Tabla 5. Total de Genomas obtenida en la base de datos DDBJ, del género *Anaplasma* con la siguiente información: genomas totales, ensamblaje a nivel completo, ensamblaje a nivel cromosomal, ensamblaje a nivel scaffold, ensamblaje a nivel contig

Base de Datos DDBJ	Genomas Total	Completos	Cromosomas	Scaffold	Contigs
Nombre	Organismo	Refseq	Completo	Cromosomas	Contigs
Haibei	<i>Anaplasma Ovis</i>	SAMN02739299	1		
ASM333112v1	<i>Anaplasma marginale MEX-01-001-01</i>	PRJNA476110			1
ASM351567v1	<i>Anaplasma marginale Palmeira</i>	GCA_003515675.1		1	
ASM880130v1	<i>Anaplasma marginale MEX-30-184-02</i>	GCA_008801305.1			1
ASM880132v1	<i>Anaplasma marginale (a-proteobacteria) MEX-30-193-01</i>	GCA_008801325.1			1
ApCRT35_1.0	<i>Anaplasma phagocytophilum str. CRT35</i>	GCA_000689615.1			1
ASM2347657v1	<i>Anaplasma phagocytophilum AKS2020-120P</i>	GCA_023476575.1			
ASM49553v1	<i>Anaplasma marginale str. Dawn (a-proteobacteria)</i>	GCA_000495535.1		1	

<u>MRK1.0</u>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> str. MRK (agent of human granulocytic	GCA_000689655.1			1
ASM880127v1	<i>Anaplasma marginale</i> MEX-17-017-01	GCA_008801275.1			1
ASM869025v1	<i>Anaplasma marginale</i> MEX-15-099-01	GCA_008690255.1			1
ASM869026v1	<i>Anaplasma marginale</i> MEX-31-096-01	GCA_008690265.1			1
ApNorV2_1.0	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> str. Norway variant2	GCA_000689635.1			1
ASM21560v2	<i>Anaplasma marginale</i> str. Okeechobee	GCA_000215605.2			1
ASM1194v1	<i>Anaplasma marginale</i> str. St. Maries	GCA_000011945.1	1		
ASM47842v1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> str. HGE1	GCA_000478425.1			1
ASM17251v1	<i>Anaplasma marginale</i> str. Virginia	GCA_000172515.1			1
ASM47844v1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> str. CRT38	GCA_000478445.1			1
ASM21556v2	<i>Anaplasma marginale</i> str. Oklahoma	GCA_000215565.2			1
ASM21550v2	<i>Anaplasma marginale</i> str. Florida Relapse	GCA_000215505.2			1
ASM21558v2	<i>Anaplasma marginale</i> str. South Idaho	GCA_000215585.1			1
<u>MRK1.0</u>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> str. MRK (agent of human granulocytic	GCA_000689655.1			1
ASM21554v2	<i>Anaplasma marginale</i> str. Washington Okanogan	GCA_000215545.2			1
ASM49549v1	<i>Anaplasma marginale</i> str. Gypsy Plains	GCA_000495495.1		1	
ASM333112v1	<i>Anaplasma marginale</i> MEX-01-001-01	GCA_003331125.1			1

Selección y procesamientos de datos genómicos:

Para el desarrollo de este proyecto, se eligió utilizar la base de datos del NCBI, debido a su acceso a las secuencias genómicas. Tras realizar una búsqueda, se seleccionaron y

clasificaron los genomas, organizándose en tablas y descargando las secuencias correspondientes. Estas secuencias fueron posteriormente subidas a un servidor dedicado para la creación de la base de datos (**Figura 1**).

```
karla@lort:/SCRATCH/db/Anaplasma/genomas$ | |
all_anaplasma          anaplasma_phagocytophilum
anaplasma_candidatus_sp anaplasma_platys
anaplasma_marginale    anaplasma_platys
anaplasma_capra        anaplasma_ovis
anaplasma_ovis
```

Figura 1. Se muestra el servidor con los directorios creados y dentro de ellas los genomas del género *Anaplasma* en formato (*.fna) que se obtuvieron de la base de datos NCBI.

Dentro de la base de datos, se formaron directorios jerárquicos a nivel de género, especie y ensamblaje de cada genoma. Además, se descargaron estadísticas de ensamblaje para recopilar información general sobre cada genoma.

En total, se obtuvieron 73 genomas, distribuidos de la siguiente manera: 24 genomas de *A.marginale*, 33 de *A.phagocytophilum*, 8 de *A.ovis*, 1 de *A. platys*, 1 de *A. bovis*, 2 *A. capra*, 1 de *A. centrale*, 1 del *Candidatus anaplasma sp TIGMIC*, 1 de *Anaplasma sp* y 1 *Aaplasma endosymbiont of Hyalomma asiaticum* (**Tabla 6**).

Especie	GenBank	Biosample	Organism name	Intraspecific name
Anaplasma centrale	GCA_000024505.1	SAMN02604279	Anaplasma centrale str. Israel (a-proteobacteria)	Israel
Anaplasma marginale	GCA_000011945.1	SAMN02604305	Anaplasma marginale str. St. Maries (a-proteobacteria)	St. Maries
Anaplasma marginale	GCA_000020305.1	SAMN02604306	Anaplasma marginale str. Florida (a-proteobacteria)	Florida
Anaplasma ovis	GCA_002214625.2	SAMN02739299	Anaplasma ovis str. Haibei (a-proteobacteria)	Haibei
Anaplasma phagocytophilum	GCA_000013125.1	SAMN02604015	Anaplasma phagocytophilum str. HZ (agent of human granulocytic ehrlichiosis)	HZ
Anaplasma phagocytophilum	GCA_000439755.1	SAMN02604172	Anaplasma phagocytophilum str. HZ2 (agent of human granulocytic ehrlichiosis)	HZ2
Anaplasma phagocytophilum	GCA_000439775.1	SAMN02604171	Anaplasma phagocytophilum str. JM (agent of human granulocytic ehrlichiosis)	JM
Anaplasma phagocytophilum	GCA_000689635.2	SAMN02647161	Anaplasma phagocytophilum str. Norway variant2 (agent of human granulocytic ehrlichiosis)	Norway variant2
Anaplasma phagocytophilum	GCA_013487825.1	SAMN02647162	Anaplasma phagocytophilum str. Norway variant1 (agent of human granulocytic ehrlichiosis)	Norway Variant 1
Anaplasma phagocytophilum	GCA_023278635.1	SAMN10782609	Anaplasma phagocytophilum (agent of human granulocytic ehrlichiosis)	KZ-A1

Tabla 6. Información acerca del nombre de la especie, ensamblada, su número de acceso a GenBank, nombre de la secuencia, y el nombre infraespecífico.

Análisis de Calidad Genómica mediante CheckM:

Para determinar la calidad de los genomas obtenidos, se utilizó el programa CheckM.

Un ejemplo representativo de las líneas de comandos del programa CheckM:

```
$ nohup checkmtaxonomy_wf genus Anaplasma -t 10 -x fna genomas checkm_output &
```

En donde los parámetros son:

nohup checkm > archivo de salida

taxonomy_wf genus Anaplasma > taxonomía del género *Anaplasma*

fna > los archivos de entrada en formatos. fna

checkm_output > Directorio de salida de CheckM

Al ejecutar el programa, se generó un nuevo directorio de salida denominado CheckM_output, junto con un archivo de texto plano llamado nohup.out. Este archivo de texto fue fundamental para obtener información detallada sobre la calidad de los genomas analizados. Al revisar el archivo nohup.out, se presentaron varios parámetros clave:

- **Bin ID:** Corresponde al número de acceso en GenBank.
- **Marker Lineage:** Indica que los genomas pertenecen al género *Anaplasma*.
- **Genomes:** Se refiere al número total de genomas o identidades genómicas.
- **Marker Set:** Es el conjunto completo de marcadores utilizados para la evaluación genómica.

Los tres últimos son los más importantes para el análisis:

- **Completeness:** Indica el grado de completitud de los genomas.
- **Contamination:** Muestra la presencia de material genético contaminante, es decir, de otros organismos no pertenecientes al genoma en estudio.
- **Strain Heterogeneity:** Mide la variabilidad genética dentro de una sola cepa o especie. Un valor alto de heterogeneidad (100) puede indicar la existencia de subpoblaciones genéticamente distintas dentro de un mismo organismo (Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT et al., 2015).

Con base en estos datos, fue posible determinar la calidad de los genomas, permitiendo un análisis más preciso y la exclusión de aquellos genomas de baja calidad (**Figura 2**).

```
Finished parsing hits for 1 of 1 (100.00%) bins.
```

Bin Id	Marker lineage	# genomes	# markers	# marker sets	0	1	2	3	4	5+	Completeness	Contamination	Strain heterogeneity
GCA_002214625.2	Anaplasma (5)	2	688	127	10	673	4	1	0	0	97.63	0.56	71.43

```
[2024-03-05 12:43:46] INFO: { Current stage: 0:00:00.242 || Total: 0:01:54.706 }
```

Figura 2. Visualización de los archivos de salida del programa CheckM en texto plano simple (nohup).

Estos datos se colocaron en una tabla de forma ordenada para una mejor visualización, determinamos los de mejor calidad con un porcentaje de Completeness mayor del 80 % y descartamos los de baja calidad menor del 80% y para los niveles de contaminación con un porcentaje menor del 20%.

De acuerdo con estos parámetros, de los 73 genomas disponibles en la base de datos descartamos los genomas de la especie *A. phagocytophilum* con acceso a Genbank GCA_900088645.1(ANAPRD1), GCA_900088605.1(ANAPC2), GCA_900088655.2 (ANAP H2_2), GCA_900088665.2 (ANAPC5), por tener altos niveles de contaminación y GCA_900088675.2 por tener un número de contigs 300, como parámetro seleccionamos genomas de menor de 300 contigs debido a que al superar este dato podría deberse a una fragmentación excesiva, disminuyendo la calidad de los genomas (García-López R, Vázquez-Castellanos JF, Moya A; 2015).

Otros genomas que fueron descartados fueron de la especie *A. marginale* GCA_000215585.2 (South Idaho), GCA_000215605.2 (Okeechobee) por tener un número de contigs de 358 y 403 y GCA_000215545.2 (AFMW) por estar contaminado (presencia de DNA de otros organismos dentro del genoma ensamblado). *A. sp* GCA_028802975.1 (tick_bin1), también fue descartado por estar contaminado. En el análisis de ANI, un *A. ovis* con ensamblaje a nivel scaffold GCA_002849345.1(Idaho) fue descartado por ser 99 % idéntico a un *A. marginale*, es decir que posiblemente estuviera clasificado de manera incorrecta. De un total de 24 genomas de *A. marginale* identificados se descartaron 3, teniendo un total de 21 genomas, de 8 genomas de *A. ovis* se descartó 1 de 33 genomas de *A. phagocytophilum* quedó un total de 29 genomas.

Finalmente, la base de datos se conformaba de 64 genomas por analizar, teniendo 21 genomas de *A. marginale*, 29 genomas de *A. phagocytophilum*, 2 genomas de *A. capra*, 7 genomas de *A. ovis*, 1 genoma de *A. bovis*, 1 de *Candidatus Anaplasma sp.* TIGMIC, 1 genoma de *A. endosymbiont of Hyalomma asiaticum*, 1 genoma de *A. centrale* y 1 genoma de *A. platys*. Con el programa Quast versión 3.0 se identificó sus % GC, teniendo como resultado: *A. centrale* con un 49.98%, *A. marginale* de los 21, se hizo un promedio total de 49.78%, *A. ovis* con 48.98%, *A. capra* 48.32%, *A. platys* con un 45.47%, *Candidatus Anaplasma sp.* TIGMIC 45.26%, *A. endosymbiont of Hyalomma asiaticum* 43%, *A. bovis* 42.94% y de los 29 genomas de *A. phagocytophilum* dieron un promedio de 41.69%.

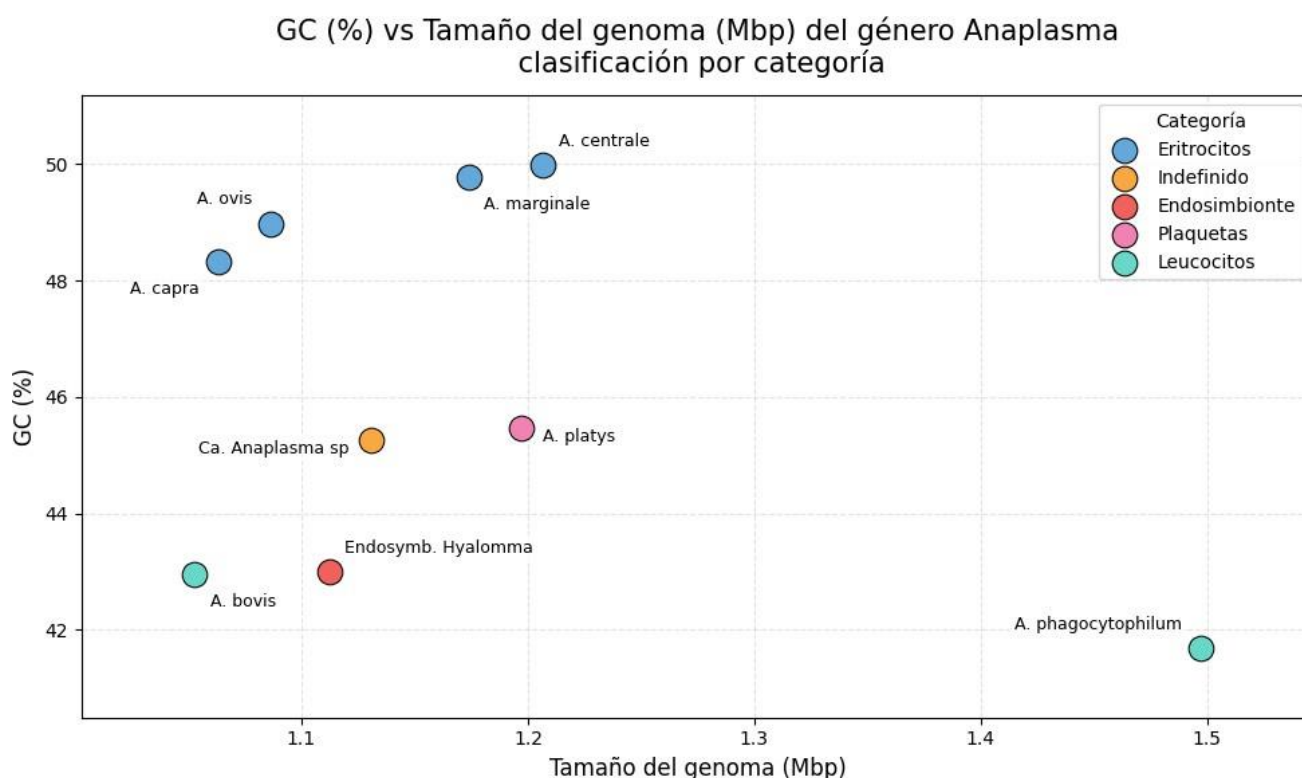


Figura 3. Relación entre el porcentaje de contenido GC (%) y el tamaño del genoma (Mbp) en especies representativas del género *Anaplasma*. Los valores corresponden al promedio de genomas completos disponibles en la base de datos NCBI (2025). Las especies se clasificaron según su tropismo celular en eritrocitos, plaquetas, leucocitos, endosimbiontes o categoría indefinida. Se observa variación en el contenido GC y en el tamaño genómico entre especies, destacando *A. phagocytophilum* por presentar el mayor tamaño genómico y menor porcentaje de GC en comparación con las especies que infectan eritrocitos.

Los ensamblajes (formato FASTA) fueron evaluados con QCAST v3.0 (Quality Assessment Tool for Genome Assemblies), herramienta destinada a la evaluación de calidad de ensamblajes con y sin genoma de referencia.

En el análisis comparativo del contenido de GC (%) y el tamaño del genoma (Mbp) del género *Anaplasma* mostró una variación amplia en el contenido GC (41.69-49.98%) y con una variación de tamaños de entre (1.05-1.50 Mbp). Se observó que las especies asociadas a eritrocitos tienen rango elevados de contenido de porcentaje de GC (48.32-49.98%) y tamaños de entre 1.06-1.21Mbp.

A. platys y *Candidatus anaplasma sp.* Presentaron valores intermedios (45.26-45.47%) con tamaños de alrededor de 1.13-1.20 Mbp. Finalmente *A. phagocytophilum* destacó como el caso más variado, al presentar el genoma de mayor tamaño y un contenido de GC bajo, siendo el más alejado del resto de las especies (**Figura 3**).

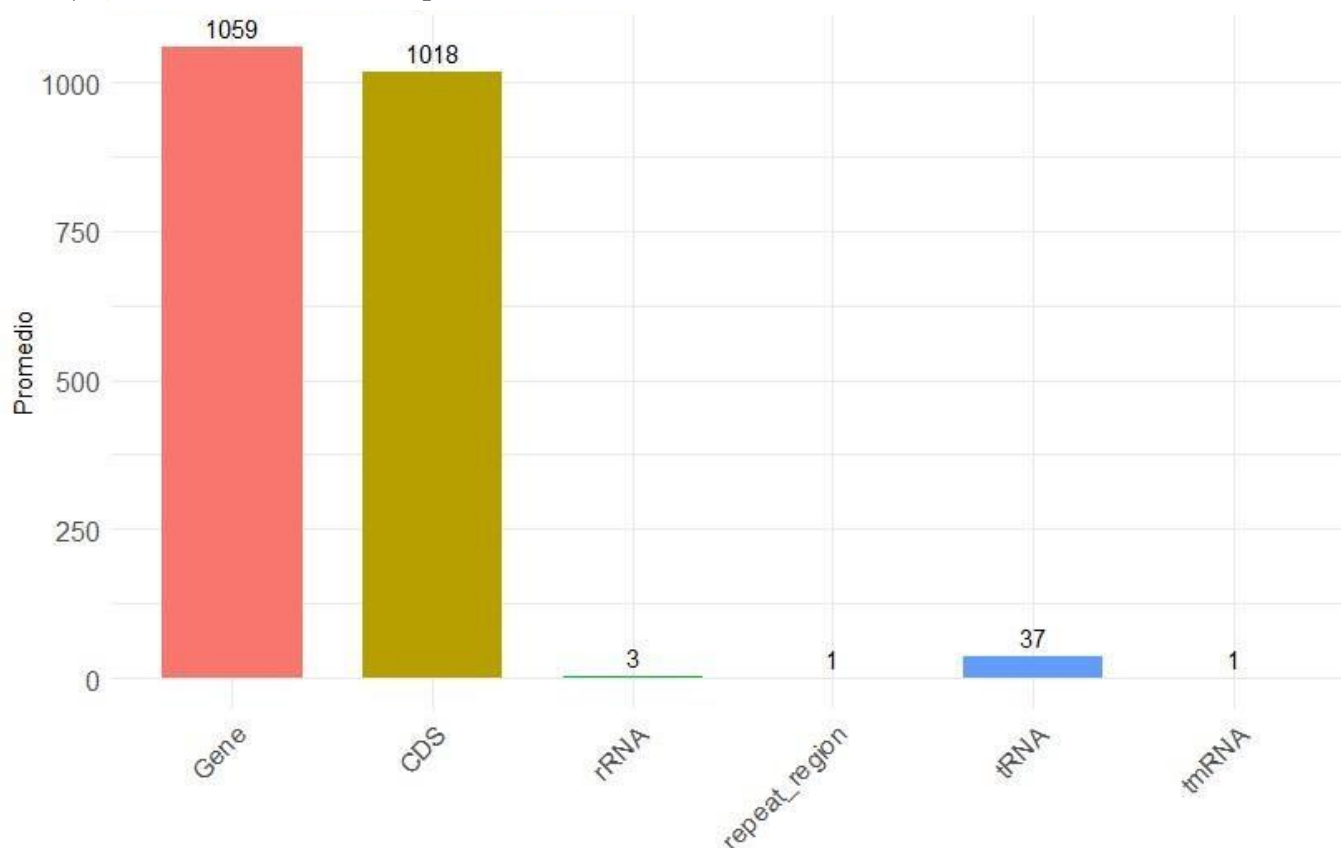
Caracterización genómica por grupo de célula infectada

Una vez determinada la calidad de los genomas, se descartaron aquellos que presentaban altos niveles de fragmentación y contaminación. Posteriormente, los genomas restantes se clasificaron en grupos de acuerdo con el tipo de célula que infectan: eritrocitos, plaquetas, leucocitos e indefinido. Finalmente, se realizó la caracterización genómica mediante el programa Prokka.

Grupo de los eritrocitos: El grupo de los eritrocitos se conforma de *A. centrale*, *A. marginale*, *A. ovis* y *A. capra*.

En la caracterización genómica de *A. centrale* se identificaron un total de genes de 1,059 de los cuales 1,018 pertenecen a CDS (secuencias codificantes), 3 rRNA (RNAs ribosomales), 1 región repetida, 37 tRNA (RNAs de transferencia), y 1 tmRNA (RNA mensajero de transferencia) (**Figura 4A**). En el mapa circular se identificaron el total de genes, nombre, función y localización en el genoma. El anillo interno representa el contenido de GC (%) a lo largo del genoma, permitiendo visualizar variaciones regionales en la composición nucleotídica (**Figura 4B**).

A) Caracterización de *Anaplasma centrale*



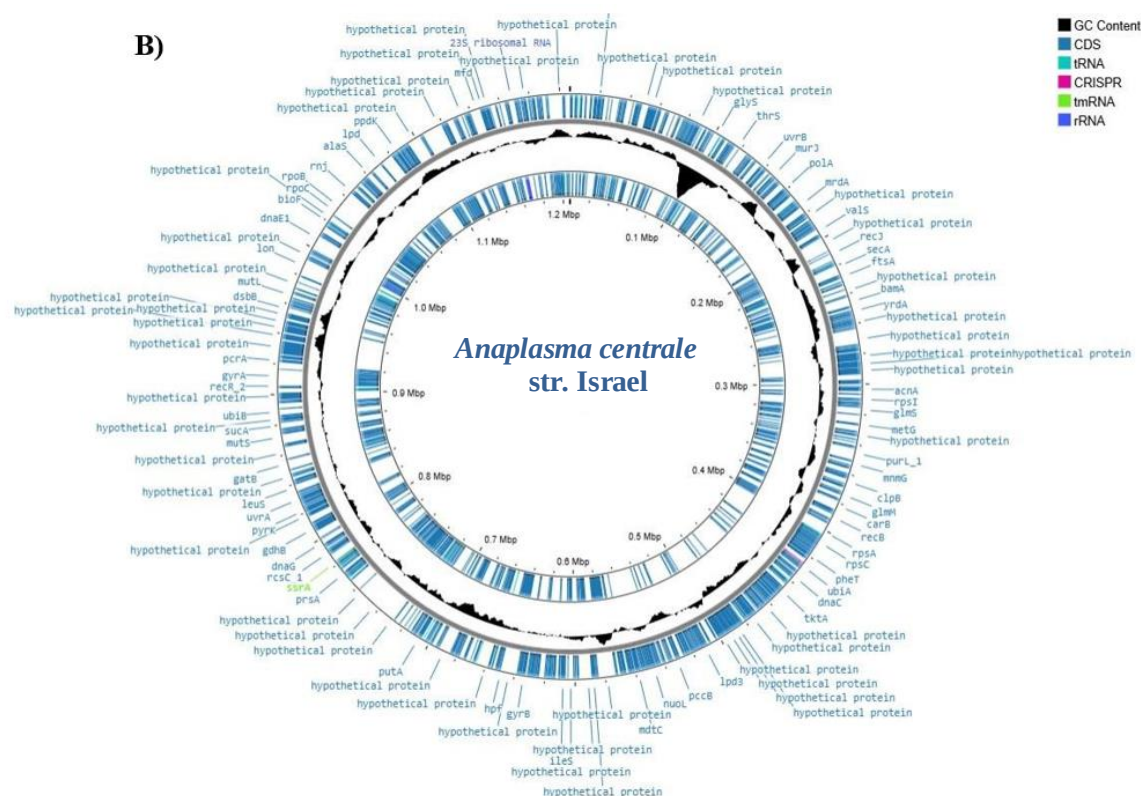


Figura 4(A-B). Caracterización genómica del grupo de los eritrocitos, *A. centrale*, obtenidos del programa Prokka

En el caso de *A. marginale*, considerando un total de 21 genomas completos disponibles, se realizó el promedio de su caracterización genómica. Se identificaron en promedio 1,056.19 genes, de los cuales 1,015.38 corresponden a secuencias codificantes (CDS), 3 rRNA, 36.81 tRNA, 1 tmRNA y 0.14 regiones repetidas (**Figura 5A**). Estos resultados evidencian una alta proporción de regiones codificantes y una baja presencia de secuencias repetitivas, característica común en genomas bacterianos intracelulares obligados.

El mapa genómico circular representativo de *A. marginale* cepa Florida (**Figura 5B**) muestra la organización estructural del cromosoma, incluyendo la distribución de CDS en ambas hebras (sentido directo e inverso), así como la localización de rRNA y tRNA. El anillo interno representa el contenido de GC (%) a lo largo del genoma, permitiendo visualizar variaciones regionales en la composición nucleotídica. Se observa una distribución homogénea de genes codificantes a lo largo del cromosoma, con predominio de proteínas hipotéticas, además de genes asociados a funciones metabólicas básicas y procesos de mantenimiento celular.

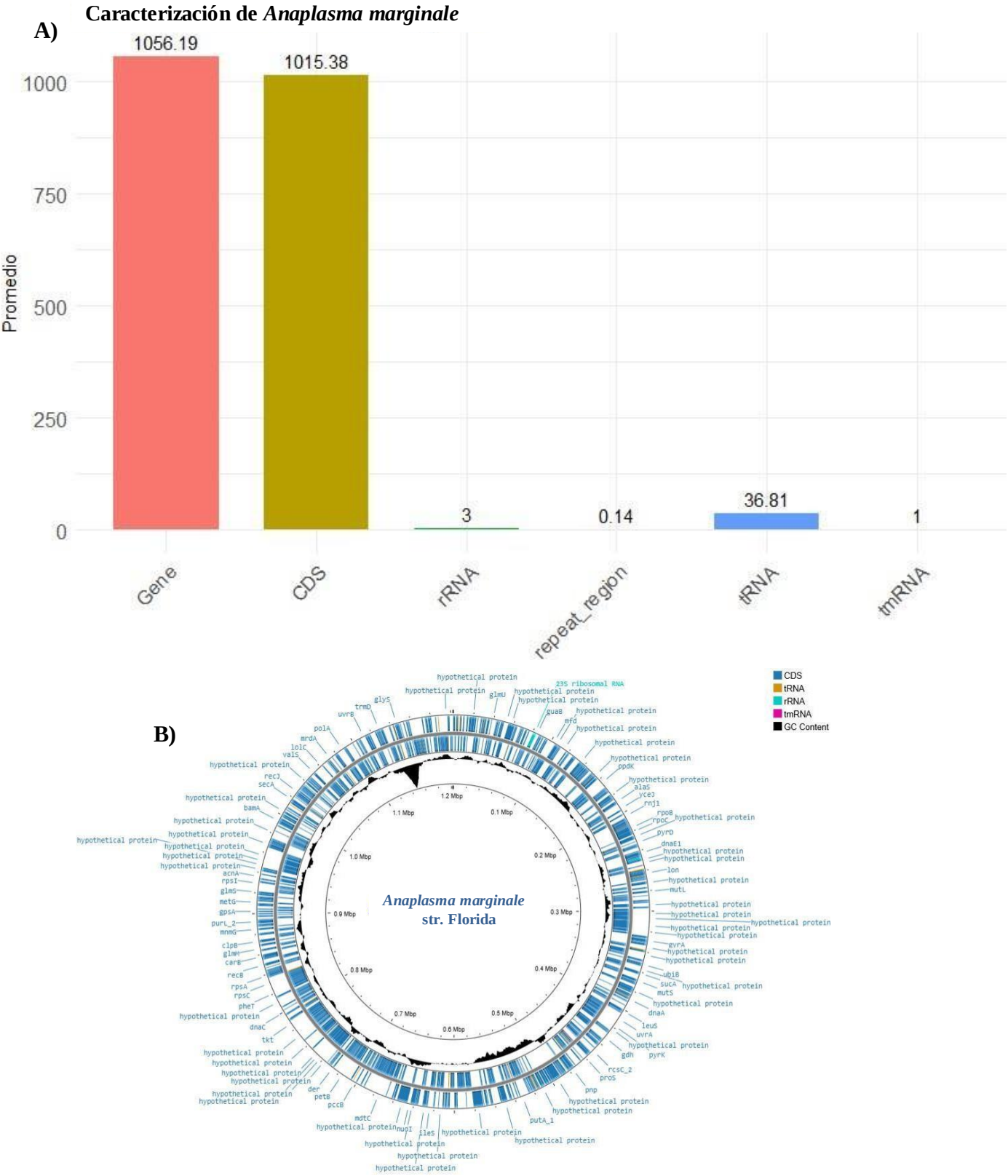


Figura 5(A-B). Caracterización genómica del grupo de los eritrocitos, *A. marginale*, obtenidos del programa Prokka

A. ovis: La caracterización genómica identificó un total de 966 genes, de los cuales 925 correspondieron a CDS (secuencias codificantes), 3 a rRNA (RNA ribosomales), 35 a tRNA (ARNA de transferencia) y 1 tmRNA. No se detectaron regiones repetidas.

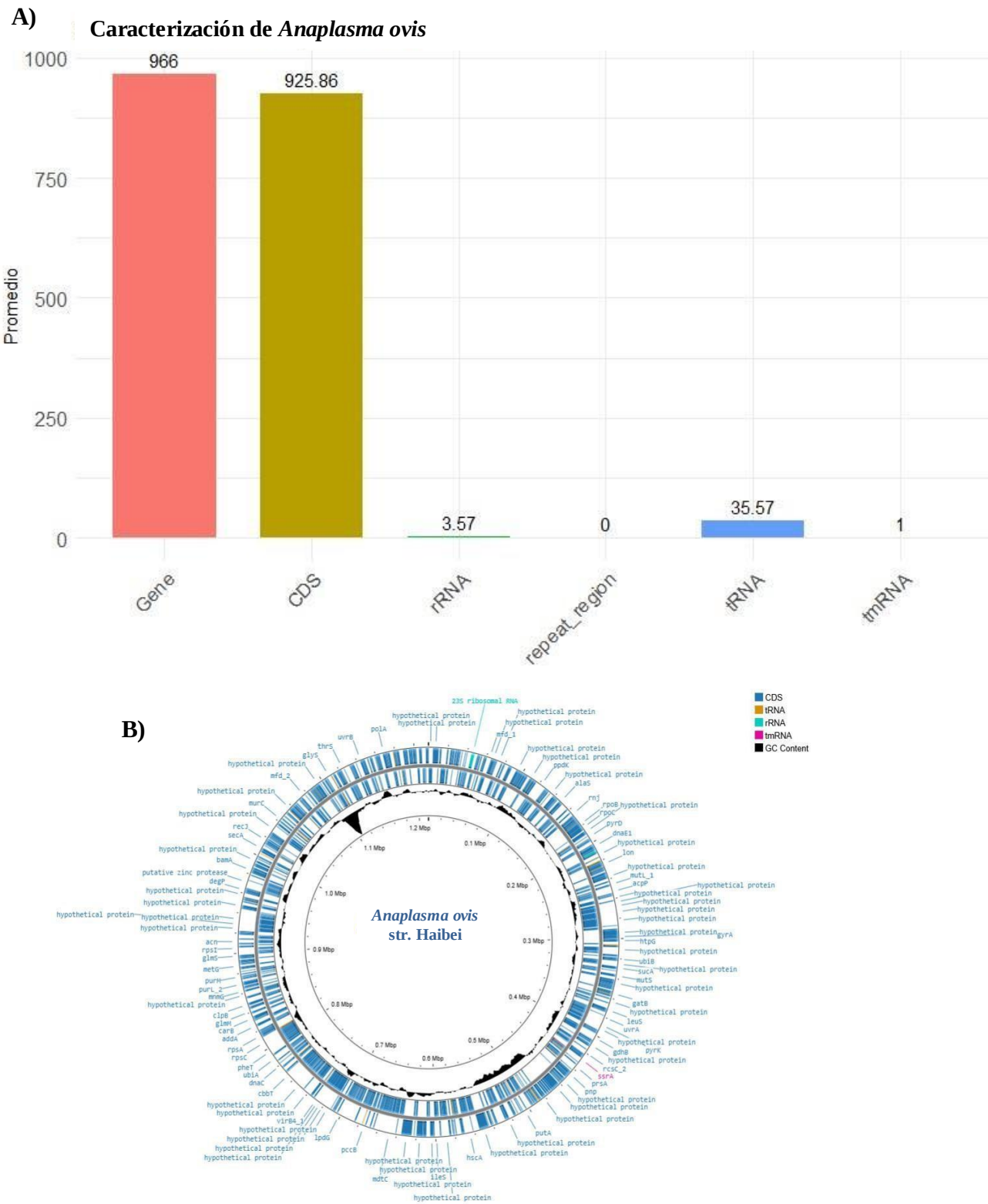


Figura 6(A-B). Caracterización genómica del grupo de los eritrocitos, obtenidos del programa Prokka

Anaplasma capra: Su caracterización genómica identificó un total de 930 genes, de los cuales 890 correspondieron a CDS (secuencias codificantes), 3 a genes de rRNA (ARN ribosomales) y 37 a genes de tRNA (ARN de transferencia). No se detectaron regiones repetidas ni genes de tmRNA.

A) Caracterización de *Anaplasma capra*

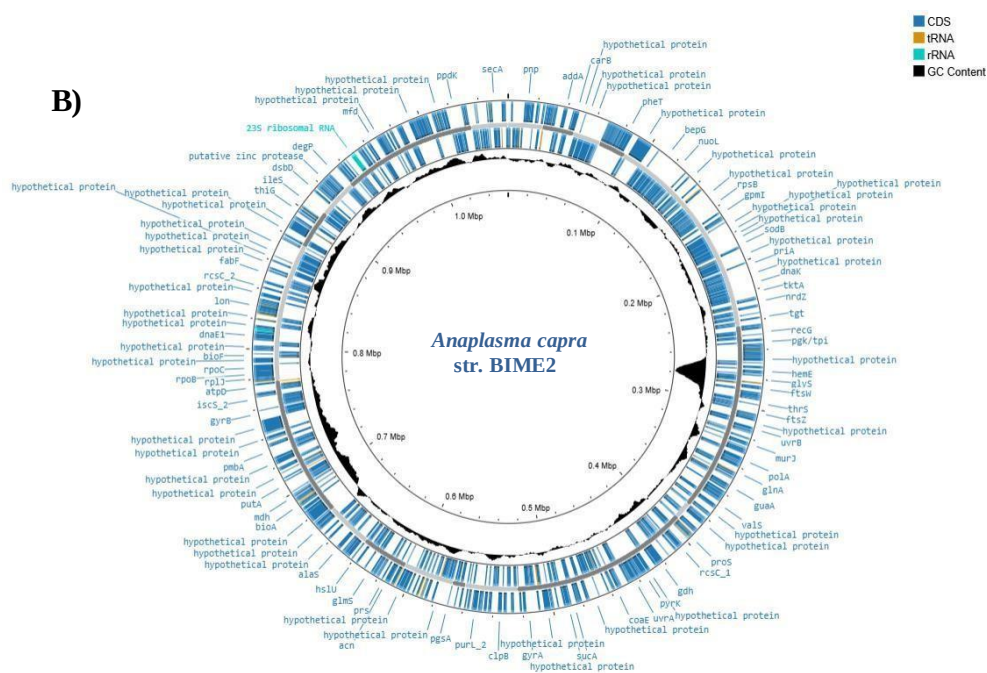
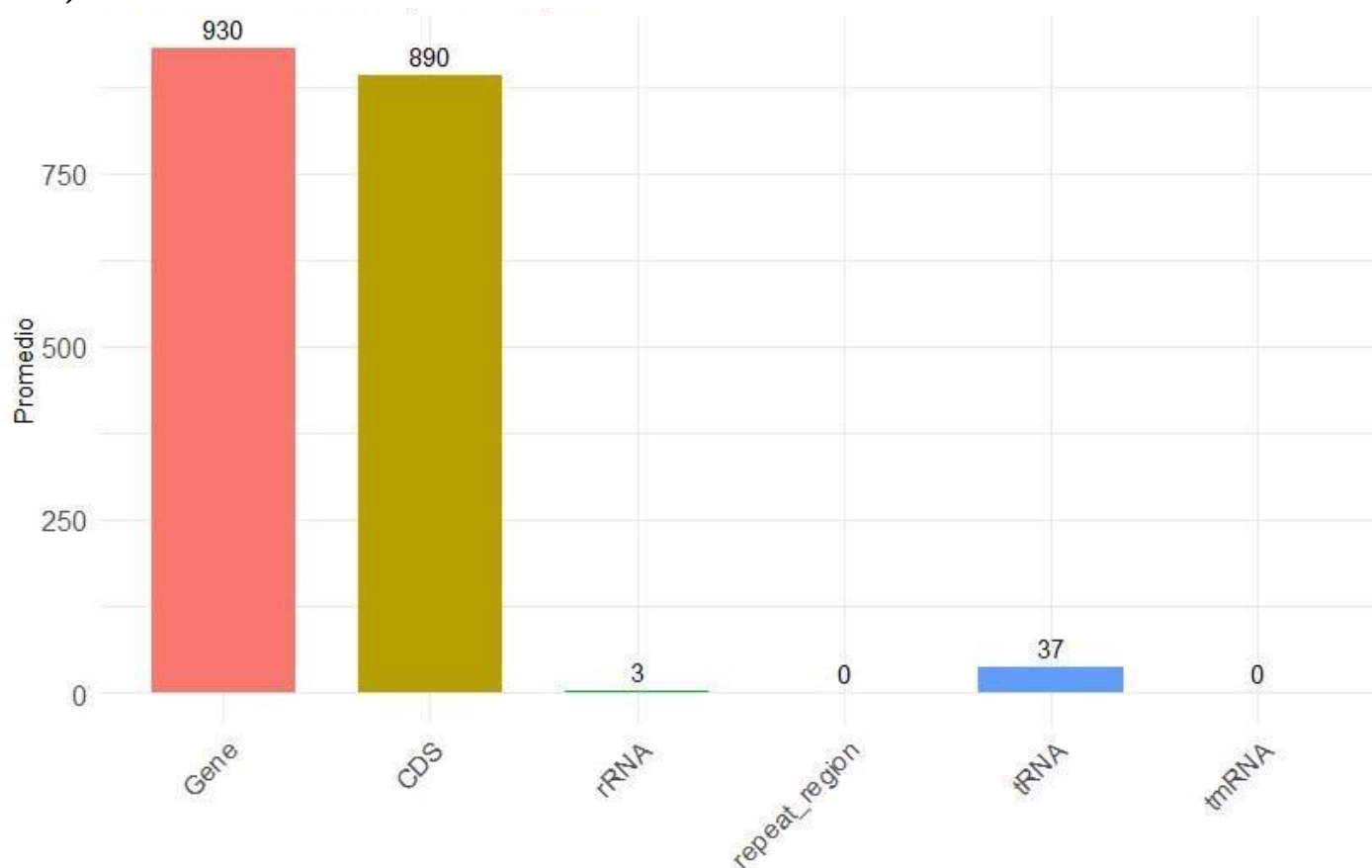


Figura 7(A-B). Caracterización genómica del grupo de los eritrocitos, obtenidos del programa Prokka

Grupo de las plaquetas: Está conformado por *Anaplasma platys*.

A. platys: Su caracterización genómica se identificó en total genes fué de 1,054 de los cuales 1,016 pertenecen a CDS (secuencias codificantes), 3 rRNA (RNAs ribosomales), se encontró 0 regiones repetidas 34 tRNA (RNAs de transferencia), y 1 tmRNA (RNA mensajero de transferencia).

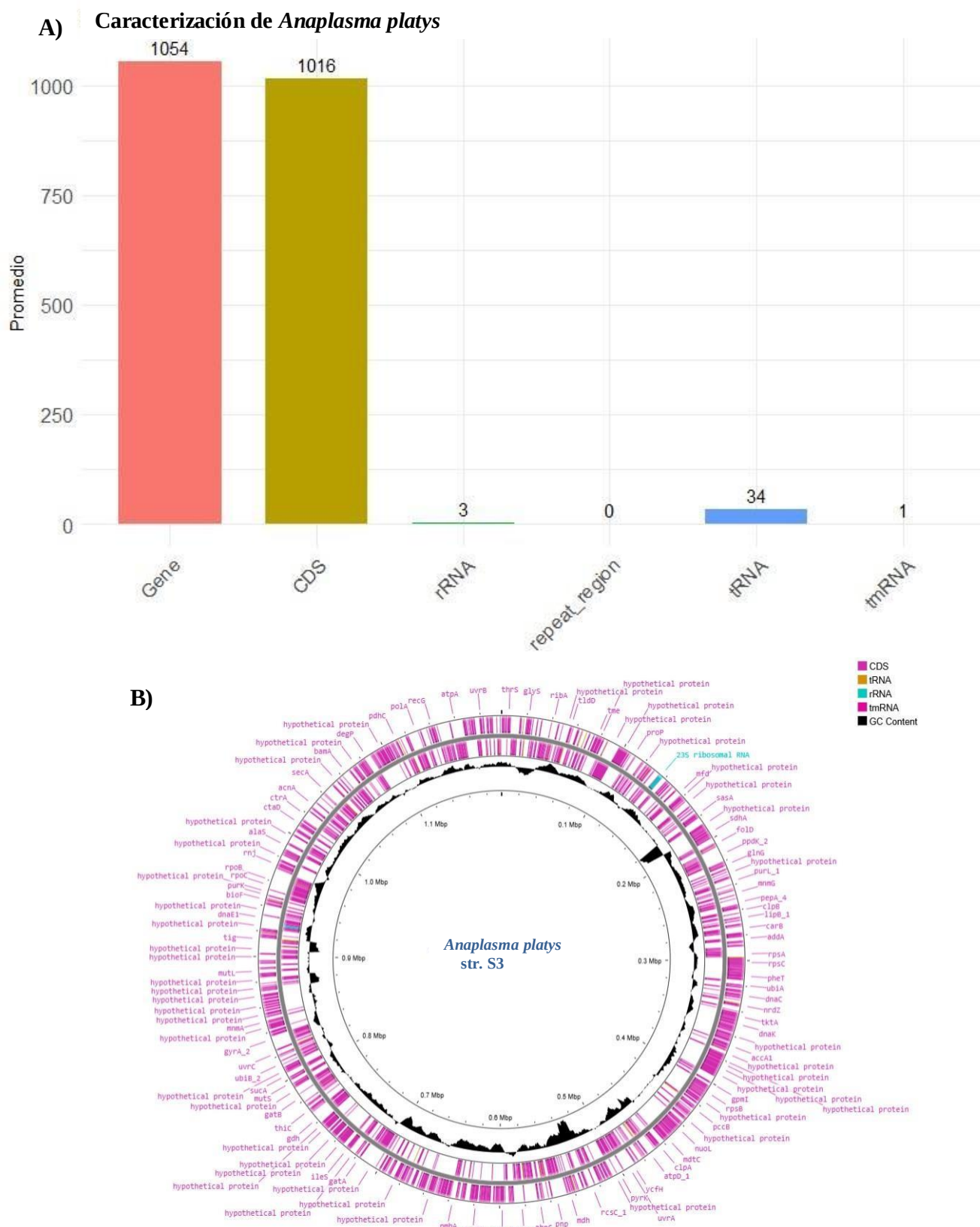
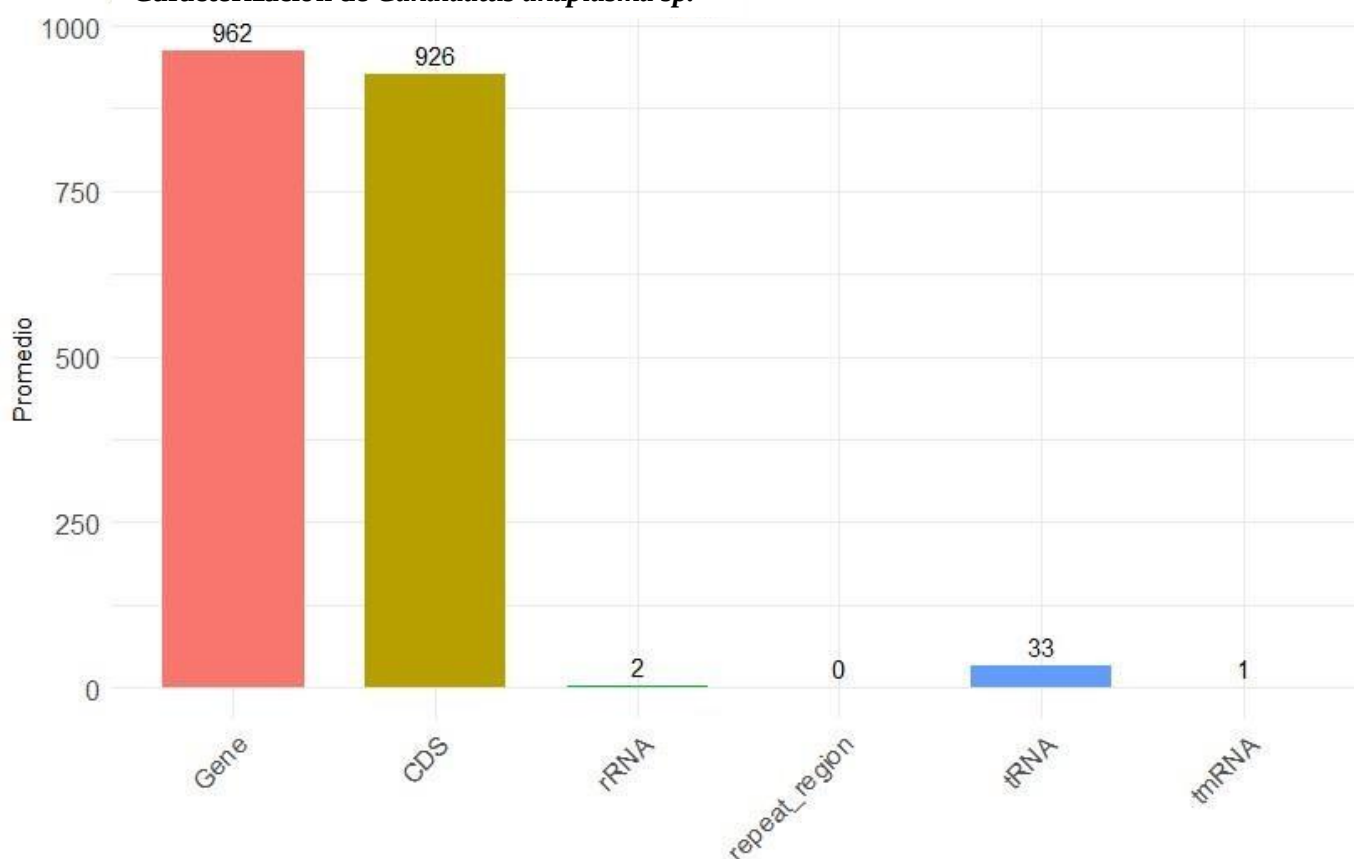


Figura 8(A-B). Caracterización genómica del grupo de las plaquetas, obtenidos del programa Prokka

Grupo indefinido: Del genoma *Candidatus anaplasma sp. TIGMIC* no se pudo obtener información acerca de la célula que infecta. No obstante, su caracterización genómica permitió identificar un total de 962 genes, de los cuales 926 correspondieron a CDS (Secuencias codificantes), 2 a genes de rRNA (RNA ribosomales), 33 a genes de tRNA (RNA de transferencia) y 1 a tmRNA. Asimismo, no se detectaron regiones repetidas.

A) Caracterización de *Candidatus anaplasma sp.*



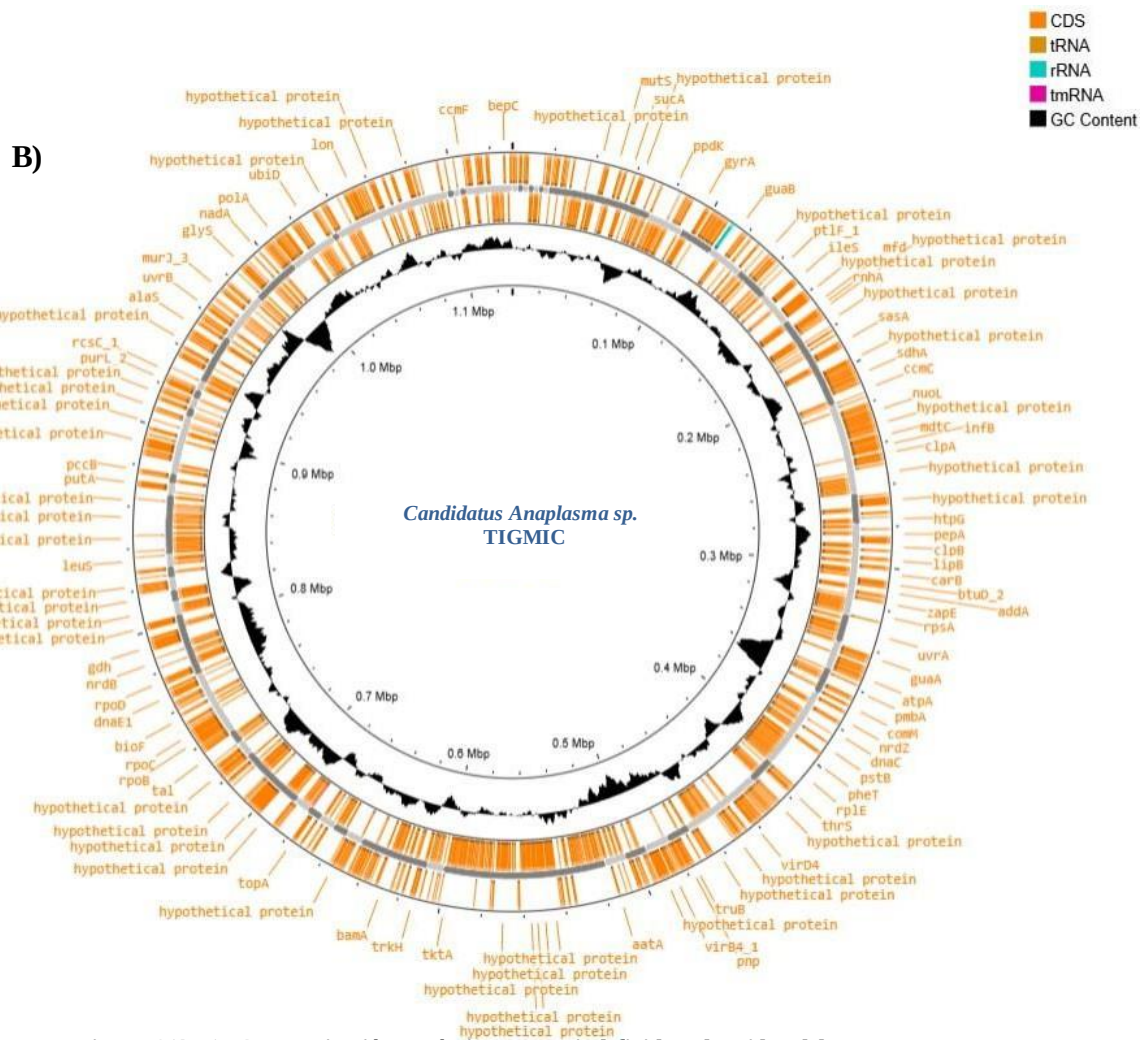


Figura 9(A-B). Caracterización genómica, grupo indefinido, obtenidos del programa

Grupo endosimbionte: El grupo endosimbionte está conformado por la especie *Aaplasma endosimbionte de Hyalomma asiaticum*. Su caracterización genómica permitió identificar un total de 944 genes, de los cuales 906 correspondieron a CDS (secuencias codificantes), 3 a genes de rRNA (ARN ribosomales), 34 a genes de tRNA (ARN de transferencia) y 1 a tmRNA. Asimismo, no se detectaron regiones repetidas.

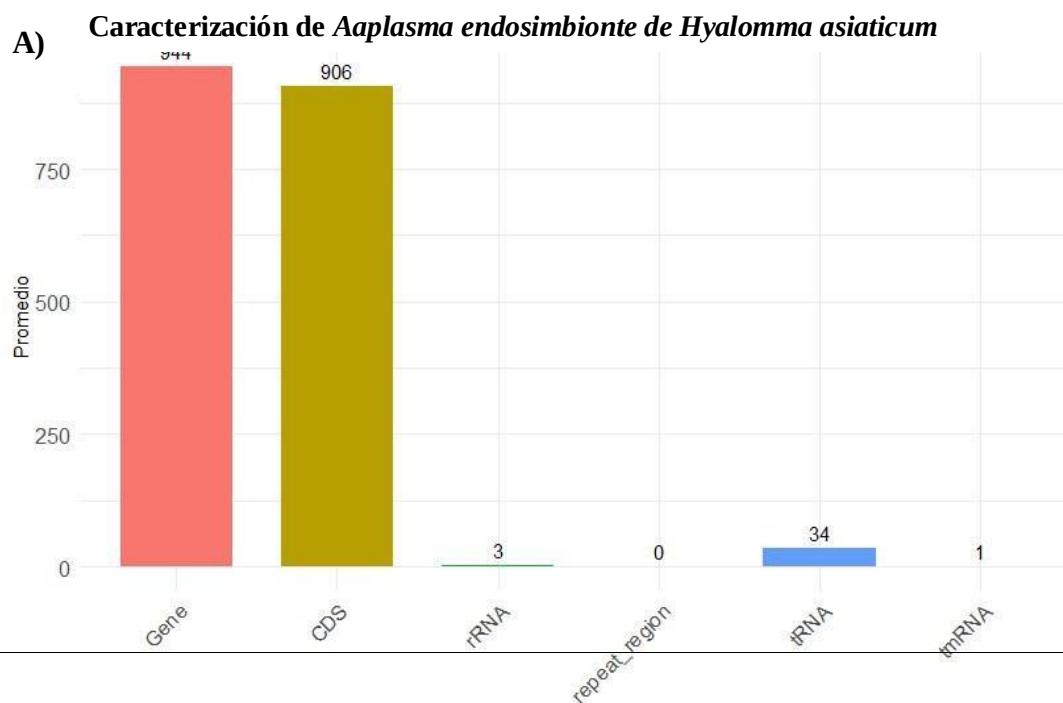




Figura 10(A-B). Caracterización genómica, grupo endosimbionte obtenidos del programa Prokka

Grupo de los leucocitos: El grupo de los eritrocitos se conforma de *A. bovis* y *A. phagocytophilum*.

A. bovis: Su caracterización genómica permitió identificar un total de 923 genes, de los cuales 886 correspondieron a CDS (secuencias codificantes), no se detectaron genes de rRNA (ARN ribosomales), 36 a genes de tRNA (ARN de transferencia) y 1 a tmRNA. Asimismo, no se detectaron regiones repetidas



Caracterización de *Anaplasma bovis*

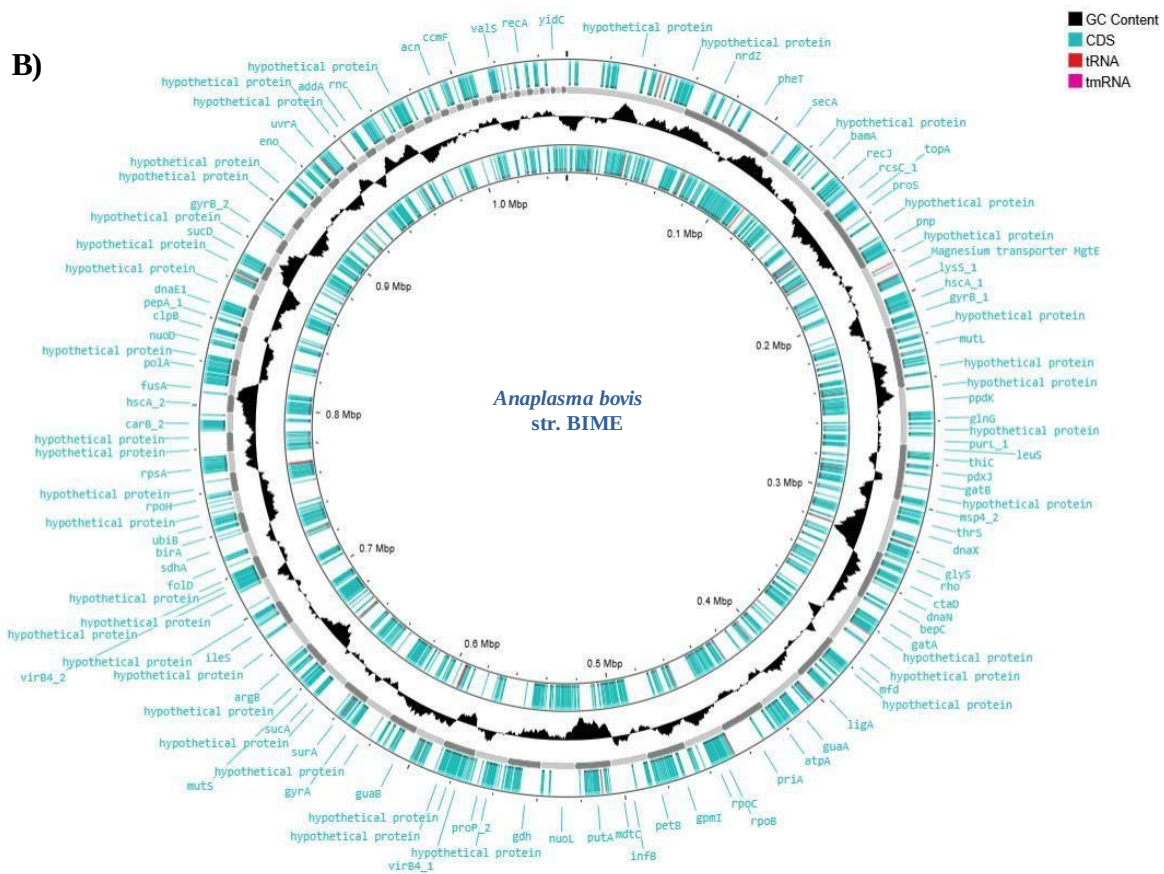
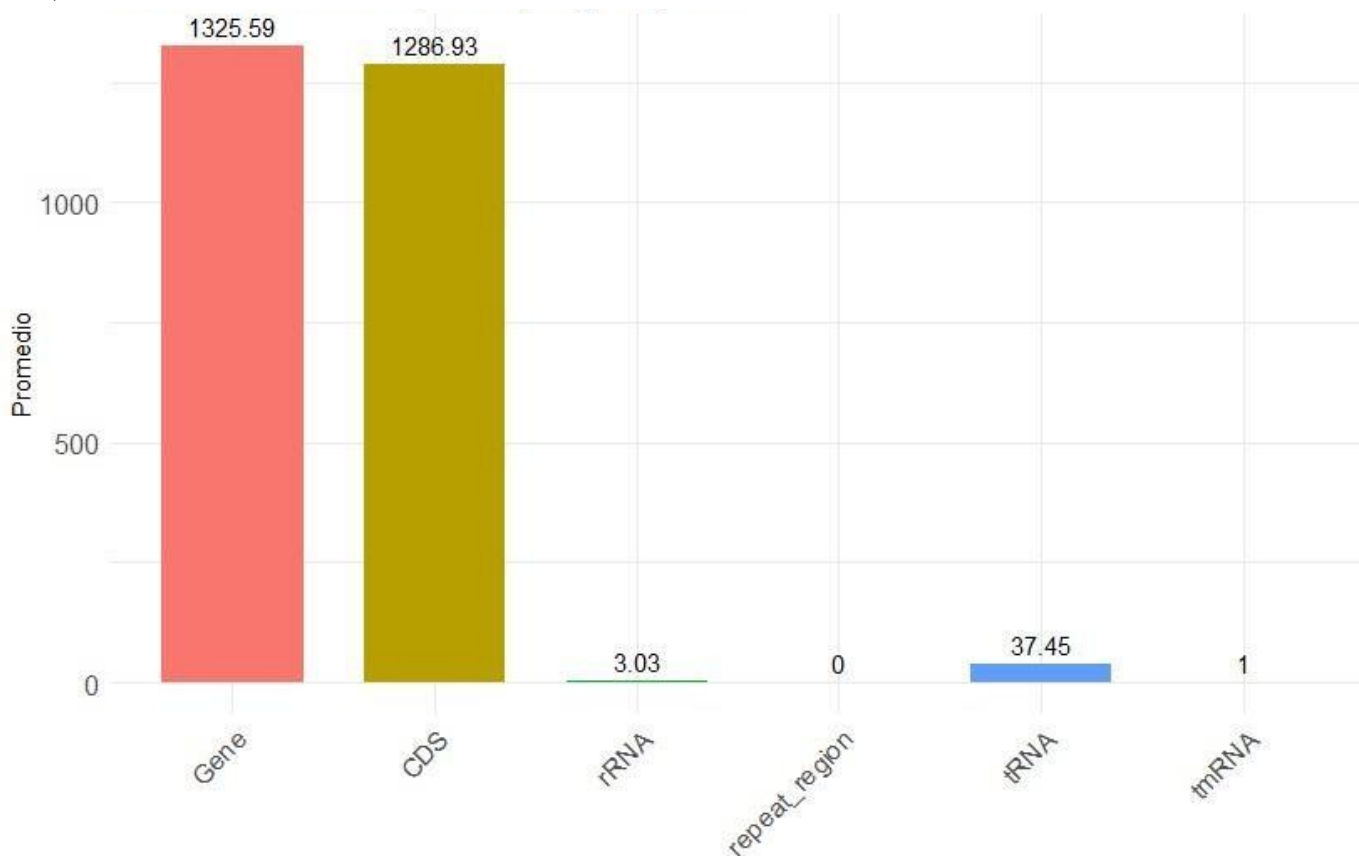


Figura 11(A-B). Caracterización genómica del grupo de los leucocitos, obtenidos del programa Prokka.

A. phagocytophilum: En el caso de *A. phagocytophilum* al ser 29 genomas se promedió su caracterización genómica, se identificaron en total 1,325.29 genes de los cuales 1286.93 pertenecen a CDS (secuencias codificantes), 3.03 rRNA (RNAs ribosomales), se encontraron 0 regiones repetidas, 37.45 tRNA (RNAs de transferencia), y 1 tmRNA (RNA mensajero de transferencia).

A) Caracterización de *Anaplasma phagocytophilum*



B)

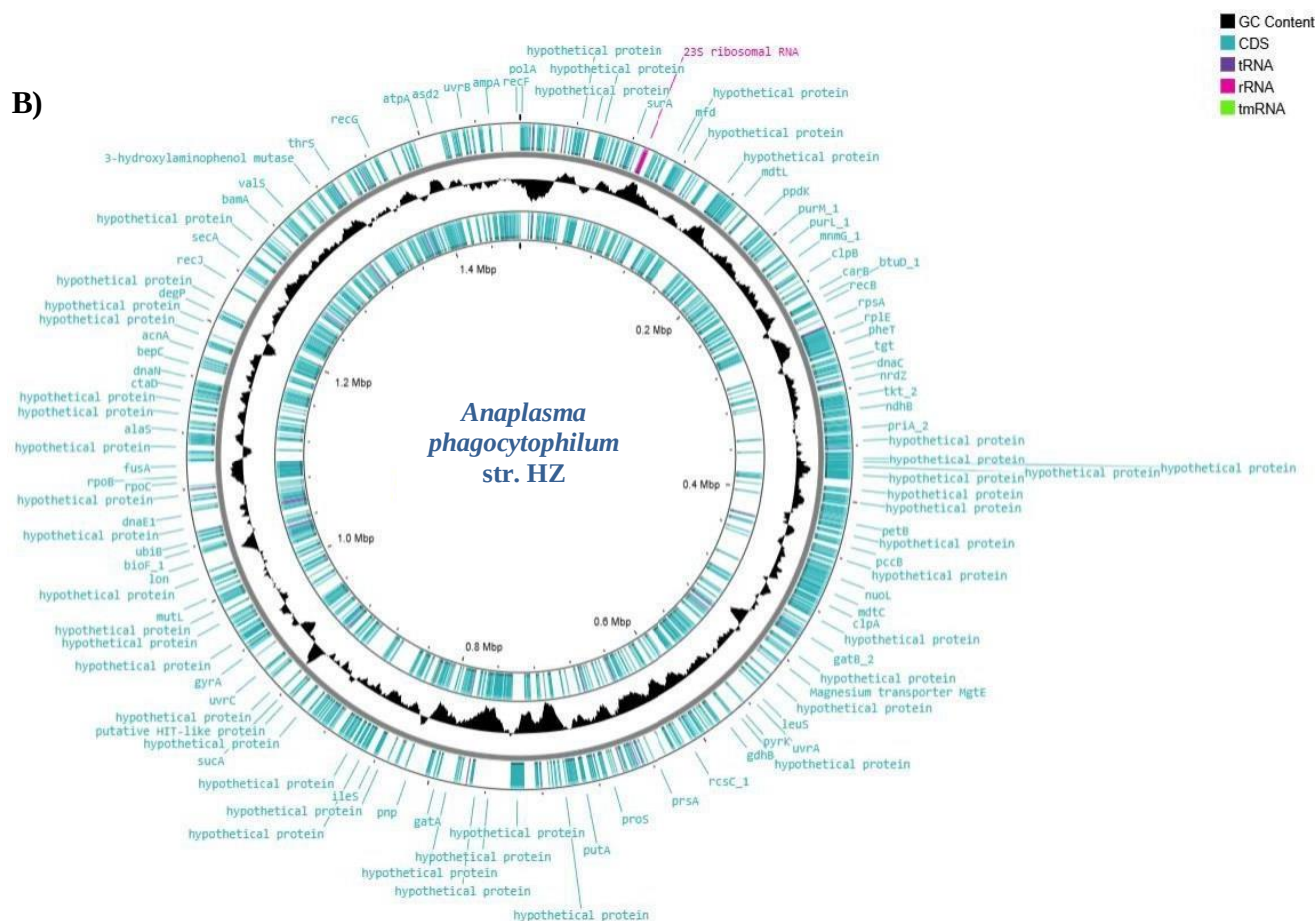


Figura 12(A-B). Caracterización genómica del grupo de los leucocitos, obtenidos del programa Prokka.

Hospederos

Parte de la caracterización del género de *Anaplasma* es determinar el hospedero al cual infecta. La imagen representa un esquema de diferentes especies del género *Anaplasma* y sus respectivos hospedadores, según datos obtenidos de la base de datos de NCBI 2025. Aquí se muestra cómo se relacionan las especies del género *Anaplasma* con los hospederos en los que se han reportado teniendo como principal fuente de muestra la sangre (**Figura 13**).

Grupo de eritrocitos:

A. centrale: ganado (sector pecuario) .

A. marginale: Ganado (sector pecuario), en específico la mayoría de las muestras su principal hospedero era la especie *Bos taurus*.

A. ovis: cabra (sector pecuario)

A. capra: cabra, en específico la especie *Capra Hircus*

Grupo de las plaquetas:

A. platys: *canis lupus familiaris* (perros domésticos).

Grupo indefinido:

candidatus Anaplasma sp. TIGMIC: cabra, en específico la especie *Capra Hircus*

Grupo de los leucocitos:

A. bovis: cabra

A. phagocytophilum: caballos (*equus caballus*), *homo sapiens* (humanos), garrapata (*ixodes scapularis*), ovejas, roedores (*zapus hudsonius*) animales salvajes como Marmota himalayana y venado rojo.

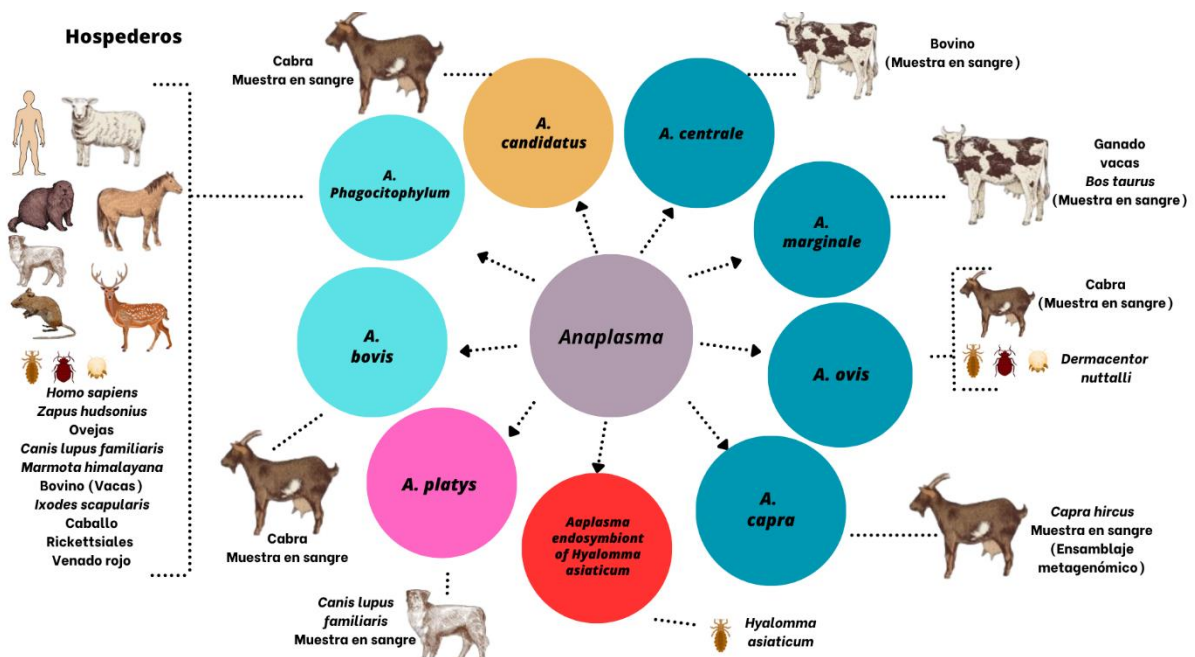


Figura 13. Hospederos reportados que han sido infectados por el género *Anaplasma* obtenidos de Biosample en la base de datos de NCBI 2026.

Distribución geográfica del género *Anaplasma* a nivel Mundial

De los 64 genomas que conformaban la base de datos creada, fue posible obtener su distribución geográfica a nivel mundial. En el mapa se muestra la distribución geográfica de las diferentes especies del género *Anaplasma* reportadas en la base de datos de NCBI, 2026, incluyendo el nuevo ensamblaje a nivel contig de *A. bovis* reportado en febrero 2024 en China y el candidato como especie, *Candidatus Anaplasma sp TIGMIC* (Figura 14).

En particular en el continente americano la distribución se organizó en tres regiones, América del norte, América central y América del sur.

América del norte: En Estados Unidos se encuentran reportados los genomas de las especies *Anaplasma phagocytophilum* y *Anaplasma marginale*, en México se encuentra *Anaplasma marginale*.

América central: En Saint Kitts and Nevis se tiene reportada la especie *Anaplasma platys*.

América del sur: En Brasil se localizan los genomas de la especie *Anaplasma marginale*.

Europa: Lugares donde se tienen reportes de genomas de *Anaplasma phagocytophilum* son en Netherlands, Austria, Francia, Alemania,

Asía: En Israel se encuentra *Anaplasma centrale*, en China están *Anaplasma ovis*, *Candidatus anaplasma sp*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma capra*, y *Aaplasma endosimbionte de Hyalomma asiaticum* y en Corea del Sur *Anaplasma phagocytophyllum*.

Oceanía: En Australia se tiene reportado el genoma de *Anaplasma marginale*.



Distribución geográfica del género *Anaplasma* reportados en la base de datos de NCBI 2026.

Figura 14. Distribución geográfica mundial de especies del género *Anaplasma* reportadas en la base de datos NCBI (2025). Cada marcador indica la ubicación de aislamientos registrados y está codificado por color según la especie correspondiente (*A. centrale*, *A. marginale*, *A. ovis*, *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *A. capra*, *A. bovis*, *Candidatus Anaplasma sp.* y endosimbionte de *Hyalomma asiaticum*). El mapa permite visualizar la dispersión global y los principales focos de reporte para cada especie.

Análisis Pangenómicos

Roary Pangenome Categories, Género *Anaplasma*

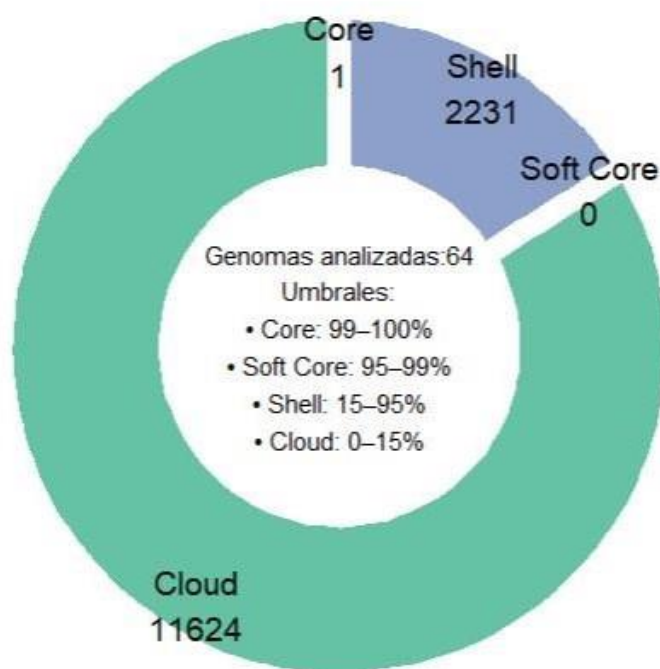


Figura 15. Pangenoma del Género *Anaplasma*, teniendo un core de 1 CDS, soft core 0 CDS, Shell 2231 CDS, cloud 11624 CDS. Obtenidos con el programa Roary.

Con el programa Roary, se ejecutó el análisis pangenómico de los 64 genomas, teniendo una distribución pangenómica core de 1 secuencia codificante (que contiene 99 % < 100 % del CDS total), de soft Core tuvo 0 secuencias codificantes (que contiene 95 % < 99 % del CDS total), de shell 2,231 secuencias codificantes (que contiene de 15 % < 95 % del CDS total), y de cloud 11624 secuencias codificantes (que contiene 0 % < 15 %)(Figura 15).

Con el programa phandango se hizo el análisis de presencia y ausencia de los genes conservados del género *Anaplasma*, la especie a la que pertenecía, hospedero y ubicación geográfica. En el pangenoma, daba como genoma core de 1, con el programa phadango fué posible localizar ese gen que se comparte con todas las especies del género *Anaplasma*, el cual fue identificado como una enzima ATP sintetasa (Figura 16).

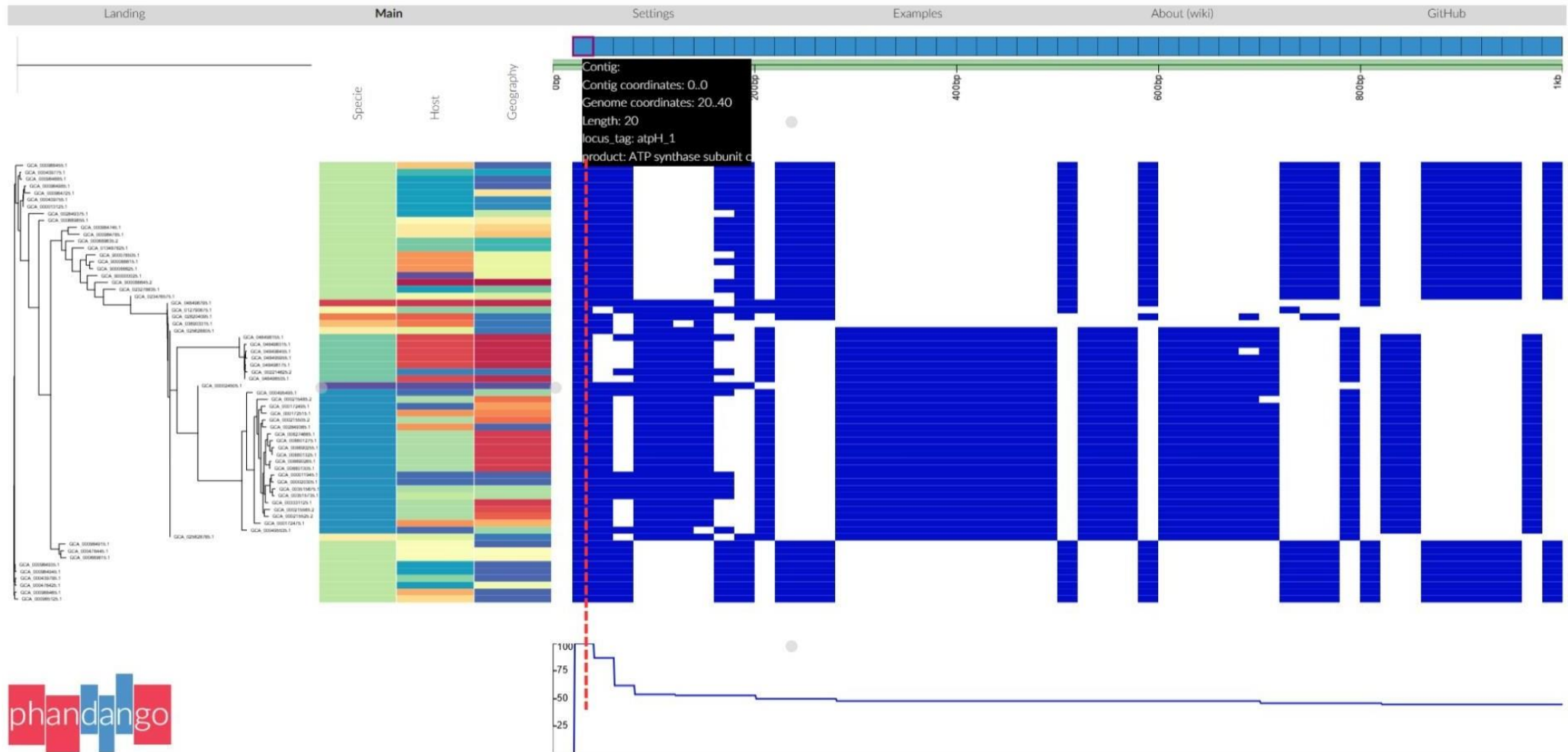


Figura 16. Representación del pangenoma basado en matriz de presencia (azul) y ausencia (blanco) de genes entre los genomas analizados. La zona conservada permite identificar el core genome, mientras que la línea roja indica el gen compartido a nivel de género, propuesto como posible marcador molecular para la detección de *Anaplasma*.

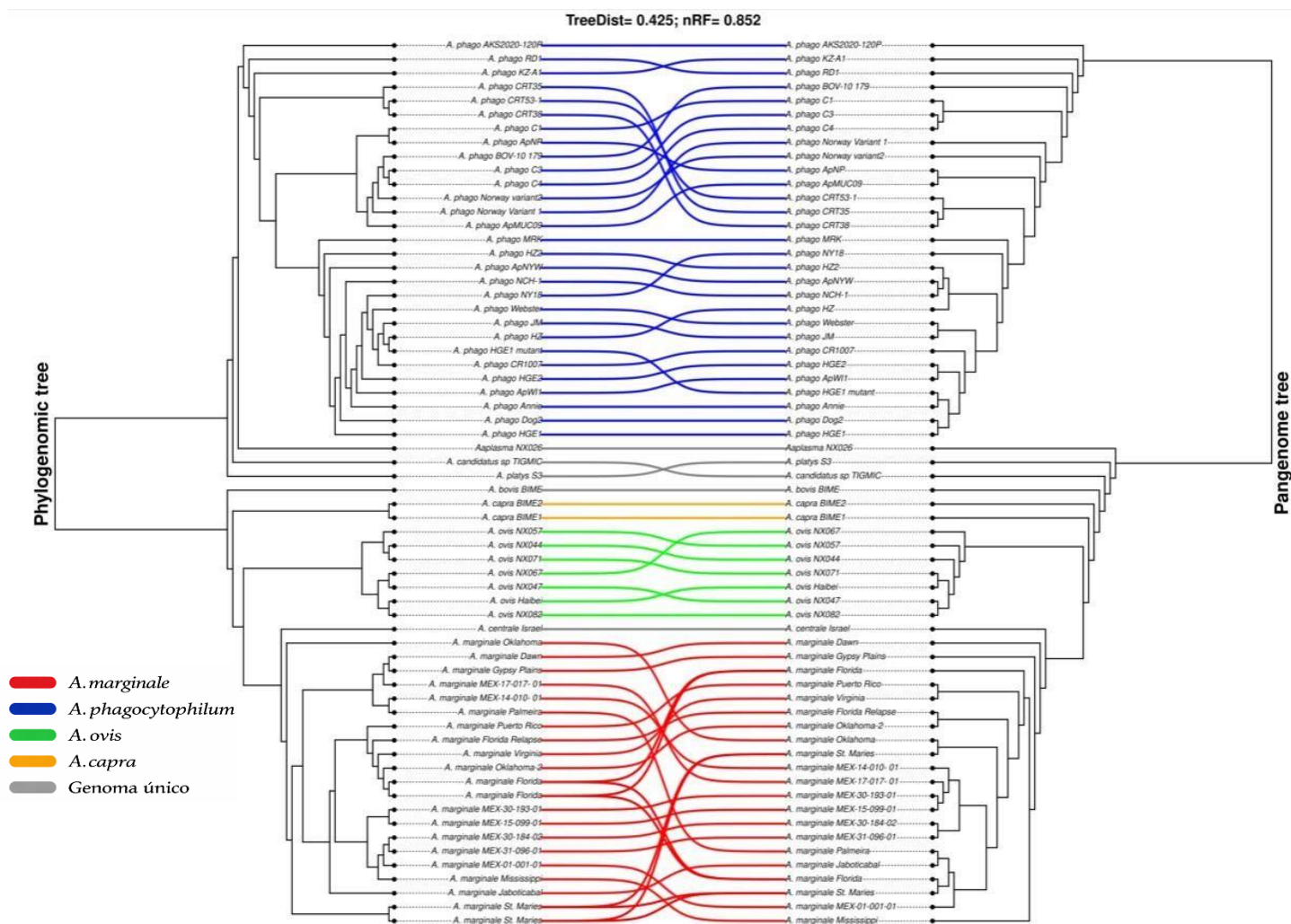


Figura 17. Gráfico comparativo entre árbol filogenómico (análisis evolutivo) y pangenómico (presencia/ausencia)

Al obtener un genoma core en el programa Roary, se realizó un segundo análisis pangenómico con el programa get homologues, se obtuvo un core de 93, permitiendo hacer una comparación del cladograma de presencia/ausencia y la filogenómica. A la derecha se puede observar un árbol pangenómico basado en la presencia y ausencia de genes (accesorios y core) mostrando la diversidad funcional de las proteínas que varían entre cepas permitiendo identificar los genes core para el diseño de marcadores moleculares, en la izquierda se observa un árbol filogenómico (análisis evolutivo) construido sobre alineamientos de genes núcleo (core), en donde nos indica una relación evolutiva. En ambos árboles se pueden observar cómo se definen los clados de cada especie del género *Anaplasma*, en el centro se puede ver los reordenamientos que ocurren al compararse ambos árboles (Figura 17).

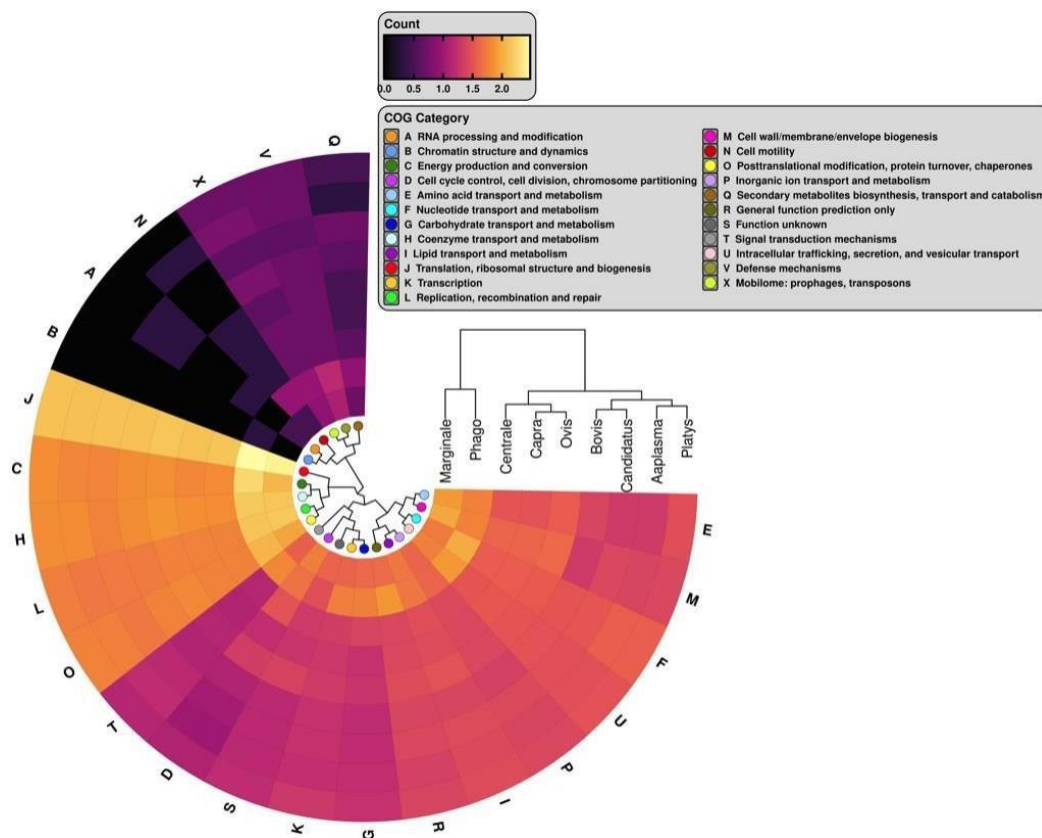


Figura 18. Gráfico COG (Clusters of Orthologous Groups) del Género *Anaplasma*

Una vez agrupados los genes en clusters ortólogos se anotan con categorías COG (Clusters of Orthologous Groups) que son representadas en este gráfico, el color en cada celda desde negro hasta amarillo indica el número de genes asignados a esa categoría en ese genoma y cada letra representa a la categoría que corresponde, también observamos las especies del género *Anaplasma* según la similitud de su perfil COG. En el árbol se observa que se separan en tres ramificaciones, la primera con las especies *A. marginale* y *A. phagocitophyllum* en donde se identifican patrones similares de funciones codificantes, después siguen *A. centrale*, *A. capra* y *A. ovis* y por último *A. aplasma* y *A. platys*.

Generalmente se puede observar que las categorías en donde abundan más presencia de genes a lo largo del todo Género *Anaplasma* son: el J, C, H, L, O. El J corresponde a funciones como traducción, estructura ribosomal y la biogénesis, la C a la producción y conversión de energía, la H al transporte de coenzimas y metabolismo, la L funciones relacionadas con la replicación, reparación y recombinación y la O a modificaciones postraduccionales, chaperonas y la renovación de proteínas (**Figura 18**).

Pangenoma del grupo eritrocitos, primer grupo (*A.centrale*, *A. capra*, *A.ovis*, *A. marginale*)

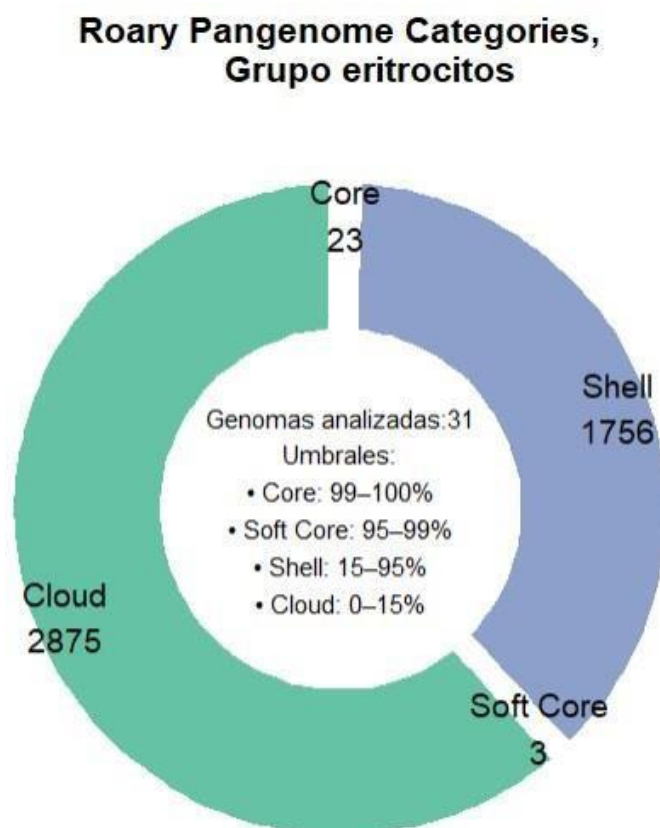


Figura 19. Pangenoma del grupo de los eritrocitos, teniendo un core de 23 CDS, soft core 3 CDS, Shell 1,756 CDS, cloud 2,875 CDS. Obtenidos con el programa Roary.

Con el fin de analizar la variabilidad genómica entre las especies del grupo de los eritrocitos (*A. centrale*, *A. capra*, *A. ovis* y *A. marginale*), se realizó un análisis pangenómico. Los resultados mostraron un total de 23 secuencias codificantes en el genoma core (que representan entre el 99 % y <100 % del total de CDS), 3 secuencias en el soft core (95 % a <99 %), 1,756 secuencias en la categoría shell (15 % a <95 %) y 2,875 en la categoría cloud (0 % a <15 %) (**Figura 19**).

Pangenoma del grupo leucocitos (*A. phagocytophilum* y *A. bovis*)

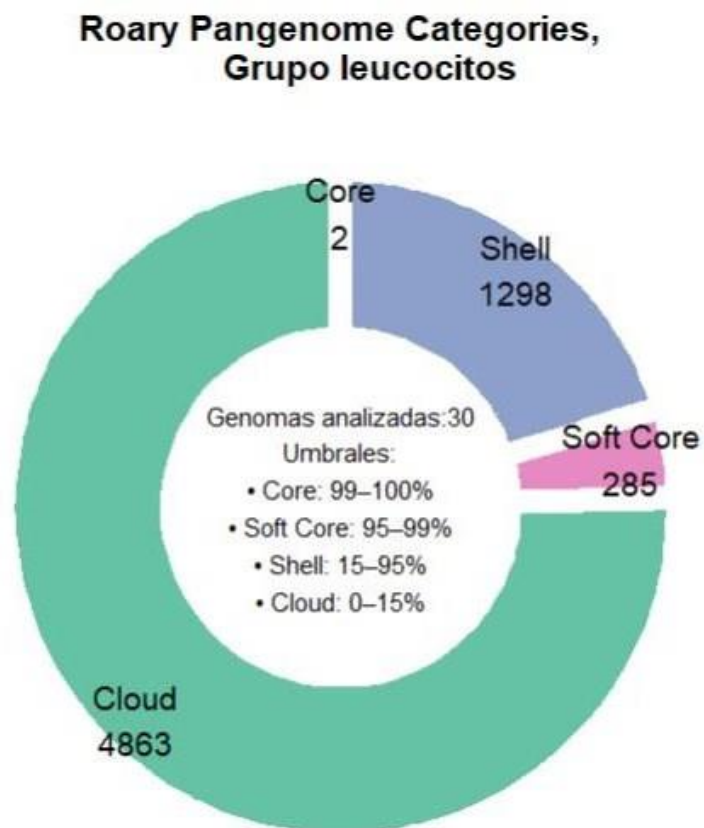


Figura 20. Pangenoma del grupo de leucocitos, teniendo un core de 2 CDS, soft core 285 CDS, Shell 1,298 CDS, cloud 4,863 CDS. Obtenidos con el programa Roary.

Para el grupo 2, se realizó un análisis pangenómico. Los resultados mostraron 1 secuencia codificante en el genoma core (que representa entre el 99 % y <100 % del total de CDS), 4 secuencias en el soft core (95 % a <99 %), 1,590 secuencias en la categoría shell (15 % a <95 %) y 7,680 en la categoría cloud (0 % a <15 %) (Figura 21).

Pangenoma grupo leucocitos, plaquetas, indefinido, endosimbionte (*A. bovis*, *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *Candidatus Anaplasma*, *A. endosimbionte*)

**Roary Pangenome Categories,
segundo grupo**

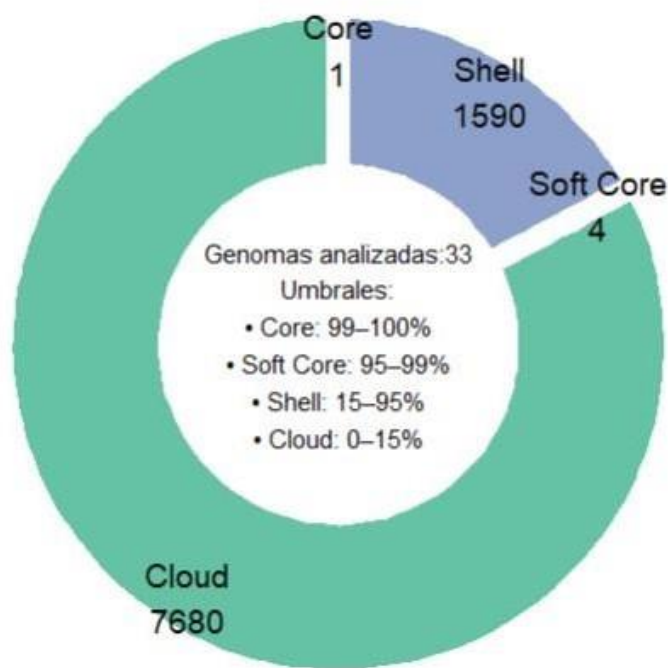


Figura 21. Pangenoma del grupo 2, teniendo un core de 2 CDS, soft core 285 CDS, Shell 1,298 CDS, cloud 4,863 CDS. Obtenidos con el programa Roary.

En el grupo 3 se realizó un análisis pangenómico. Los resultados mostraron 1 secuencia codificante en el genoma core (que representa entre el 99 % y <100 % del total de CDS), 4 secuencias en el soft core (95 % a <99 %), 1,590 secuencias en la categoría shell (15 % a <95 %) y 7,680 en la categoría cloud (0 % a <15 %) (**Figura 21**)

Genómica comparativa

Para la validación taxonómica del género, se usó el programa identidad promedio de nucleótidos (ANI) basado en ANI MUMer (ANIm) y ANIBlast (ANIB). Estas alineaciones son evaluadas para determinar la cobertura general y el porcentaje de identidad. El porcentaje de identidad de estas alineaciones se declara el ANI general del genoma al conjunto de tipos. Los valores de cobertura se utilizan para garantizar requisitos mínimos de cobertura para coincidencias competentes (Ciufo S, Kannan S, Sharma S; *et al.*, 2018). En el siguiente mapa de calor, en el eje de las “x” y “y” se presenta las diferentes especies del género *Anaplasma* respetando el mismo orden, su valor de ANIm corresponde entre el 0% y 100% de similitud.

La similitud entre los genomas se evaluó en un rango de 0 % a 100 %, donde el 100 % indica secuencias de nucleótidos idénticas. Los colores más intensos representan mayor similitud (valores altos de ANIm), mientras que los más claros indican menor similitud. Al compararse entre sí, los genomas presentaron valores de ANIm de 1 (100 %). Para el análisis, se estableció un umbral de cobertura del 50 % y un valor de ANI ≥ 95 % para la delimitación de especie.

De los genomas analizados de *A. phagocytophilum*, la mayoría presentó coberturas entre el 80 % y el 100 %, y valores de identidad superiores al 95 %. Únicamente el genoma GCA_023476575.1 mostró un valor de ANI del 91 %.

A. marginale tiene una cobertura entre el 90% y el 100 % y los 20 genomas analizados todos tuvieron un porcentaje de identidad mayor del 95%. *A. capra* sólo eran dos genomas por lo que su porcentaje de cobertura era entre el 98% y el 100% y su porcentaje de identidad era del 99%. En *Candidatus Anaplasma sp. TIGMIC* se observó que su valor más alto de ANI era con la especie *A. marginale* con un valor casi del 89% de identidad. En este análisis se propone que un genoma pudiera estar mal clasificado, se identificó que *A. ovis* a nivel scaffold GCA_002849345.1 era 99 % idéntico a un *A. marginale* y al compararlo con otro *A. ovis* a nivel de ensamblaje completo dió un valor de 87% idéntico, por lo que fue descartado para este análisis, tiempo después se observó que este genoma se encuentra eliminado de la base de datos de NCBI,2025:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_002849345.1/

Debido que al resto de las especies contaban con genomas únicos estos tenían una cobertura del 100% y un porcentaje de identidad del 100%.

El análisis de ANIb fué mucho más estricto, los 29 genomas de *A. phagocitphylum* tenían un valor de cobertura de entre el 85% y el 100 %, en comparación con el resto de las especies del género *Anaplasma* tenía valores de entre un 20% como el mínimo y el 32% como máximo de cobertura. De los 29 genomas, 22 genomas tuvieron un porcentaje de identidad del 95% mientras que 4 genomas tuvieron un 94% y un genoma con 89% de identidad.

A. marginale tuvo un valor de cobertura de entre el 87% y el 100% y los 21 genomas tuvieron un valor de identidad mayor del 95%.

A. capra su valor de cobertura fué de entre 98% y 100% y de identidad fue del 99 % y 100%.

Debido que al resto de las especies contaban con genomas únicos, estos tenían una cobertura del 100% y un porcentaje de identidad del 100%.

Una vez obtenidos estos resultados, se llevó a cabo un análisis de correlación entre la cobertura y a identidad de los genomas en donde se podría tener un panorama más general de la divergencia general en todo el genoma.

Genómica comparativa del género *Anaplasma*

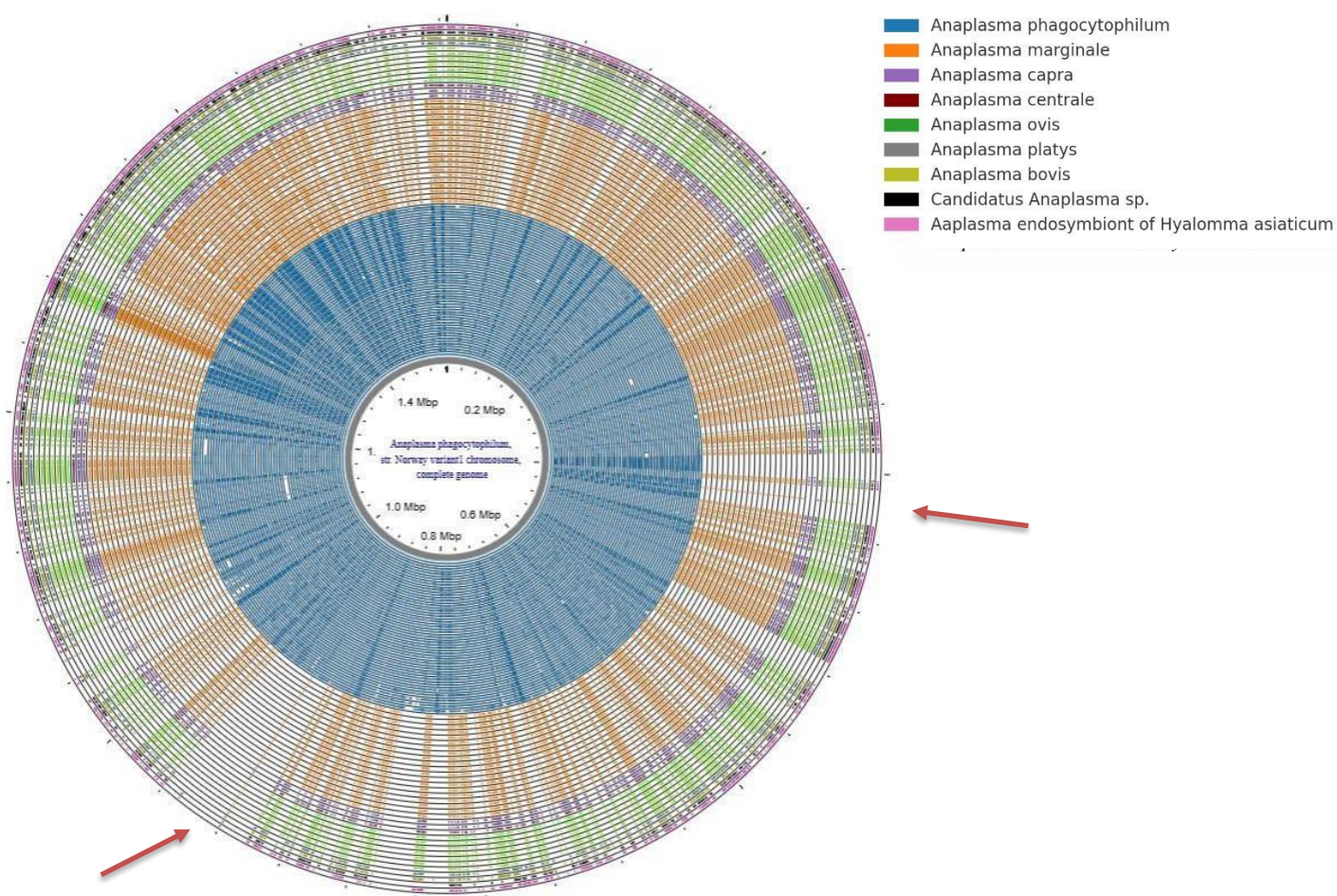


Figura 22. Anillo Blast del Género *Anaplasma* generada en Proksee, se colocó en el núcleo como genoma de referencia *A. phagocytophilum* (cepa norway variant 1), cada banda de color alrededor del núcleo corresponde a un genoma de *Anaplasma* (64 genomas) contra el genoma de referencia, los segmentos coloreados corresponden a regiones similares a la cepa Norway y los huecos blancos corresponden a posiciones donde no se encontró un alineamiento significativo (esa región podría ser ausencia ó divergencia).

En la figura 22 se muestra que la especie *A. phagocytophilum* presenta regiones altamente conservadas, pero contienen pequeños huecos, esto sugiere su diversidad genómica, además de que es el que infecta a un gran número de hospederos, se encuentran distribuidas en diferentes regiones del mundo y tiene una gran compatibilidad biológica con su vector la garrapata *Ixodes* la cual parasita a diversos hospederos. Podemos observar que tiene genes que se conserva con *A. marginale* y en donde se observa mayor diferencia clara es en las especies *A. platys*, *A. bovis*, *Candidatus anaplasma sp* y *Anaplasma endosimbionte* de *Hyalomma asiaticum*.

El resultado de este anillo es mostrar la conservación de las regiones del genoma de referencia a lo largo de toda la diversidad de especies de *Anaplasma*.

Genómica comparativa del grupo de los eritrocitos

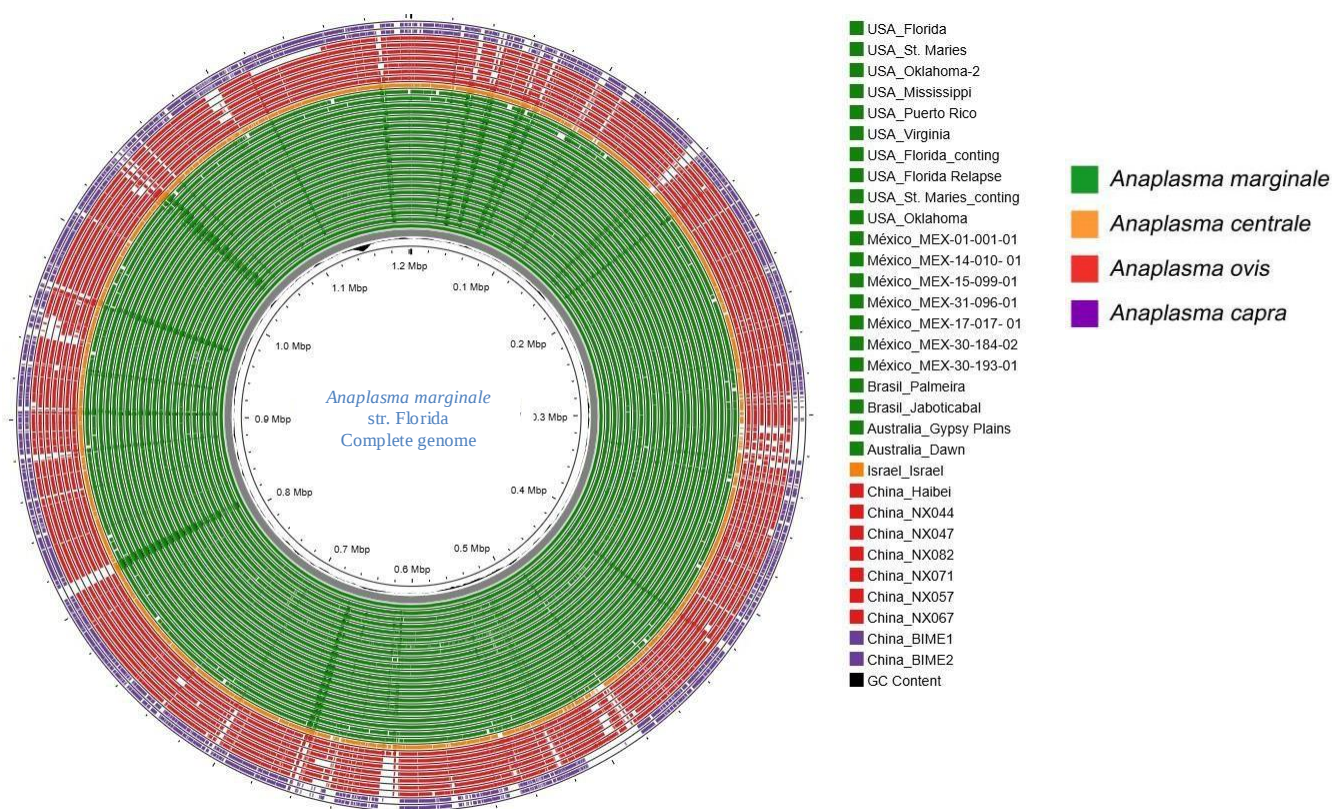


Figura 23. Anillo Blast del grupo de los eritrocitos. Las especies que infectan a eritrocitos está conformado por: *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis* y *A. capra*, en este análisis comparativo mediante anillo de blast. Se utilizó como gen de referencia un gen completo de la especie *A. marginale* cepa str. Florida, los demás genomas se organizaron de acuerdo con su origen geográfico para determinar si existe alguna correlación entre la variabilidad genética y la región de procedencia.

En el anillo se puede apreciar en el centro cepas provenientes de Estados Unidos el cuál se mantienen en su mayoría altamente conservado, además de que tienen cierta similitud con las cepas aisladas en México y Brasil. En contraste, al comparar esas mismas cepas con las de Australia, se observan diferencias muy claras en ciertas regiones del genoma. Esto sugiere que, aunque existe un núcleo de genes compartidos entre todas las cepas aisladas de *A. marginale*, las cepas australianas han acumulado variaciones específicas que las distinguen de los linajes americanos y latinoamericanos.

También se observa que *A. ovis* proveniente de Israel tiene varias regiones conservadas con *A. marginale* en comparación con *A. ovis* y *A. capra* (Figura 23).

Genómica comparativa del grupo de los leucocitos

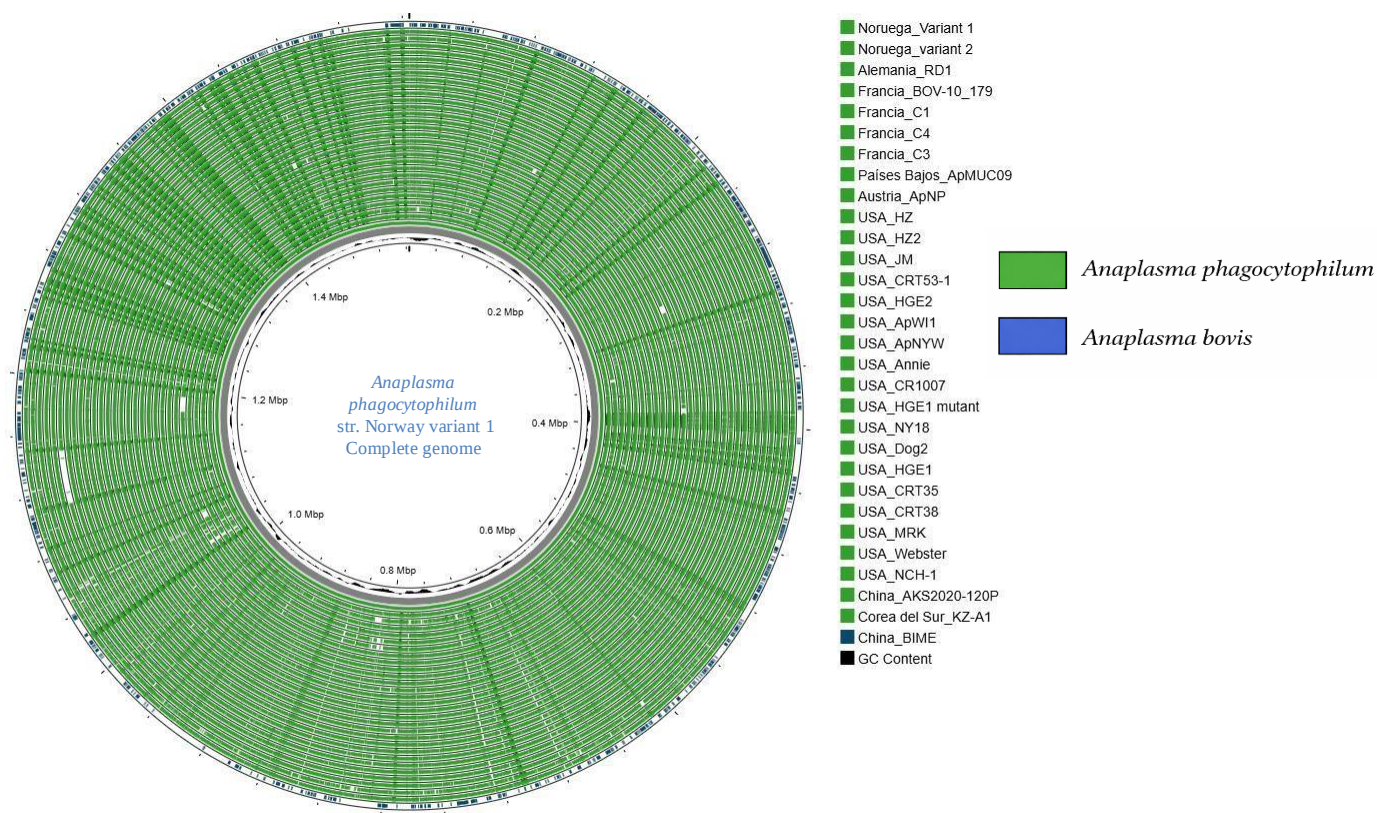


Figura 24. Anillo BLAST del grupo de los leucocitos. Se muestra la comparación genómica de múltiples cepas de *Anaplasma phagocytophilum* (en verde) y *Anaplasma bovis* (en azul), alineadas contra un genoma de referencia. Los anillos externos representan las distintas cepas analizadas, donde las regiones conservadas indican una alta similitud genómica, mientras que los espacios en blanco corresponden a regiones ausentes o con menor similitud. En el centro se presenta el genoma de referencia, y el contenido de GC se muestra en el anillo interno. Este análisis permite visualizar el grado de conservación y variabilidad genómica entre las cepas del grupo.

En el caso del grupo de los leucocitos en el centro se tomó como genoma completo de referencia *A. phagocytophilum* cepa Norway variant 1, proveniente de Noruega. Se observa que esta especie es muy diversa entre sí genéticamente, en particular las cepas que se encuentra en Estados Unidos. Aunque tanto *A. phagocytophilum* y *A. bovis* pertenecen del mismo grupo de leucocitos, infectan a diferentes células en este caso a neutrófilos y monocitos, y claramente se puede observar que *A. bovis* tiene muy pocas regiones que se conservan con *A. phagocytophilum* (Figura 24).

Identificación de las proteínas relacionadas con la patogenicidad, resistencia a antibióticos y evasión del sistema inmune.

El género *Anaplasma* ha sido reportado como un potencial grupo de bacterias zoonóticas, con capacidad de infectar distintos hospedadores vertebrados, incluyendo al humano. Con el objetivo de evaluar su riesgo potencial para la salud pública, se utilizó PathogenFinder versión 1.1, es una herramienta diseñada para predecir el potencial patógeno de bacterias hacia humanos a partir de datos de patrones en proteínas asociadas a organismos patógenos y no patógenos, utilizando modelos estadísticos y de aprendizaje automático.

Para ello, PathogenFinder construye una base de datos de familias de proteínas (PFDB) mediante la agrupación de proteínas en clústeres utilizando herramientas como CD-HIT, la cual permite agrupar secuencias con alta similitud y reducir la redundancia del conjunto de datos. A partir de estos clústeres, el objetivo es identificar únicamente aquellos que presenten un valor discriminativo entre organismo patógenos y no patógenos (0 y 1).

En conjunto, este proceso permite construir la PFDB (base de datos de familia de proteínas) a partir de la agrupación de proteínas, la evaluación de su asociación con patogenicidad y la selección de aquellas familias con mayor valor discriminativo. Estas familias de proteínas constituyen la base del modelo de PathogenFinder para predecir el potencial patogénico de un organismo.

En las nueve especies analizadas del género *Anaplasma*, se identificó potencial patogénico en todas ellas, incluyendo *Candidatus anaplasma sp.* (**Figura 30B**), lo que sugiere la presencia de genes asociados con la capacidad de invasión o interacción con células humanas. Destaca particularmente *A. phagocytophilum*, que presentó el mayor número de proteínas asociadas a patogenicidad humana (277 proteínas; **Figura 28**). Este resultado es consistente, ya que el humano es uno de sus principales hospedadores. En el caso de *A. marginale*, se analizaron 21 genomas completos, identificándose en conjunto 14 proteínas patogénicas específicas para huésped humano. No obstante, en los genomas ensamblados a nivel cromosómico (GCA_000495495.1, GCA_000495535.1, GCA_003515675.1 y GCA_003515735.1) no se detectaron proteínas asociadas a patogenicidad (**Figura 29**), lo cual podría relacionarse con variaciones en la calidad del ensamblaje, pérdida génica o variabilidad entre cepas.

Para *A. platys*, con un único genoma ensamblado a nivel cromosómico, se identificaron 9 proteínas patogénicas (**Figura 30C**). En *A. bovis* se detectaron 2 proteínas (**Figura 30A**), en *A. ovis* 5 (**Figura 31B**), en *A. centrale* 6 (**Figura 31A**), en *A. capra* 5 (**Figura 30D**), y en *Candidatus anaplasma sp.* 7 (**Figura 30B**).

Para visualizar comparativamente estos resultados, se construyó un mapa de presencia-ausencia de las proteínas patogénicas identificadas. En este mapa, las proteínas asociadas a patogenicidad se representan en color azul, permitiendo observar patrones de conservación o variabilidad entre especies. Asimismo, se incluyó una barra lateral que indica la probabilidad de patogenicidad humana en una escala de 0 a 1, donde el valor más alto corresponde a *A. phagocytophilum*, confirmando su mayor índice de riesgo potencial en comparación con las demás especies analizadas.

En conjunto, estos resultados sugieren que, aunque todas las especies del género presentan algún grado de potencial patogénico predicho, existe una marcada variabilidad en la cantidad y probabilidad de proteínas asociadas a infección humana, destacando a *A. phagocytophilum* como la especie con mayor respaldo genómico para un posible impacto zoonótico. Adicionalmente, PathogenFinder identificó secuencias que coincidieron con familias de proteínas clasificadas como no patógenas dentro de su base de datos.

Mapa de presencia/ausencia de proteínas
y probabilidad de ser patógeno en humanos del Género *Anaplasma*.

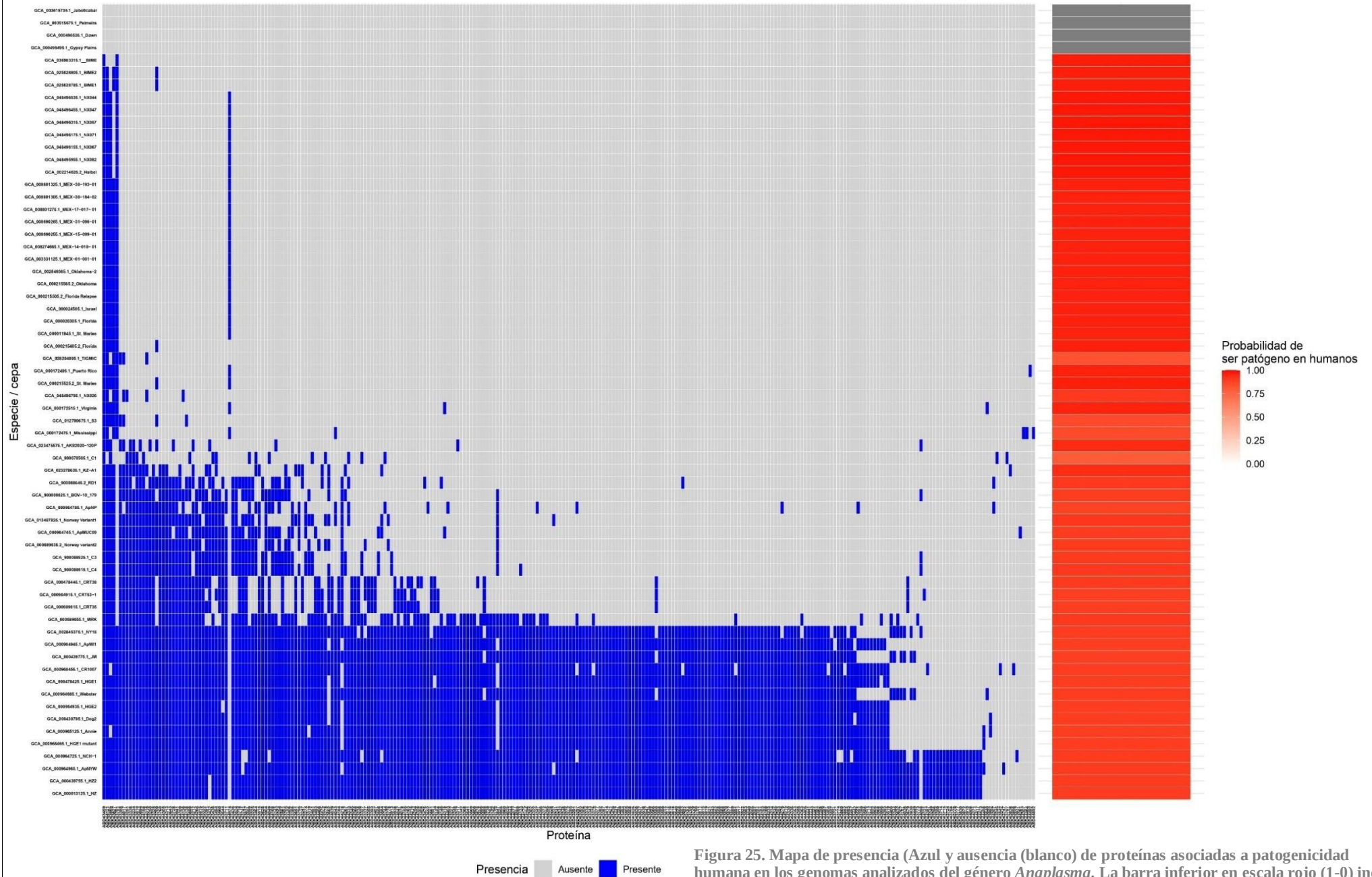


Figura 25. Mapa de presencia (Azul y ausencia (blanco) de proteínas asociadas a patogenicidad humana en los genomas analizados del género *Anaplasma*. La barra inferior en escala rojo (1-0) indica la probabilidad estimada de infección en humanos. *A. phagocytophilum* presentó la mayor cantidad de proteínas relacionadas con la patogenicidad, mientras que *A. bovis* mostró menos. En algunas cepas de *A. marginale* (aislamientos de Australia y Brasil) no se detectaron proteínas asociadas.

Mapa de calor de patogenicidad del grupo de los eritrocitos

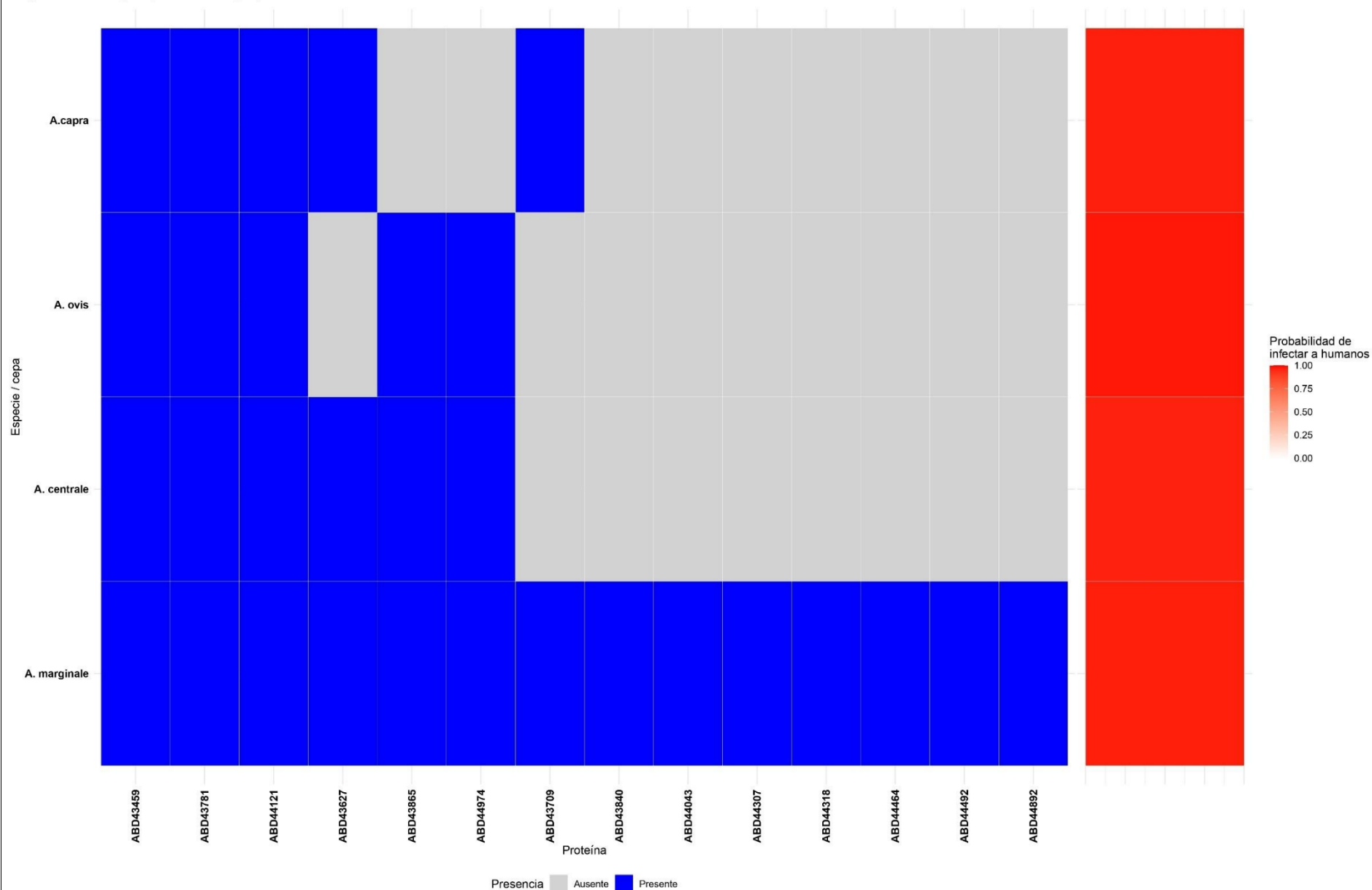


Figura 26. Mapa de presencia (azul) y ausencia (blanco) de proteínas asociadas a patogenicidad humana en el grupo que infecta eritrocitos (*Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis*, *Anaplasma centrale* y *Anaplasma capra*). La barra lateral en escala rojo (1–0) indica la probabilidad estimada de infección en humanos, mostrando variación entre especies y aislamientos, con menor detección de proteínas asociadas en algunas cepas.

Mapa de calor de patogenicidad del grupo de los leucocitos

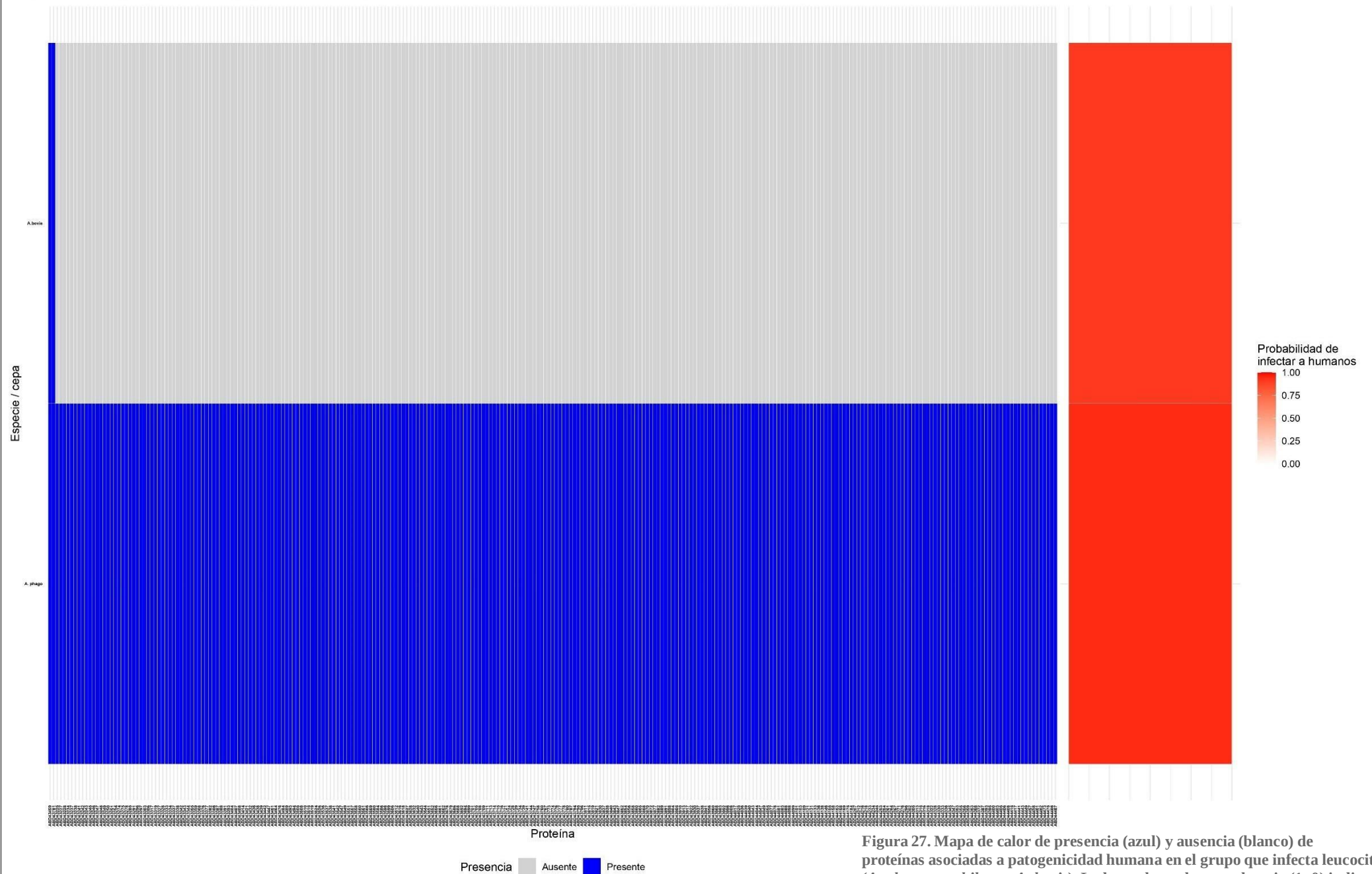


Figura 27. Mapa de calor de presencia (azul) y ausencia (blanco) de proteínas asociadas a patogenicidad humana en el grupo que infecta leucocitos (*A. phagocytophilum* y *A. bovis*). La barra lateral en escala rojo (1–0) indica la probabilidad estimada de infección en humanos, observándose mayor asociación de proteínas en *A. phagocytophilum* en comparación con *A. bovis*.

Mapa de presencia/ausencia de proteínas y probabilidad de ser patógeno en humanos de la especie *Anaplasma phagocitophilum*

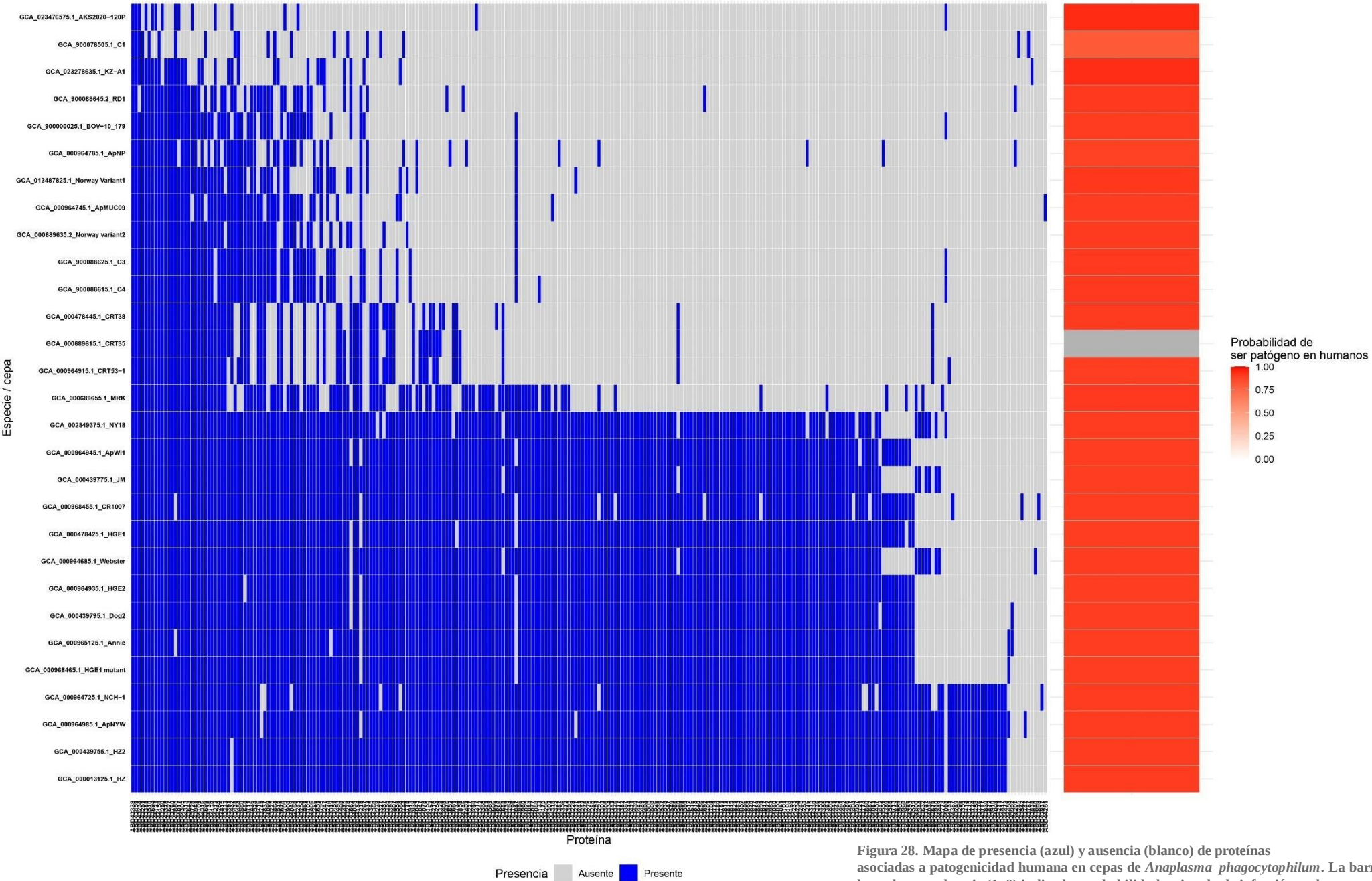


Figura 28. Mapa de presencia (azul) y ausencia (blanco) de proteínas asociadas a patogenicidad humana en cepas de *Anaplasma phagocytophilum*. La barra lateral en escala rojo (1–0) indica la probabilidad estimada de infección en humanos, observándose alta conservación de proteínas relacionadas con patogenicidad entre la mayoría de los aislamientos, aunque con variaciones puntuales entre cepas.

Mapa de presencia/ausencia de proteínas
y probabilidad de ser patógeno en humanos de la especie *Anaplasma marginale*

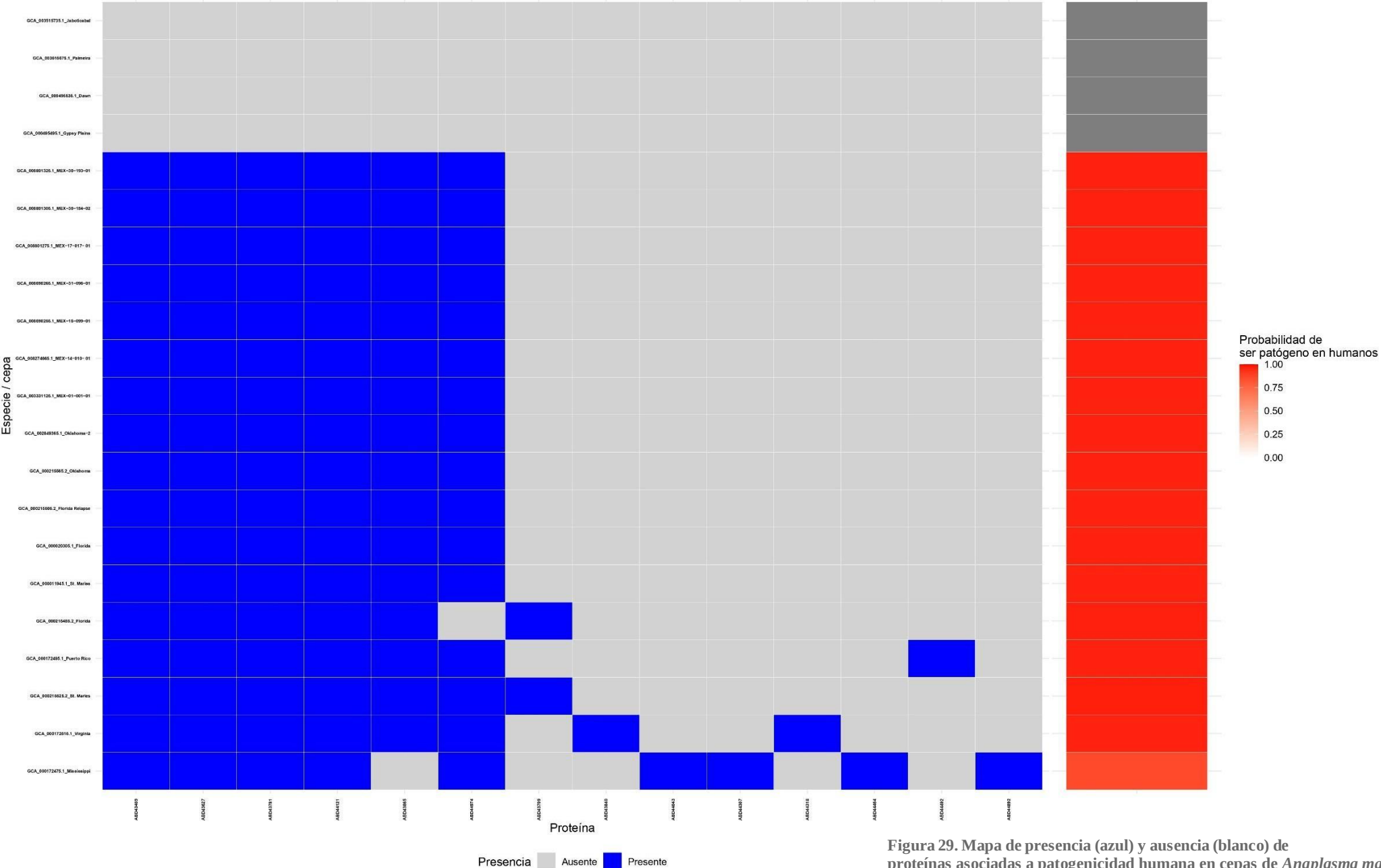


Figura 29. Mapa de presencia (azul) y ausencia (blanco) de proteínas asociadas a patogenicidad humana en cepas de *Anaplasma marginale*. La barra lateral en escala rojo (1–0) indica la probabilidad estimada de infección en humanos, evidenciando conservación general de proteínas con variaciones puntuales

Mapa de presencia/ausencia de proteínas y probabilidad de ser patógeno en humanos.

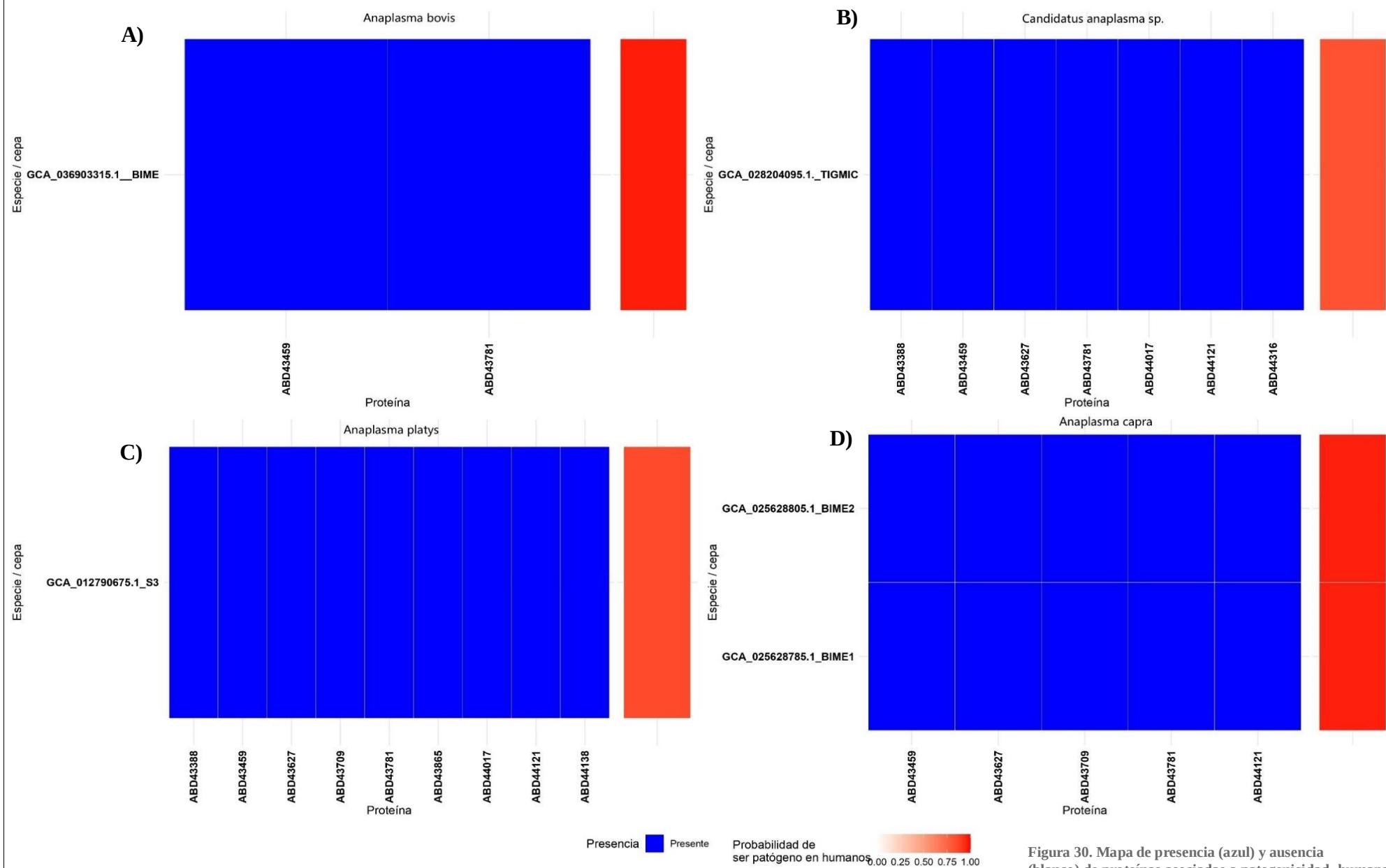


Figura 30. Mapa de presencia (azul) y ausencia (blanco) de proteínas asociadas a patogenicidad humana y probabilidad de infección (escala rojo 1–0) en especies individuales del género *Anaplasma*: (A) *Anaplasma bovis*, (B) *Candidatus Anaplasma sp.*, (C) *Anaplasma platys* y (D) *Anaplasma capra*. Se observa conservación de proteínas evaluadas en cada especie con variaciones en la probabilidad estimada de patogenicidad.

Mapa de presencia/ausencia de proteínas y probabilidad de ser patógeno en humanos.

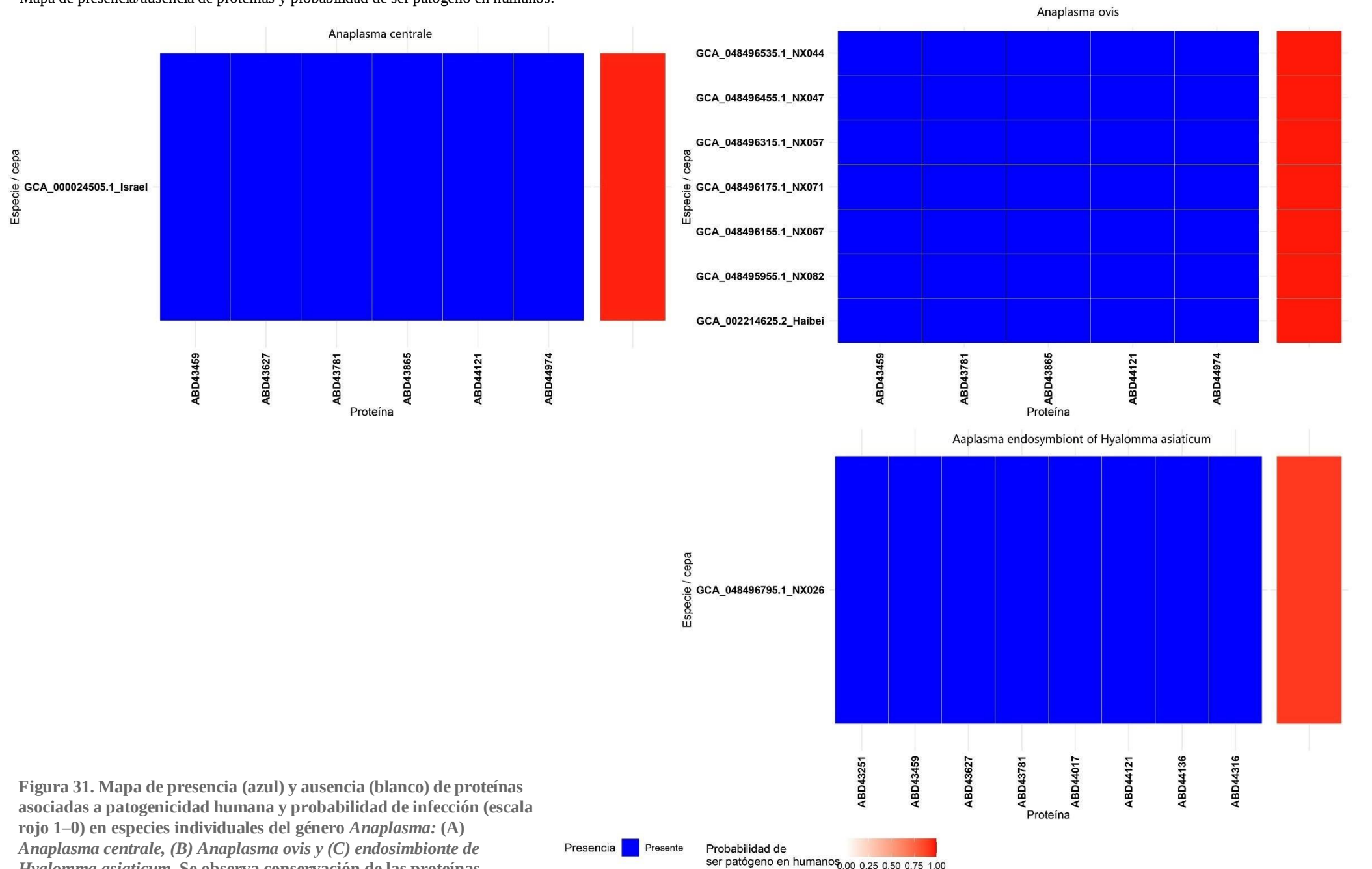


Figura 31. Mapa de presencia (azul) y ausencia (blanco) de proteínas asociadas a patogenicidad humana y probabilidad de infección (escala rojo 1–0) en especies individuales del género *Anaplasma*: (A) *Anaplasma centrale*, (B) *Anaplasma ovis* y (C) endosimbionte de *Hyalomma asiaticum*. Se observa conservación de las proteínas evaluadas entre los aislamientos, con variaciones mínimas en la probabilidad estimada de patogenicidad.

Resistencia a antibióticos

Utilizamos las bases de datos ResFinder (<http://genepi.food.dtu.dk/resfinder>) y CARD (<https://card.mcmaster.ca/>) para identificar si las especies pertenecientes al género *Anaplasma* podrían tener alguna resistencia a antibióticos.

La herramienta ResFinder en la versión 4.6.0 sirve para identificar genes adquiridos y/o encuentra mutaciones cromosómicas que median la resistencia a los antimicrobianos en la secuencia de DNA total o parcial de bacterias, de la lista de los antimicrobianos se analizaron de la clase de los aminoglucósidos, aminociclitol, quinolona, beta-lactámicos, pleuromutilina, macrólidos, tetraciclinas, estreptogramina b, oxazolidinona, amfenicol, polimixina, esteroides antibacterial, ácido fusidico, rifamicina, nitroimidazol y inóforos, el cual en su mayoría actúan como antibiótico. CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) es una es una seleccionada de determinantes de resistencia caracterizados y revisados por pares y antibióticos asociados, organizados según los modelos de detección de genes AMR (mutaciones puntuales asociadas a la resistencia) utilizando la herramienta Ontología de Resistencia a los Antibióticos (ARO), que organiza y clasifica información sobre los genes y mecanismos que confieren resistencia a los antibióticos en microorganismos. En ambas bases de datos, no salió ningún resultado de que las especies del género *Anaplasma* fueran resistentes a ningún antibiótico hasta en la actualidad.

Identificación de factores de Virulencia.

VFAnalyzer es una herramienta bioinformática utilizada para la identificación de factores de virulencia mediante la comparación de secuencias con la base de datos Virulence Factors Database (VFDB). A diferencia de métodos basados únicamente en búsquedas de similitud, como BLAST, VFAnalyzer emplea un enfoque basado en ortología, agrupando genes en familias funcionales para evitar falsos positivos derivados de genes parálogos.

El análisis se realiza mediante búsquedas jerárquicas e iterativas contra conjuntos de datos previamente curados, lo que permite identificar tanto factores de virulencia conservados como aquellos específicos de especie o cepa. Además, la herramienta incorpora un refinamiento basado en el contexto genómico, considerando la organización de genes en sistemas funcionales, como operones o sistemas de secreción, lo que incrementa la precisión en la identificación de determinantes de virulencia.

Para este estudio, se realizó un análisis de los factores de virulencia del género *Anaplasma* utilizando VFDB, una plataforma especializada en la recopilación de genes y proteínas asociados con la patogenicidad bacteriana. En dicha base de datos se encuentran reportadas únicamente algunas especies del género, incluyendo *A. centrale* (cepa Israel), *A. phagocytophilum* (cepas HZ,

Dog2, H2Z y JM) y *A. marginale* (cepas Florida y St. Maries). Debido a esta limitada representación, se analizaron adicionalmente otros genomas disponibles del género *Anaplasma*, con el objetivo de identificar factores de virulencia a nivel de género mediante inferencia por similitud de secuencia.

Entre los principales factores identificados se encuentra AipA, una proteína de invasión caracterizada en *A. phagocytophilum*, la cual participa en la adhesión e invasión de células hospedadoras (**Figura 32**). Asimismo, se detectaron las proteínas Asp14 y OmpA (YompA), asociadas con procesos de adhesión bacteriana y entrada a la célula huésped, lo que sugiere la presencia de mecanismos conservados de colonización dentro del género *Anaplasma*.

Un hallazgo relevante fue la identificación del sistema de secreción tipo IV (T4SS), específicamente el complejo VirB/VirD4, compuesto por múltiples subunidades (VirB2–VirB11 y VirD4). Este sistema es fundamental para la translocación de proteínas efectoras hacia la célula hospedadora, permitiendo la manipulación de procesos celulares y favoreciendo la supervivencia intracelular. Dentro de los efectores asociados a este sistema se identificaron AnkA y Ats-1, proteínas implicadas en la modulación de la respuesta inmune y en la alteración de funciones celulares del hospedador.

Adicionalmente, se identificó la enzima enolasa (eno) en especies como *A. capra*, *A. marginale*, *A. ovis* y *A. bovis* (**Figuras 33, 35, 39 y 40**). Aunque esta proteína cumple una función metabólica en la glucólisis, también ha sido asociada con la unión a plasminógeno, lo que sugiere un posible papel en la adhesión y diseminación bacteriana.

Finalmente, en *A. capra* se detectaron genes asociados con virulencia nutricional, particularmente en la ruta de biosíntesis de pirimidinas, con similitud a sistemas descritos en *Francisella tularensis* (**Figura 40**). Este tipo de mecanismo puede estar relacionado con la capacidad de la bacteria para sobrevivir en ambientes intracelulares con disponibilidad limitada de nutrientes.

En conjunto, estos resultados evidencian la presencia de múltiples determinantes de virulencia en el género *Anaplasma*, incluyendo factores relacionados con adhesión, invasión, secreción de efectores y adaptación metabólica. La identificación de estos elementos, mediante un enfoque basado en ortología y contexto genómico, refuerza el potencial patogénico del género y proporciona una base funcional para la interpretación de los resultados obtenidos en este estudio.

Presencia/ausencia de Factores de virulencia en la especie *Anaplasma phagocytophilum*

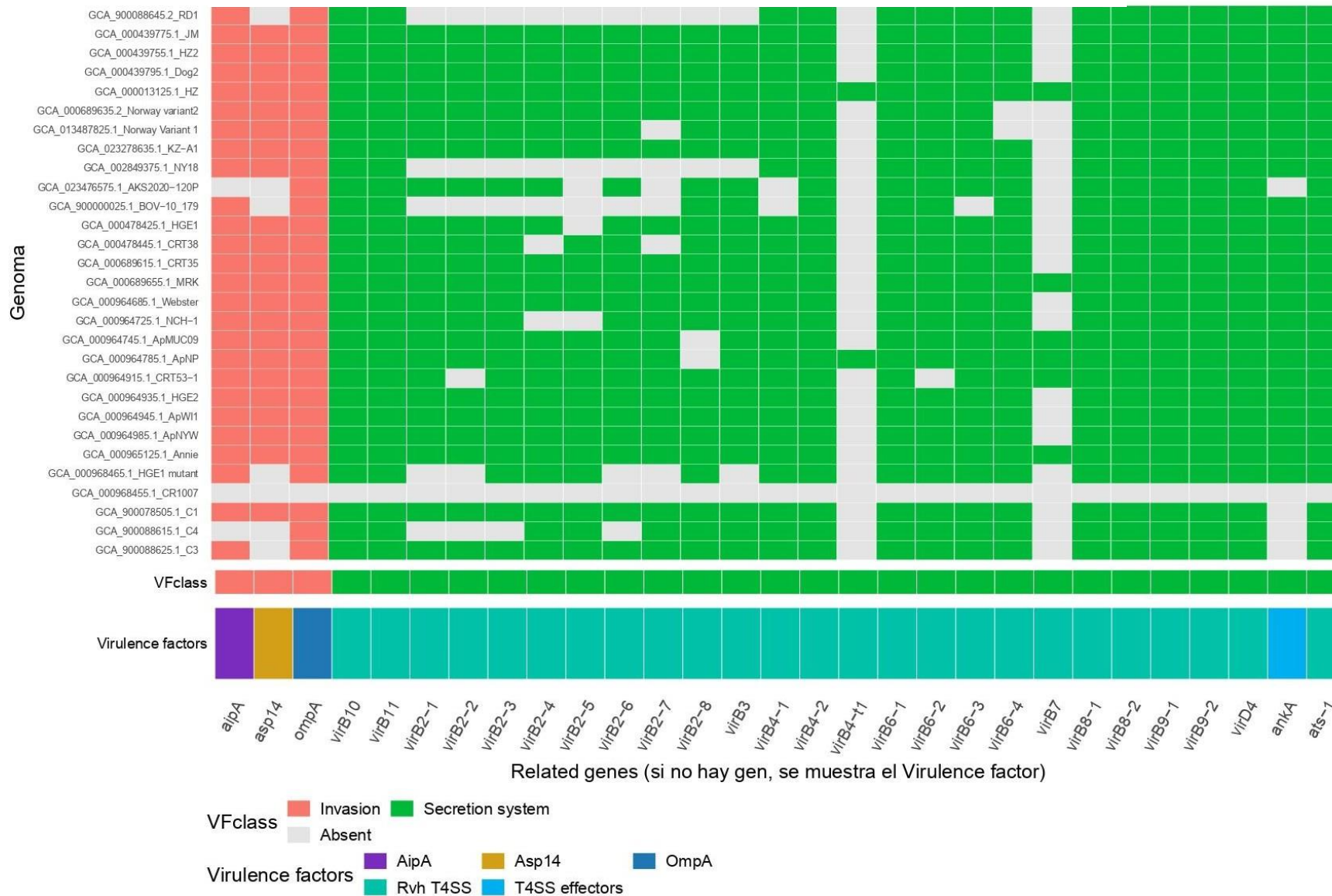


Figura 32. Mapa de presencia (verde) y ausencia (gris) de factores de virulencia en cepas de *Anaplasma phagocytophilum*. Se incluyen genes relacionados con invasión y sistema de secreción tipo IV (T4SS). La barra inferior clasifica los factores de virulencia por categoría funcional (AipA, Asp14, OmpA, Rvh T4SS y efectores T4SS), evidenciando alta conservación de los componentes del sistema de secreción entre los genomas analizados, con pérdidas puntuales en algunos aislamientos.

Presencia/ausencia de Factores de virulencia en la especie *Anaplasma ovis*



Figura 33. Mapa de presencia (verde) y ausencia (gris) de factores de virulencia en cepas de *Anaplasma ovis*. Se incluyen genes relacionados con invasión y sistema de secreción tipo IV (T4SS). La clasificación lateral indica la categoría funcional de cada factor de virulencia, observándose conservación general del sistema de secreción con pérdidas puntuales en algunos aislamientos.

Presencia/ausencia de Factores de virulencia en la especie *Candidatus anaplasma sp*

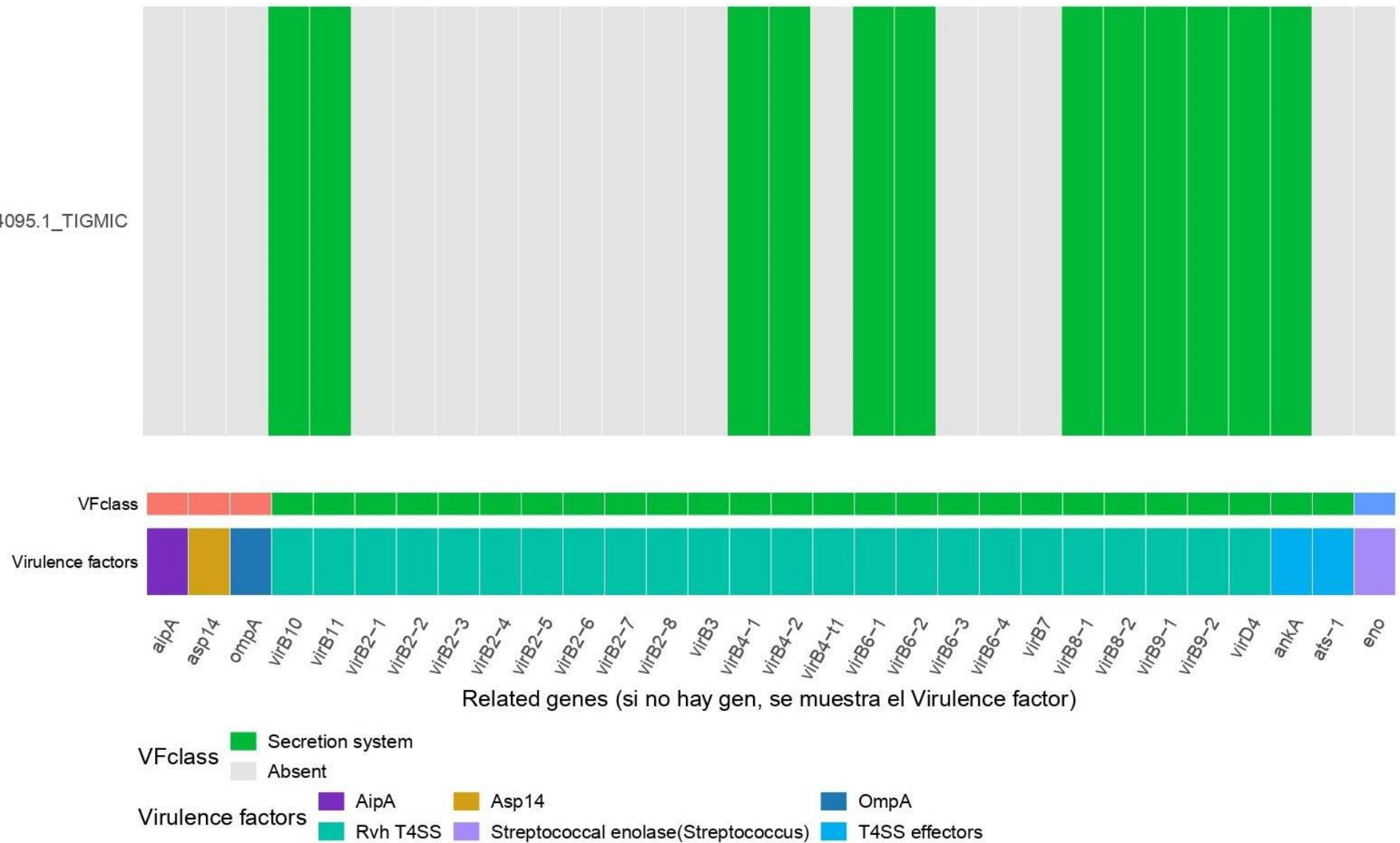


Figura 34. Mapa de presencia (verde) y ausencia (gris) de factores de virulencia en *Candidatus Anaplasma sp*. Se muestran genes asociados a invasión y al sistema de secreción tipo IV (T4SS), observándose un repertorio reducido en comparación con otras especies del género, con ausencia de varios.



Figura 35. Mapa de presencia (verde) y ausencia (gris) de factores de virulencia en cepas de *Anaplasma marginale*. Se muestran genes asociados a invasión y al sistema de secreción tipo IV (T4SS), evidenciando alta conservación del sistema de secreción entre los aislamientos, con pérdidas puntuales de algunos componentes en determinadas cepas.

Presencia/ausencia de Factores de virulencia en la especie *Anaplasma platys*

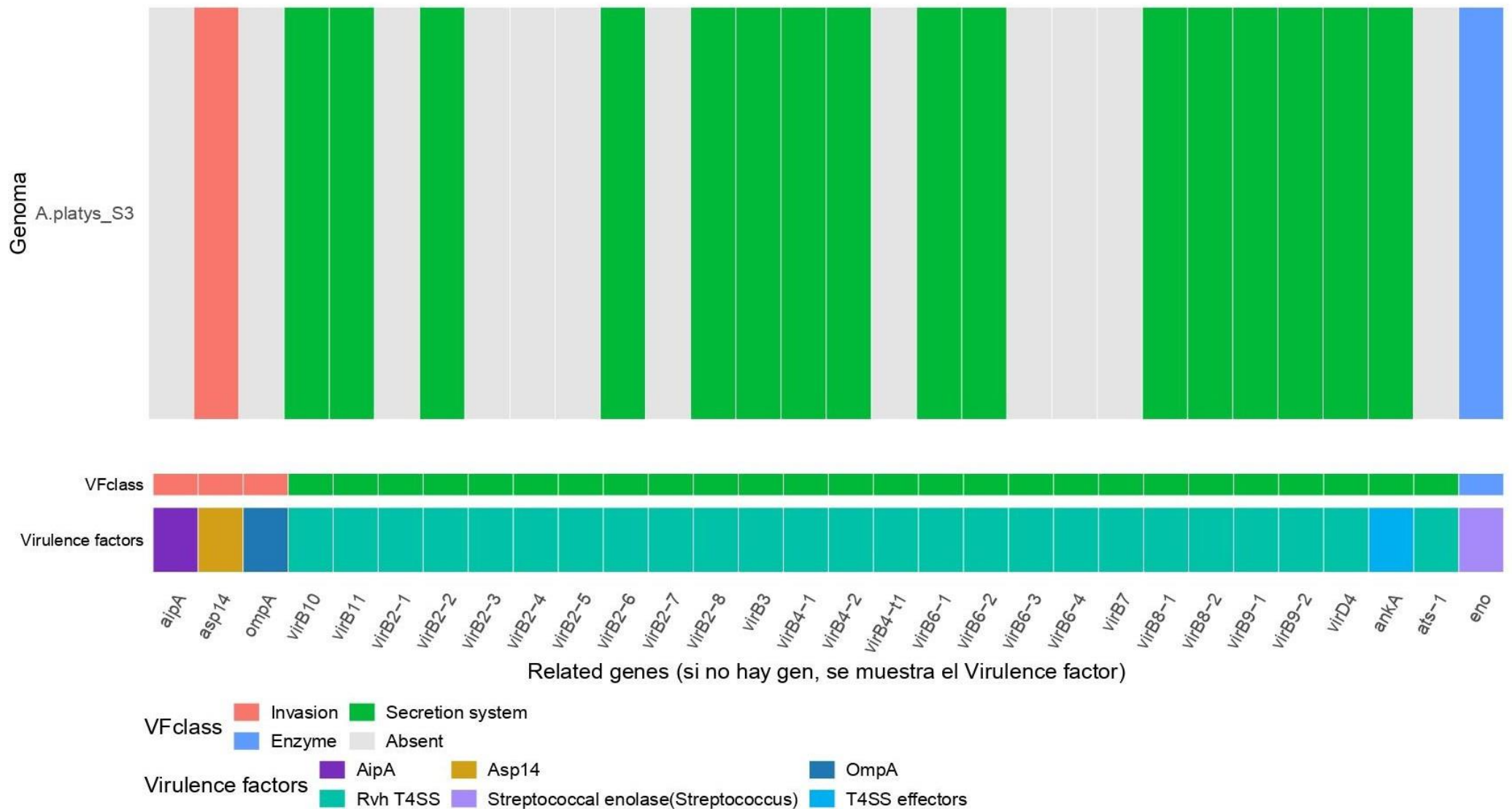


Figura 36. Mapa de presencia (verde) y ausencia (gris) de factores de virulencia en *Anaplasma platys*. Se muestran genes asociados a invasión y al sistema de secreción tipo IV (T4SS), observándose conservación parcial del sistema con ausencia de algunos componentes en el genoma analizado.

Presencia/ausencia de Factores de virulencia en la especie *Anaplasma centrale*

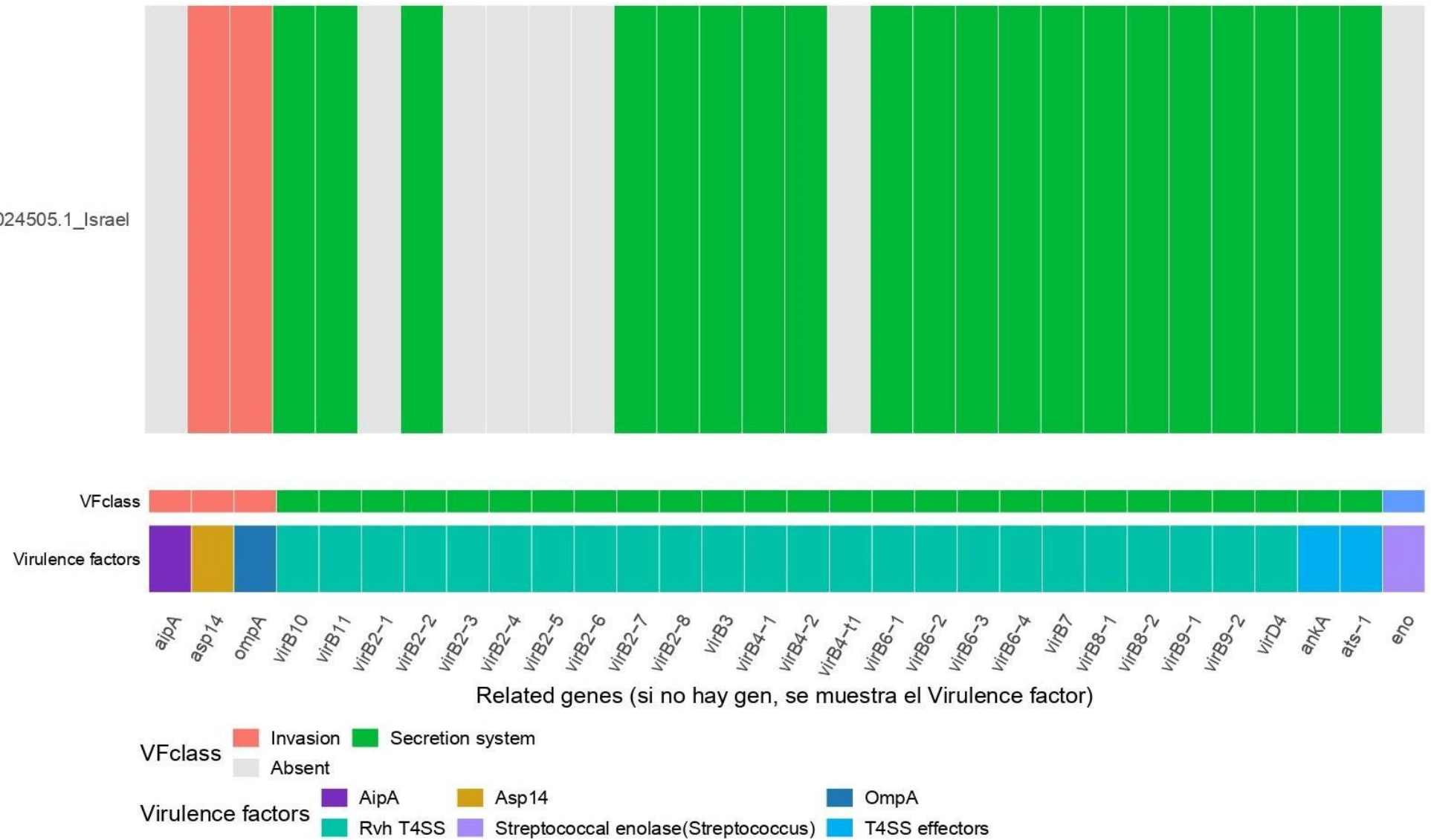


Figura 37. Mapa de presencia (verde) y ausencia (gris) de factores de virulencia en *Anaplasma centrale*. Se muestran genes asociados a invasión y al sistema de secreción tipo IV (T4SS), observándose conservación general del sistema de secreción y ausencia de algunos factores específicos de invasión.

Presencia/ausencia de Factores de virulencia en la especie *Aplasma endosimbionte de Hyalomma asiaticum*

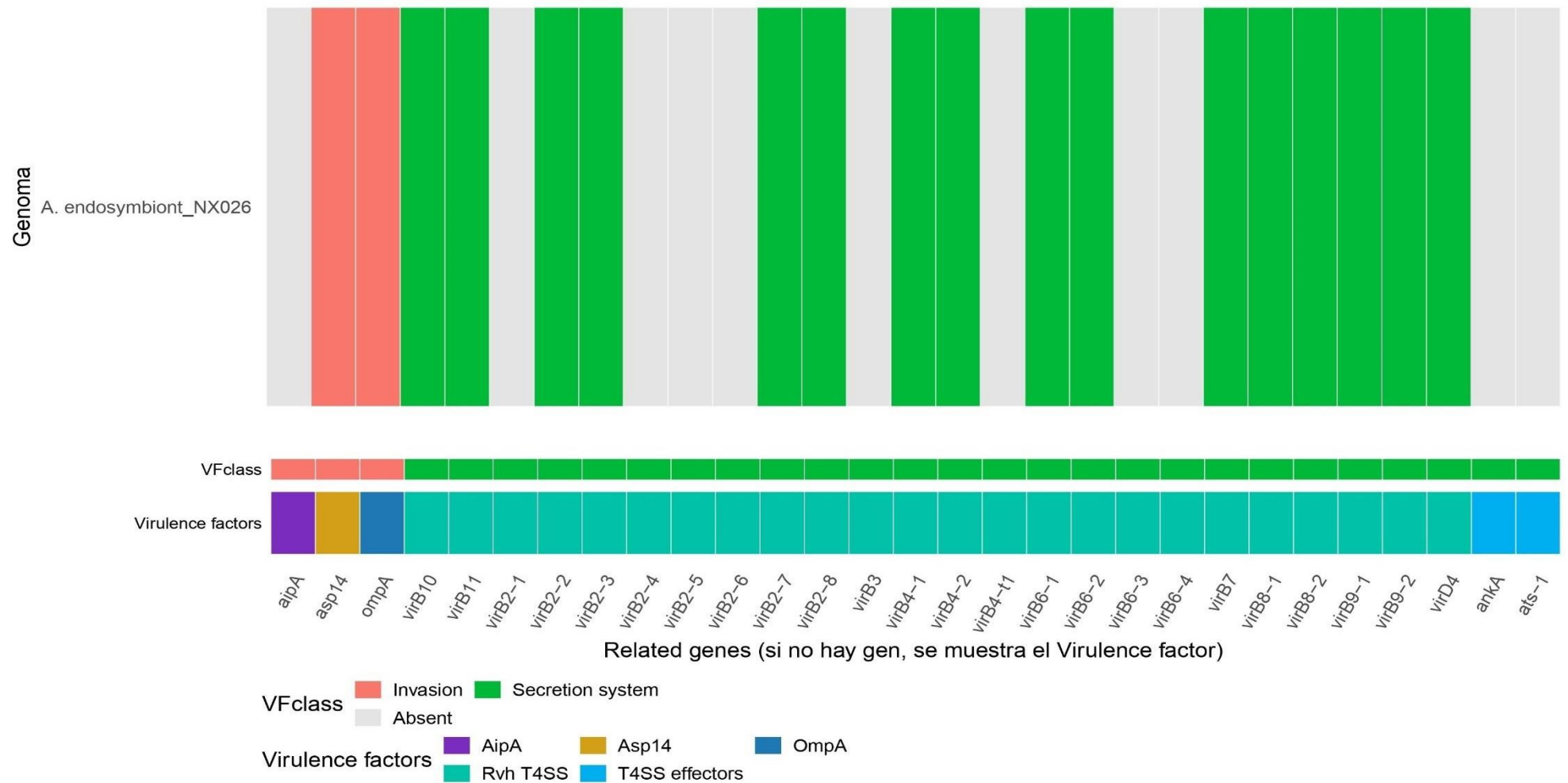


Figura 38. Mapa de presencia (verde) y ausencia (gris) de factores de virulencia en el *Aplasma endosimbionte de Hyalomma asiaticum*. Se muestran genes asociados a invasión y al sistema de secreción tipo IV (T4SS), observándose conservación parcial del sistema y ausencia de varios factores de virulencia asociados a patogenicidad.

Presencia/ausencia de Factores de virulencia en la especie *Anaplasma bovis*

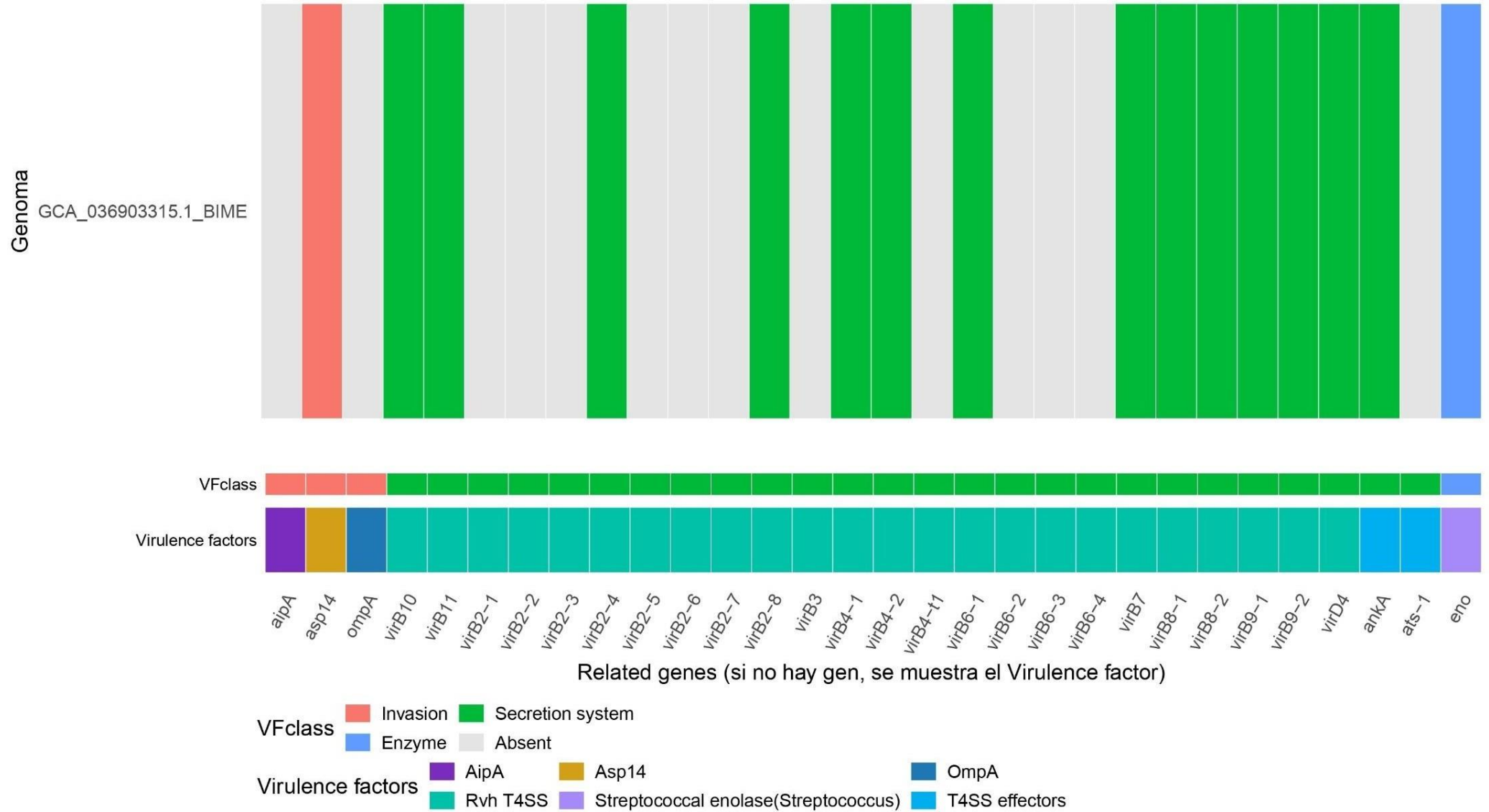


Figura 39. Mapa de presencia (verde) y ausencia (gris) de factores de virulencia en *Anaplasma bovis*. Se muestran genes asociados a invasión y al sistema de secreción tipo IV (T4SS), observándose conservación parcial del sistema con ausencia de diversos factores relacionados con patogenicidad.

Presencia/ausencia de Factores de virulencia en la especie *Anaplasma capra*

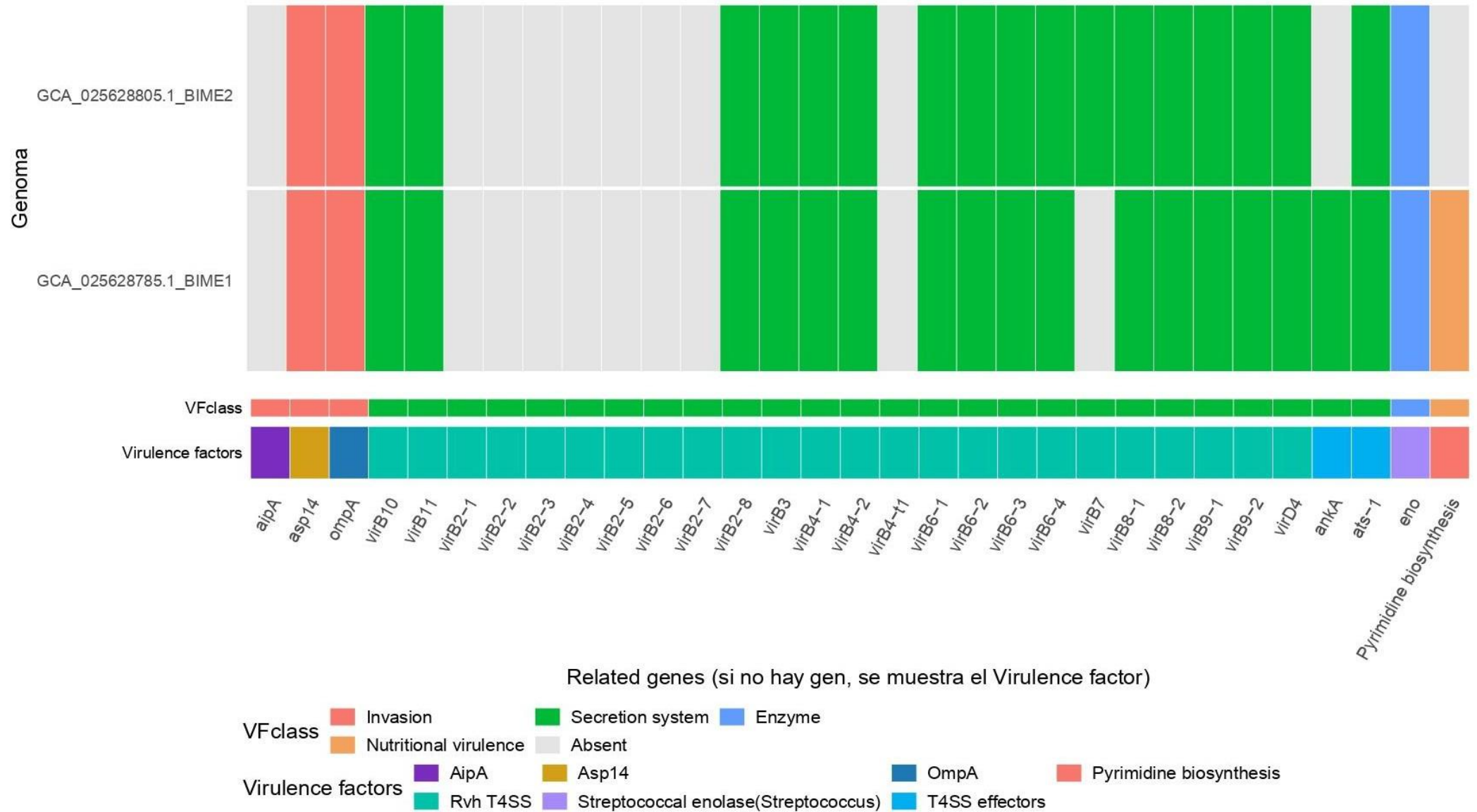


Figura 40. Mapa de presencia (verde) y ausencia (gris) de factores de virulencia en cepas de *Anaplasma capra*. Se muestran genes asociados a invasión y al sistema de secreción tipo IV (T4SS), observándose conservación general del sistema con variaciones puntuales entre aislamientos y presencia de genes adicionales relacionados con biosíntesis.

Base de datos de islas de patogenicidad

En la base de datos PAIDB versión 2.0 (http://www.paidb.re.kr/about_paidb.php) se identifica las islas de patogenicidad (PAI) y las islas de resistencia a los antimicrobianos (REI). PAIDB identifica las PAI, regiones homólogas a PAI, cPAI (región similar a PAI que se superponen a islas genómicas, posibles candidatos PAI), nPAI (región similar a PAI que no se superpone en islas genómicas, PAI no probable), REI, región genómica homóloga a REI, cREI (región similar a REI que se superpone a islas genómicas, posible candidato a REI) y nREI, región similar a REI que no se superpone a islas genómicas, REI no probable).

En este análisis no se identificó ninguna isla de patogenicidad, ni islas de resistencia a los antimicrobianos en el género *Anaplasma*.

Identificación de los marcadores moleculares

Una vez que se obtuvieron los archivos de salida del programa Roary, se determinó la presencia y ausencia de los genes, con base a este análisis se pudo identificar los marcadores moleculares para cada especie.

En el caso de *A. marginale*, este genoma fue el más conservado del todo el género por lo que se pudo identificar sólo 6 genes candidatos, *A. phagocytophilum* 272, *A. platys* 936, *A. centrale* 227,

A. ovis 188, *A. bovis* 119, *A. capra* 22, *Candidatus anaplasma sp.* 107, *Anaplasma endosymbiont of Hyalomma asiaticum* 3, también identificaron un marcador a nivel de género, 24 marcadores del grupo eritrocito, del grupo de las plaquetas 936, no se identificaron un marcador específico del grupo de los leucocitos, debido a que es el más variable entre especies.

Para el primer filtro se identificaron los genes que estaban presentes en cada una de las especies y se determinó que fueron genes únicos, también se determinó el tamaño de 1000 a 2000 pb y como segundo filtro fue identificar la secuencias de los genes candidatos como marcadores moleculares por medio de un script y realizar un blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para compararlo con otras especies reportadas. Al determinar que sea específico de especie, así sólo seleccionados los que dieron el 100% a las especies pertenecientes al género *Anaplasma*, de no ser así, se seleccionaban las que compartían una cobertura muy baja con otros organismos.

La gran mayoría de estos genes eran del tipo proteínas hipotéticas y otras relacionadas con vías metabólicas y regulación molecular.

Marcador molecular para género

El gen que se seleccionó para marcador molecular a nivel de género *Anaplasma* fue el gen ATP sintasa subunidad C, que era el gen Core en los análisis pangenómicos de Roary, la secuencia que se utilizó como marcador molecular fue de la especie *Anaplasma endosimbionte* de *Hyalomma asiaticum*, ya que su secuencia era la que mejor se conservaba con todas las especies, una vez obtenido este gen se hicieron dos blastn para comparar su identidad y cobertura, el primero era para determinar cómo este gen se conservaba a nivel de género y la otra era para saber si se compartía con algún otro organismo registrado en la base de datos. En el primer blast se utilizó los parámetros “Choose Search set”, se seleccionó la opción RefSeq genomes database, como organismo se seleccionó *Anaplasma* (taxid:768) y fue optimizado a somewhat similar sequences (blastn), esto para abarcar todas las especies del género (Figura 41).

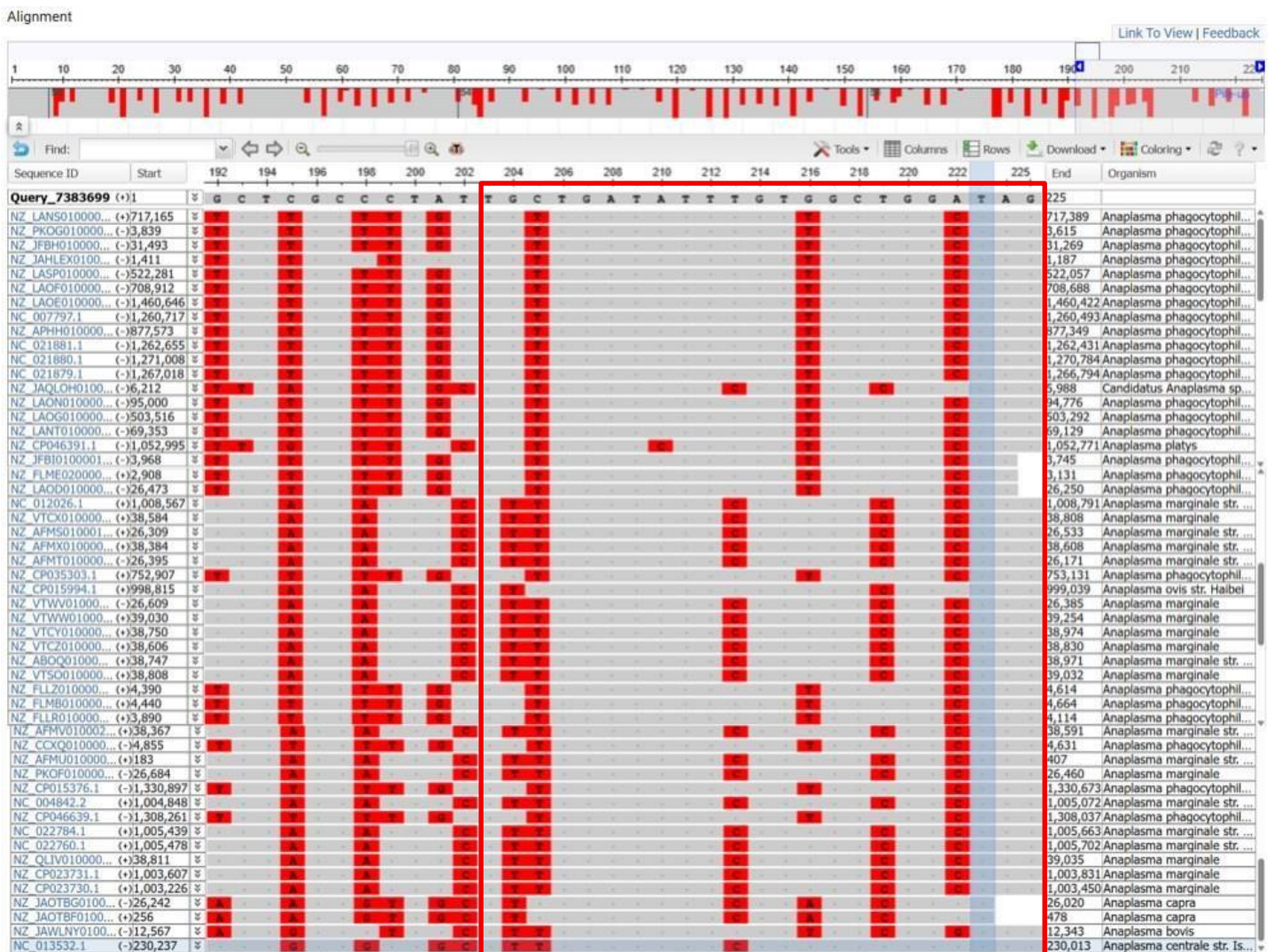


Figura 41. Visualización del Blastn del gen ATP sintasa subunidad C como candidato a marcador molecular del género *Anaplasma*



Para diseñar el marcador molecular, además de escoger las regiones más conservadas a nivel de género, se seleccionó específicamente el fragmento que abarca las posiciones 203 a 223 (resaltado en el recuadro rojo). Al someter esta región a un segundo BLAST contra la base de datos completa, se comprobó que también está presente en bacterias filogenéticamente cercanas al género *Anaplasma*, como *Ehrlichia japonica* (97% de cobertura y 78.08% de identidad), *Ehrlichia ruminantium* (97% de cobertura y 77.98% de identidad) y *Neoehrlichia mikurensis* (88% de cobertura y 75.63% de identidad), entre otras. Sin embargo, al optimizar la búsqueda para secuencias muy similares (BLASTn), muchas de estas especies mostraron un alineamiento parcial frente al gen candidato. Por ello, se eligió la región que no se alineaba o lo hacía mínimamente con dichas bacterias, pero que sí se mantenía completamente conservada en todas las especies del género *Anaplasma*.

Una vez seleccionada los oligonucleótidos fueron:

F 5'-ATGGACTCCCTTAGGTTTGTG-3'

R 5'-ATCCAGCCACAAATATCAGC-3' (GCTGATATTTGTGGCTGGAT)

Los oligonucleótidos fueron evaluados mediante OligoAnalyzer. El forward presentó una longitud de 22 nucleótidos, mientras que el reverse fue de 20 nucleótidos, con un contenido de GC de 45.5%, considerando adecuado. No se detectó la formación de estructuras secundarias tipo hairpin a una temperatura de 62.2, ni la formación de dímeros (self-dimer). Asimismo, el uso de una PCR anidada incrementa la especificidad del análisis. Este enfoque consta de dos etapas: una PCR externa y una interna. En la PCR externa se emplea el gen completo de la ATP sintasa subunidad C. Posteriormente, la PCR interna amplificó la región específica correspondiente al oligonucleótido seleccionado a partir del análisis BLAST.

Marcador molecular para grupo de eritrocitos

Para el marcador molecular de los eritrocitos se seleccionó el gen que codifica la proteína de

choque frío CspJ de la especie *A. capra*, se hicieron dos blast, uno en la base de datos de NCBI y otro con el programa Ugene (**Figura 43A**) para el aspecto visual, en ambos se obtuvieron resultados similares, en el primer blast obtuvieron que el gen comparte el 95% de cobertura y 91.67% de identidad con *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis*, siendo un buen candidato como marcador molecular del grupo de los eritrocitos.

Al optimizarlo con la opción menos estricta “somewhat similar sequences” se encontró similitud con otras bacterias reportadas, por lo que se seleccionaron las regiones mejores conservadas para el diseño de oligonucleótidos, de igual forma se obtuvieron las secuencias 100 pb upstream y downstream para los oligonucleótidos de la PCR externa (**Figura 43B**).

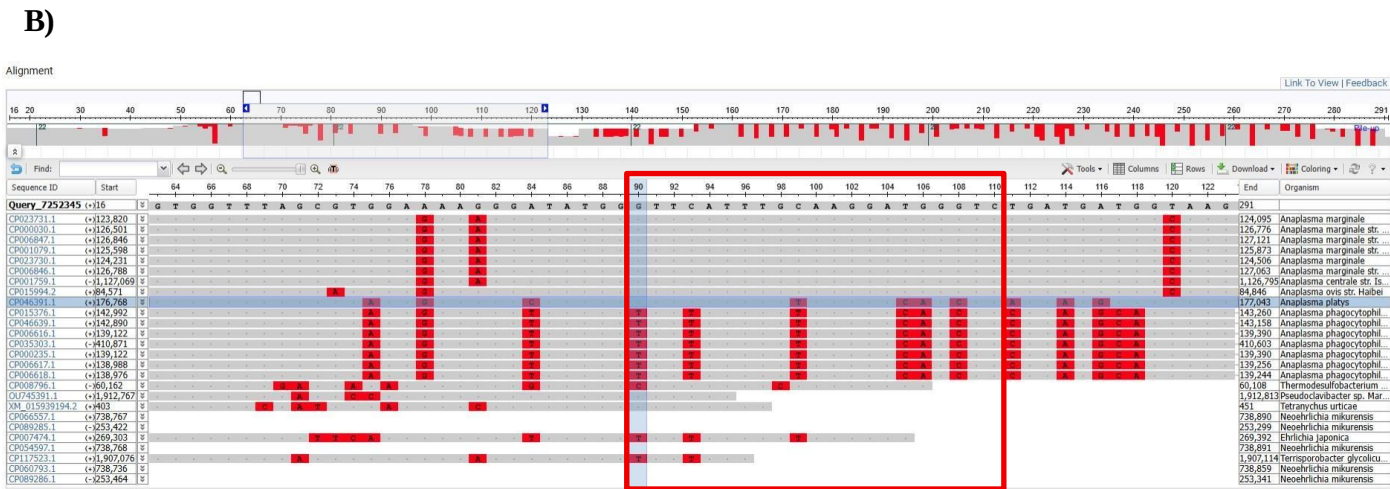
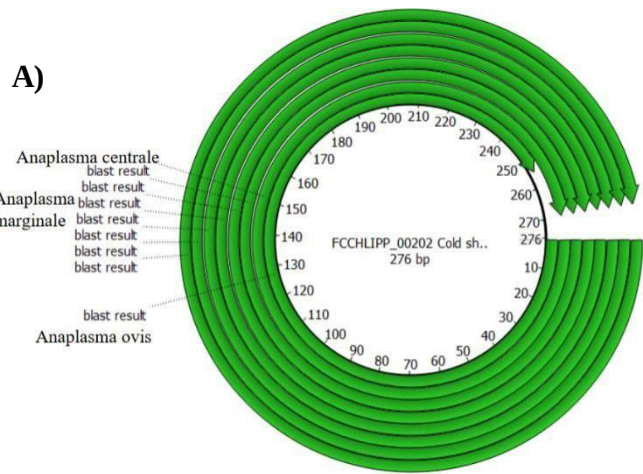


Figura 43 (A-B). Visualización del resultado del blastn en el programa Ugene del gen que codifica la proteína de choque de frío Cspj. Imagen debajo es la visualización de blastn de ncbi, mostrando en rojo la región seleccionada para los oligos interno del gen.

Una vez seleccionado los oligonucleótidos:

Primer Forward: “5’-GTTTCATTTGCAAGGATGGGTC’-3”

Primer Reverse: “5’-TCCTTTGCAACGACGTAATG’-3 (CATTACGTCGTTGCAAAGGA), se verificó con OligoAnalyzer.

Marcador molecular para la especie *A. marginale*

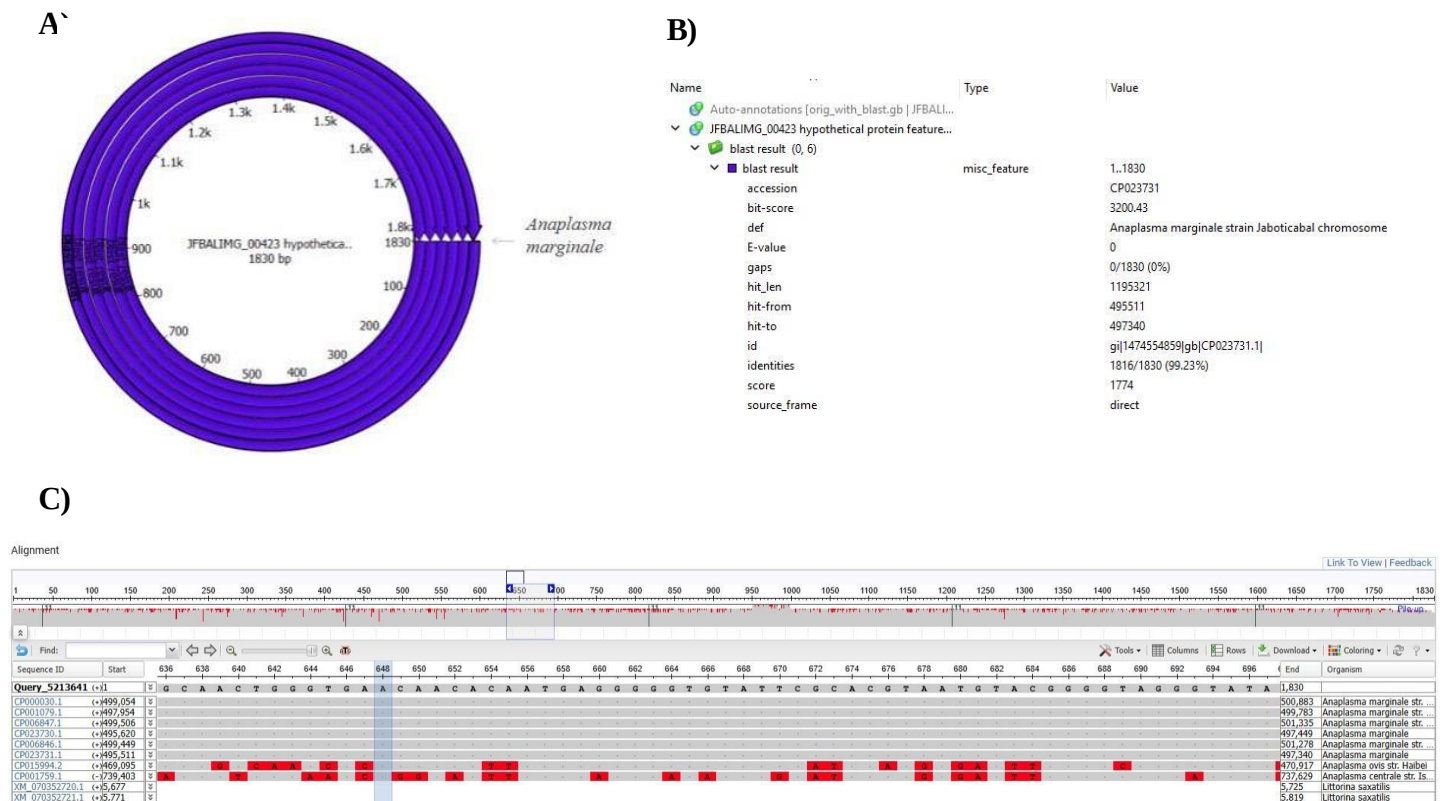


Figura 44(A-B-C). Visualización del resultado del blastn en el programa Ugene del gen que codifica la proteína hipotética siendo de 99% de cobertura y de entre 100% y 99.23% de identidad entre la misma especie. Se muestra la visualización de blastn de ncbi mostrando como la secuencia del gen de de la proteína hipotética es exclusiva de *Anaplasma marginale* si la comparamos con otras especies cercanas.

Para el marcador molecular se seleccionó el gen que codifica la proteína hipotética ya que esta se conserva muy bien entre cepas con un blastn de 99% de cobertura (**Figura 44A**) y de entre 100% y 99.23% de identidad entre la misma especie (**Figura 44B**).

Una vez obtenido el gen se diseñaron los oligonucleótidos internos quedando como:

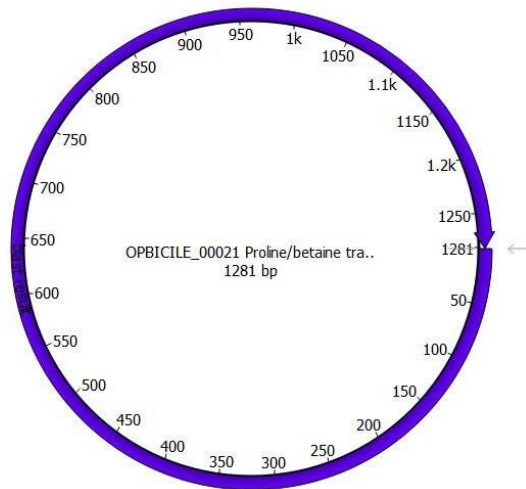
F 5’- ACAACACAATGAGGGGGTGT-3 y

R 5’-ACCGGAAGCTCTGTACCATC-3 (GATGGTACAGAGCTTCCGGT).

También se diseñaron los primers para la PCR externa comenzando con la posición 648 (**Figura 44C**).

Marcador molecular para la especie *A. ovis*

A)



B)

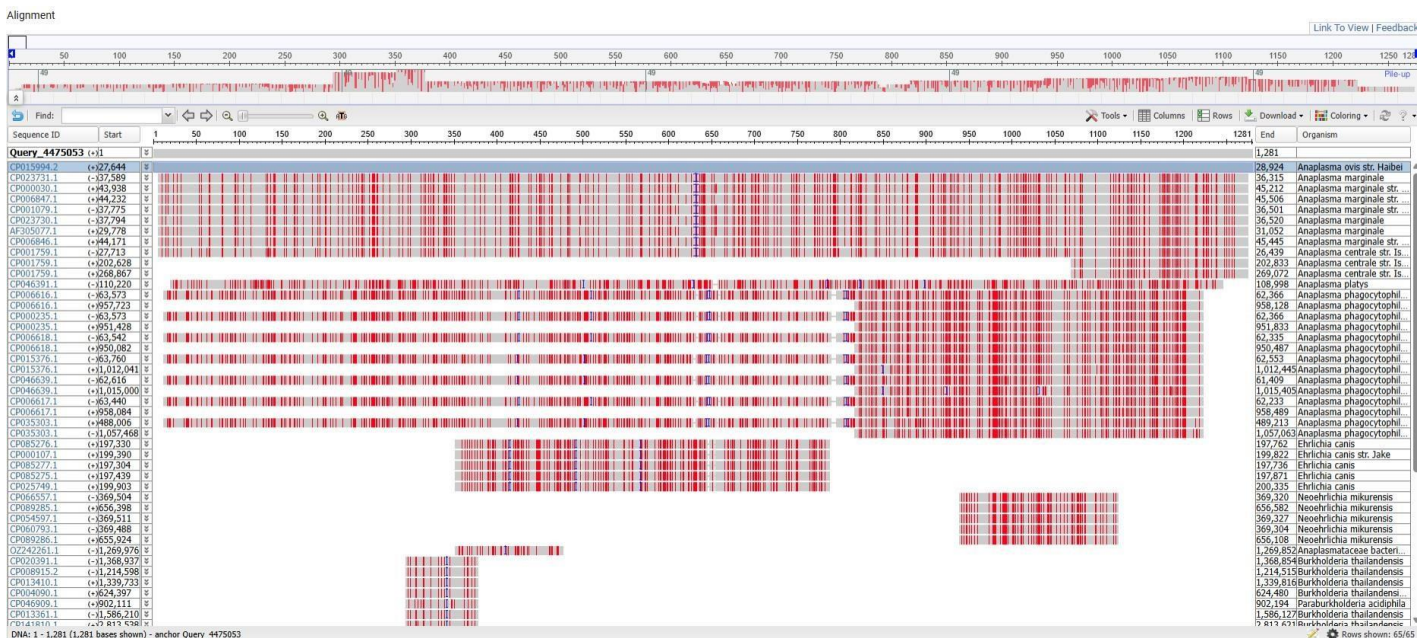


Figura 45(A-B). Visualización del resultado del blastn en el programa Ugene del gen que codifica la proteína del transporte Prolina/betaina es 100 % de identidad y 100% de cobertura de *Anaplasma ovis*. Se muestra la visualización de blastn de ncbi mostrando como la secuencia del gen de tansporte de Prolina/betaina es exclusiva de *Anaplasma Ovis* si la comparamos con otras especies cercanas.

Para el marcador molecular de la especie *A. ovis* se seleccionó un gen que se conservara 100% (Figura 45A) con esta especie y fue el gen que codifica la proteína de transporte Prolina/betaina, proteína esencial para adaptación osmótica. Al igual que las otras se diseñaron sus oligonucleótidos internos y externos (Figura 45B).

Marcador molecular de la especie *A. centrale*

Para el marcador molecular de la especie *A. centrale* se seleccionó un gen que se conservara 100% (**Figura 46B**) con esta especie y fue el gen que codifica la proteína de UDP-N-acetilmuramato--L-alanina ligasa (**Figura 46A**), enzima citosólica clave en la síntesis de la pared celular bacteriana. Al igual que las otras se diseñaron sus oligonucleótidos internos y externos (**Figura 46C**).

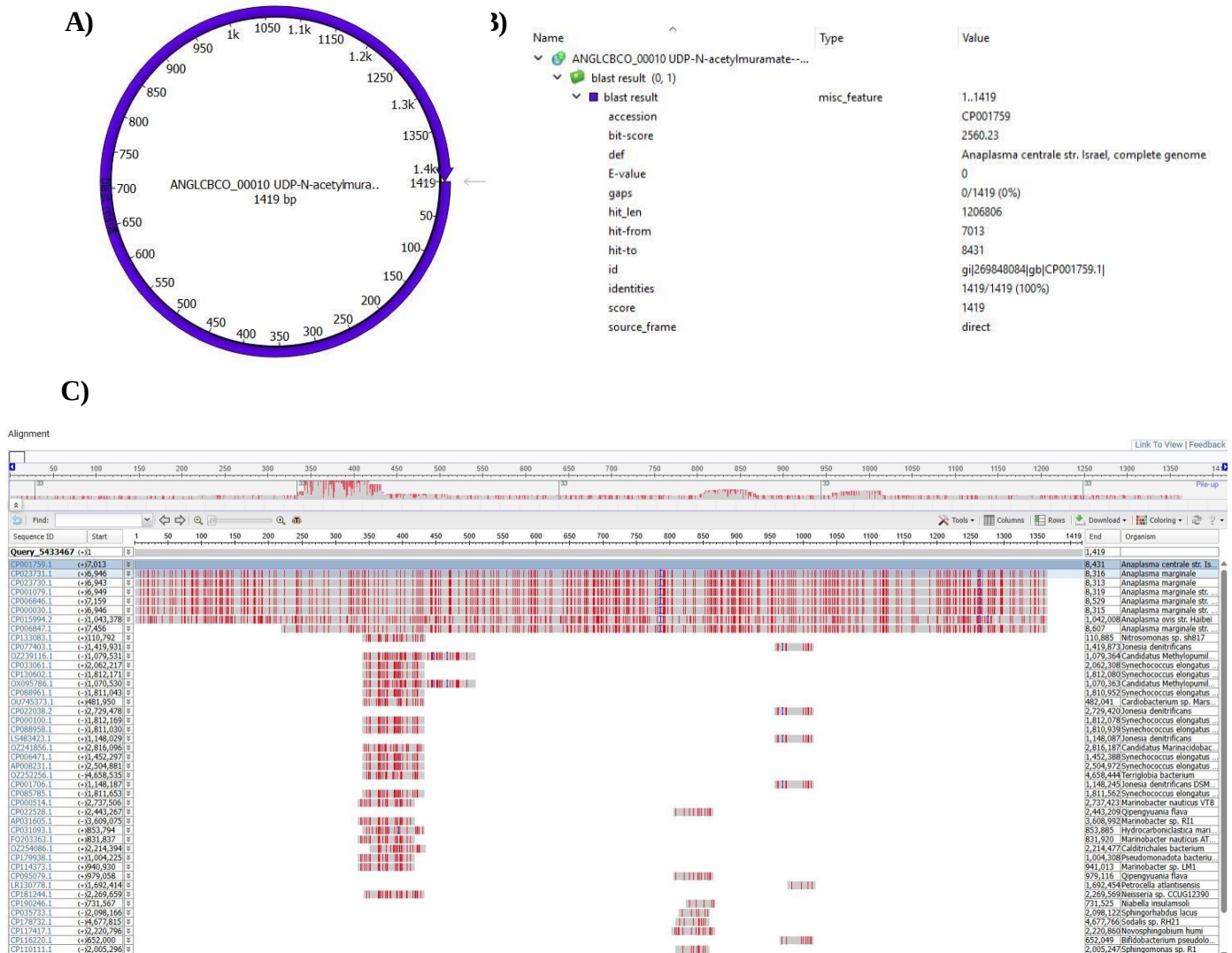
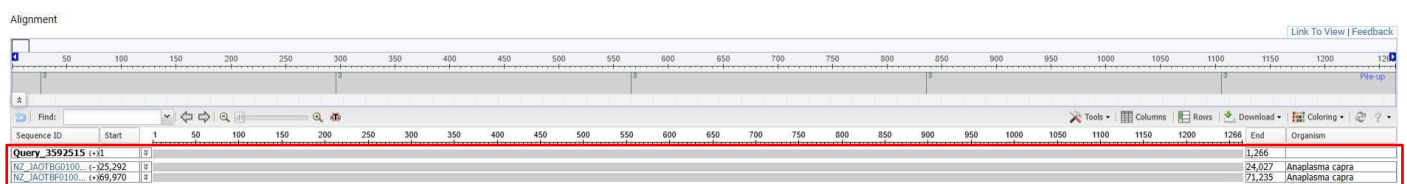


Figura 46(A-B-C). Visualización del resultado del blastn en el programa Ugene del gen que codifica la proteína UDP-N-acetilmuramato--L-alanina ligasa es 100 % de identidad y 100% de cobertura de *Anaplasma centrale*. Se muestra la visualización de blastn de ncbi mostrando como la secuencia del gen de UDP-N-acetilmuramato--L-alanina ligasa es exclusiva de *Anaplasma centrale*.

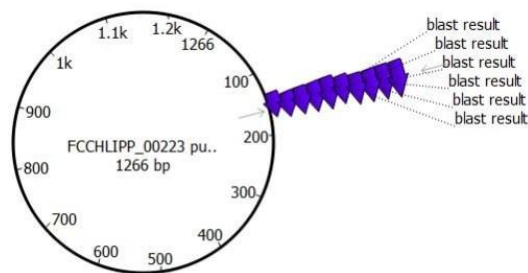
Marcador molecular de la especie *A. capra*

Para el marcador molecular de la especie *A. capra* se seleccionó un gen que se conserva casi al 100% con esta especie y fue el gen que codifica la proteasa de zinc putativa (**Figura 47A**), se le atribuyen funciones hipotéticas relacionadas con la virulencia y el procesamiento de proteínas tanto propias como del hospedero, al hacer el segundo blastn con Ugene se observó que sólo comparte 3% de cobertura y 97.14% de identidad, algo muy insignificante (**Figura 47B-C**). Al igual que las otras se diseñaron sus oligonucleótidos internos y externos.

A)



B)



C)

Type	Value
Misc. Feature	136..173
	CP092348
	55.3526
	Rhizobium sp. C104 chromosome, complete genome
	0.0232218
	0/38 (0%)
	4541038
	1381259
	1381222
	gij2197835918[gb CP092348.1]
	36/38 (94.74%)
	30
Misc. Feature	complement
	142..176
	XM_063460500
	57.156
	PREDICTED: Pelmatolapia mariae peptidase, mitochondrial processing subunit beta (pmpcb), mRNA
	0.00665315
	0/35 (0%)
	1587
	297
	331
	gij2689188795[ref XM_063460500.1]
	34/35 (97.14%)
	31
	direct

Figura 47(A-B). Visualización del resultado del blastn en el programa NCBI del gen que codifica la proteína proteasa de zinc putativa que se conserva en las dos cepas de *Anaplasma capra* que se tienen reportados, la segunda imagen muestra un blastn con el programa Ugene en el cual muestra que se comparte un 3% de cobertura con otras bacterias.

Figura 48(A-B). Resultados de BLASTn en UGENE y NCBI que demuestran la conservación del gen que codifica la subunidad α de la RNAtRNA ligasa de fenilalanina en *Anaplasma phagocytophilum*, propuesto como marcador molecular.

Marcador molecular de la especie *A. bovis*

Para el marcador molecular de la especie *A. bovis* se seleccionó un gen que se conserva al 100% de identidad y cobertura con esta especie (**Figura 49A-B**) y fue el gen que codifica la proteína GTPasa MnmE de modificación de RNAt encargada en la homeostasis proteica, siendo un posible blanco para estudiar mecanismos de virulencia y supervivencia dentro del huésped. Al igual que las otras se diseñaron sus oligonucleótidos internos y externos (**Figura 49-C**).

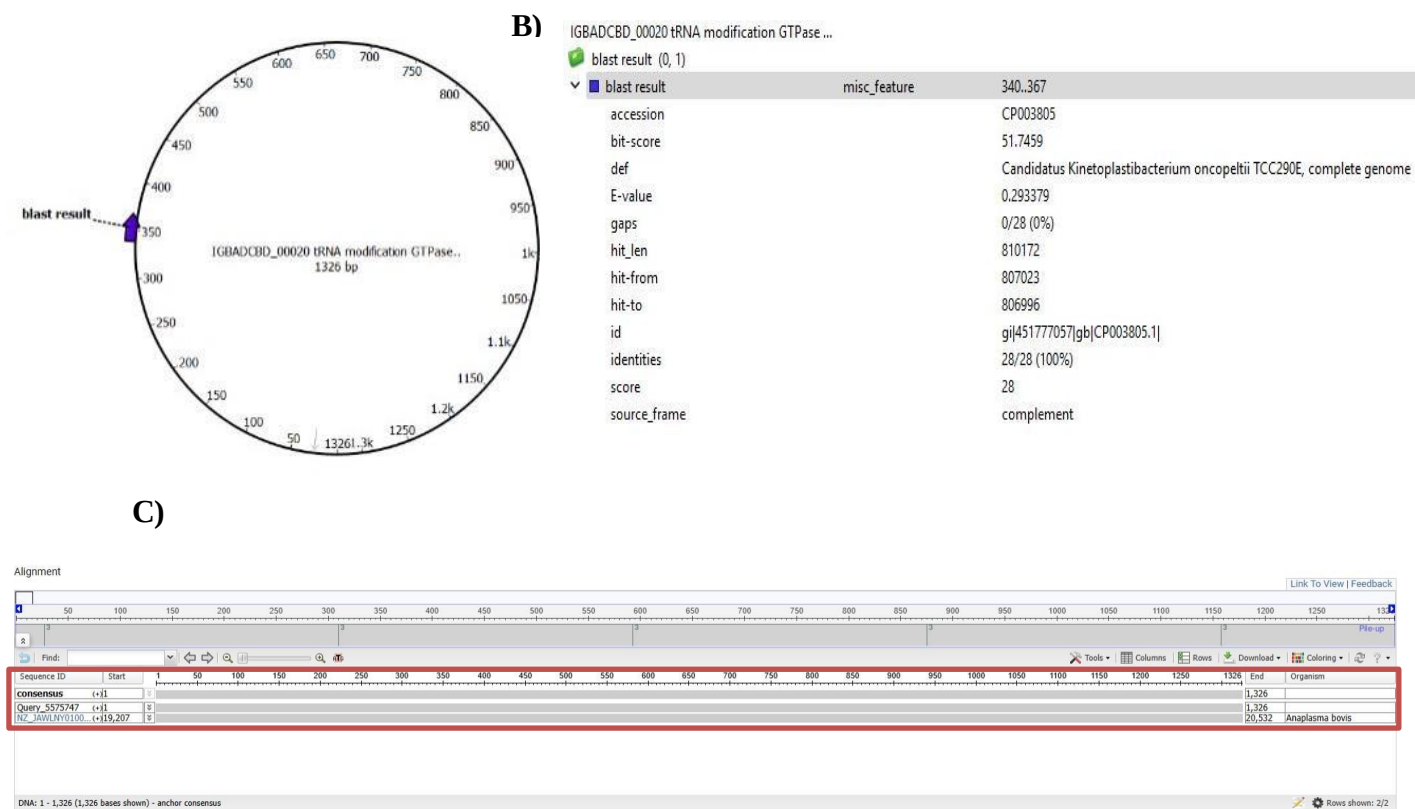


Figura 49(A-B-C). Visualización del resultado del blastn con el programa Ugene indicando que el candidato a marcador molecular de *Anaplasma bovis* se conserva en una región muy pequeña con *Candidatus kinetoplastibacterium oncopeltii* 5% de cobertura y 82.26% de identidad, en el blastn de NCBI se observa como este gen se conserva con un 100% de identidad y 100% de cobertura a *Anaplasma bovis*

Marcador molecular de la especie *A. platys*

Para el marcador molecular de la especie *A. platys* se seleccionó un gen que se conserva al 100% de identidad y cobertura (**Figura 50A-B**) específica con esta especie, cuando lo comparamos con otras especies se conservan del todo, nuestro candidato a marcador molecular para *A. platys* fue el gen que codifica la proteína glicil-tRNA sintetasa (GlyRS) en su forma bacteriana es un heterotetrámero $\alpha_2\beta_2$ en el que la subunidad β desempeña un papel esencial de reconocimiento y unión al tRNA-Gly, complementando la función catalítica de la subunidad α . Al igual que las otras se diseñaron sus oligonucleótidos internos y externos (**Figura 50C**).

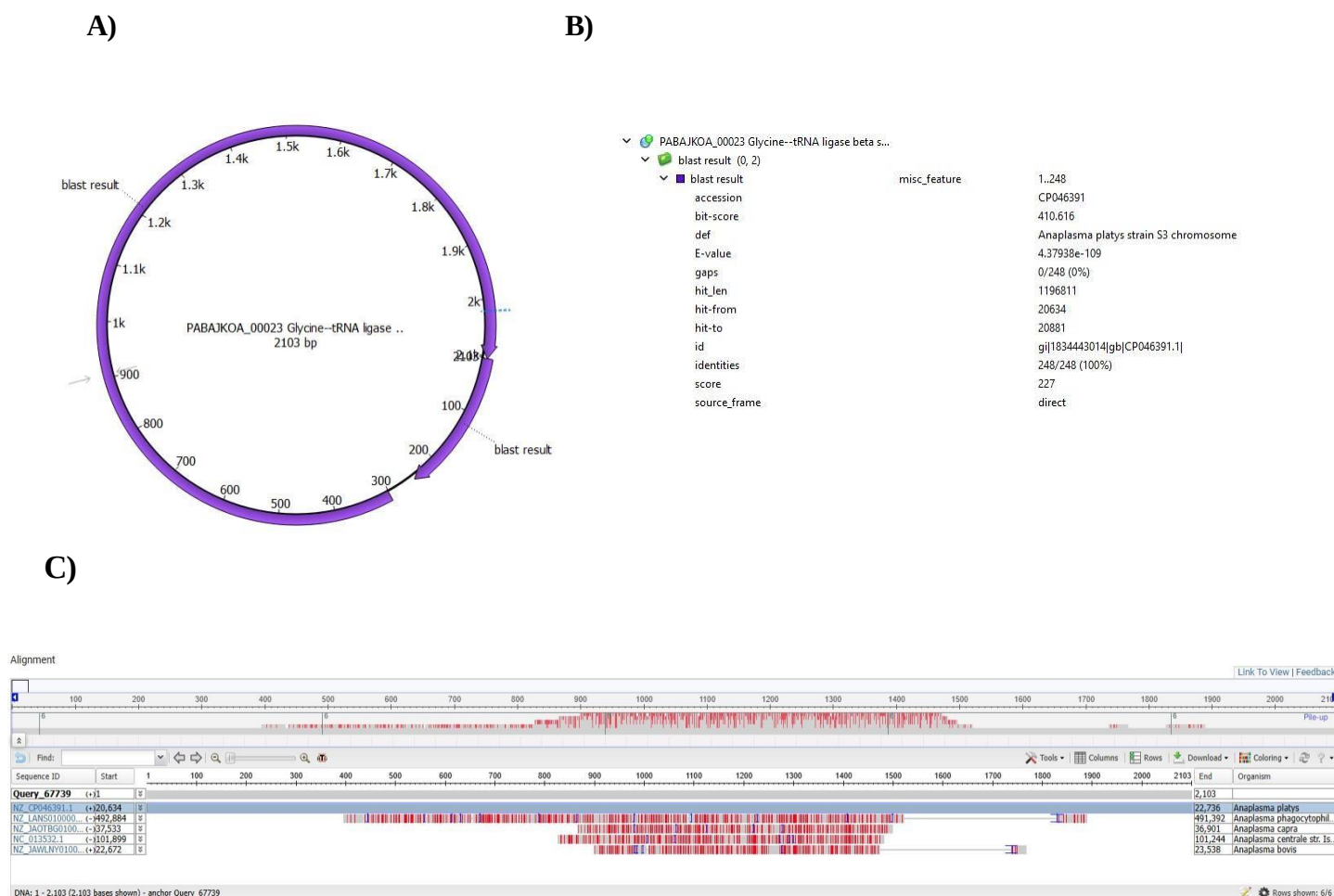


Figura 50(A-B-C). Visualización del resultado del blastn con el programa Ugene indicando que el candidato a marcador molecular de *Anaplasma platys* al 100% de identidad y cobertura, en el blastn de NCBI se observa como este gen se conserva con un 100% de identidad y 100% de cobertura a *Anaplasma platys*.

Marcador molecular de la especie *C. anaplasma sp*

Para el marcador molecular de la especie *C. anaplasma sp* se seleccionó un gen que se conserva al 100% de identidad y cobertura específica con esta especie. Al hacer un blast para compararlo con otras bacterias reportadas en la base de datos, su similitud con *A. phagocytophilum* fue de 8% de cobertura y 86.49% de identidad (**Figura 51A-B**), siendo así un buen candidato como marcador (**Figura 51C**).

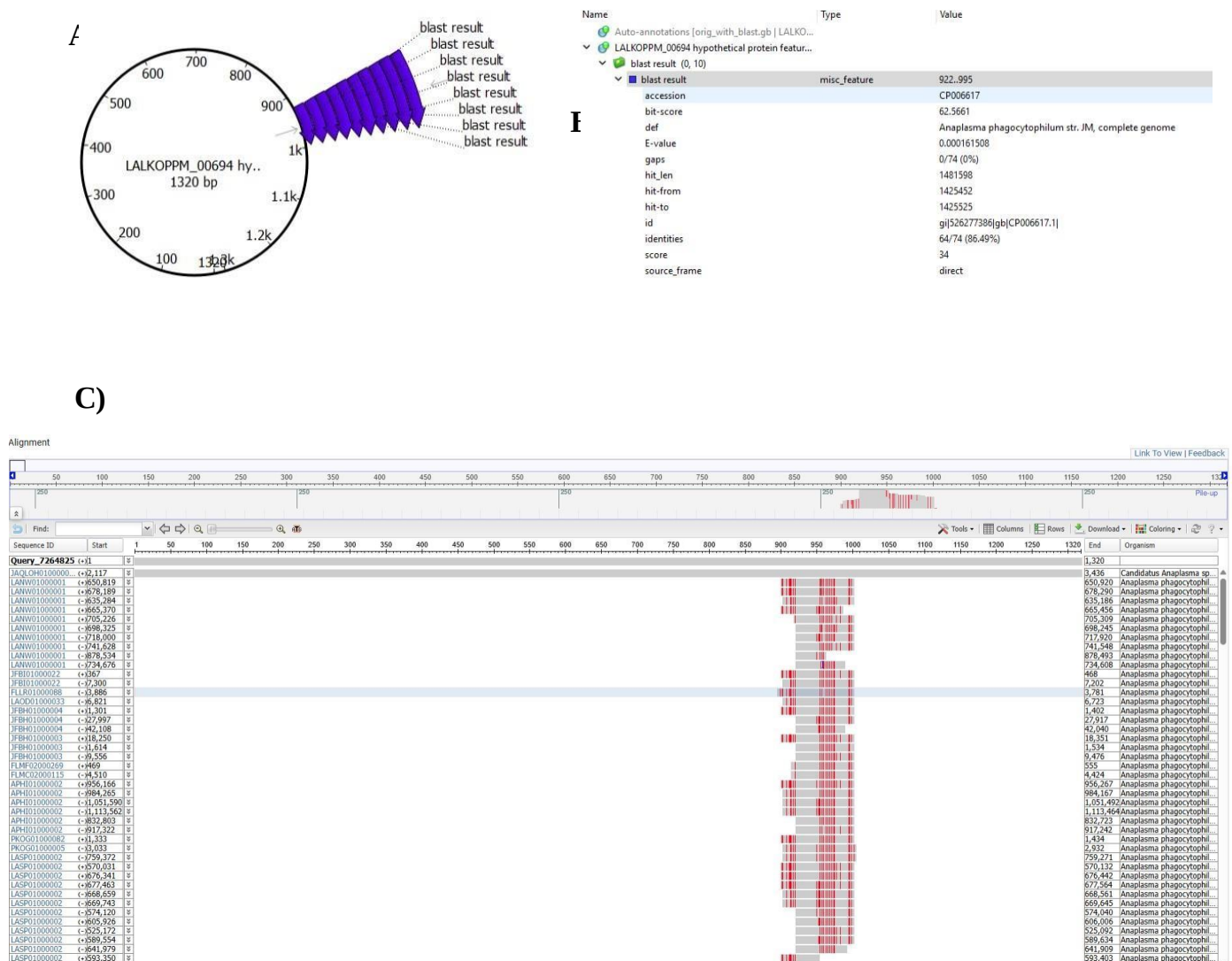


Figura 51(A-B). Visualización del resultado del blastn con el programa Ugene indicando que el candidato a marcador molecular de *Candidatus anaplasma sp* se conserva en un 8% de cobertura y 86.49% de identidad, bastante bajos, en la otra imagen se observa un resultado similar con NCBI, mostrando como este gen es específico de *Candidatus Anaplasma sp*. Dando un 100% de cobertura y 100% de identidad.

Marcador molecular de la especie *Aplasma endosymbiont of Hyalomma asiaticum*

Para el marcador molecular de la especie *Aplasma endosymbiont of Hyalomma asiaticum* se seleccionó un gen que se conserva al 100% de identidad y 100% de cobertura específica con esta especie. La proteína elegida fue folilpoliglutamato (FolC), la cual, en bacterias del género *Anaplasma* se asocia con FolP (dihidropteroato sintasa) y FolE (GTP ciclohrolasa I), formando parte de la ruta de biosíntesis de folato. Esta vía metabólica está relacionada con la producción de nucleótidos y metionina, compuestos esenciales para la proliferación y virulencia bacteriana. Al hacer un blast para compararlo con otras bacterias reportadas en la base de datos, su similitud fue insignificante con *A. phagocytophilum* con un 8% de cobertura y 86.49% de identidad, siendo así un buen candidato como marcador. Al ser una especie nueva, cuando se intentó hacer un blast con el programa Ugene pero no se obtuvieron resultados, solo en el blastn de NCBI (Figura 52).

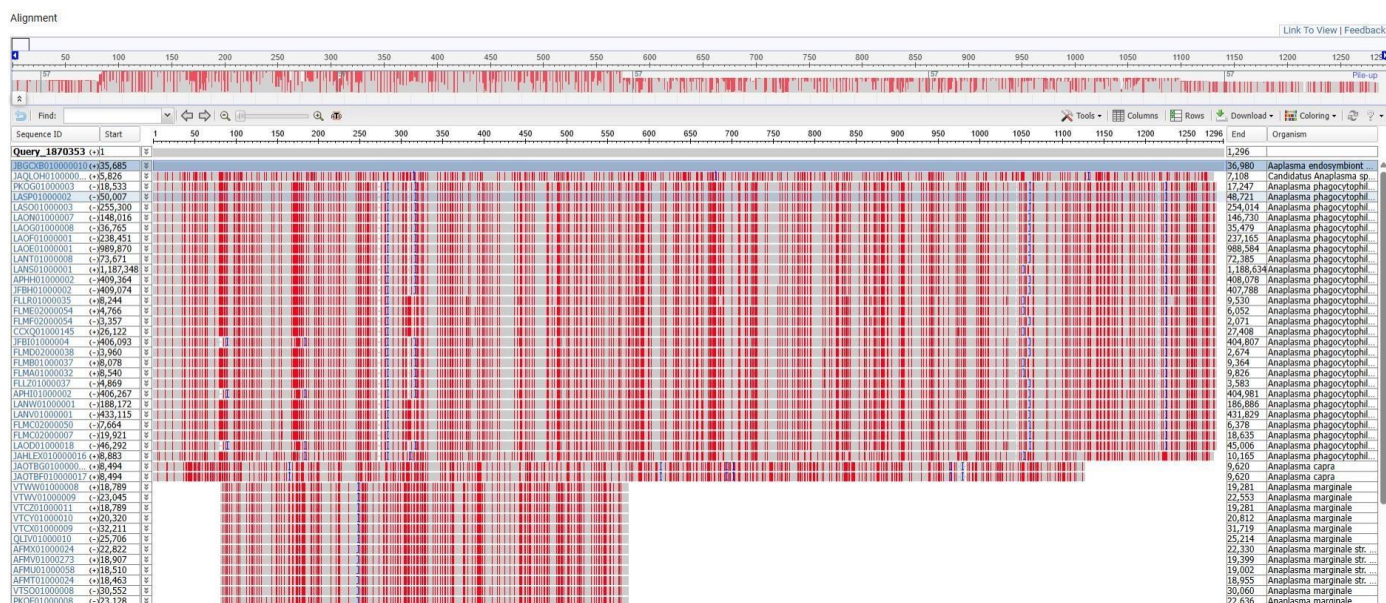


Figura 52. Visualización del resultado del blastn con el programa Ugene indicando que el candidato a marcador molecular de *Candidatus anaplasma sp* se conserva en un 8% de cobertura y 86.49% de identidad, bastante bajos, en la otra imagen se observa un resultado similar con NCBI, mostrando como este gen es específico de *Candidatus Anaplasma sp*. Dando un 100% de cobertura y 100% de identidad.

Tabla de los diseños de primers externos e internos para la PCR anidada.

Tabla 7. Diseño de oligonucleótidos iniciadores (primers) para la amplificación específica a nivel de género (*Anaplasma*), grupo eritrocítico y especie (*A. marginale*, *A. ovis* y *A. centrale*). Se indican las secuencias en sentido forward (F) y reverse (R), tamaño (pb), porcentaje de contenido GC y temperatura de alineamiento (Tm) calculada para cada par de iniciadores.

Género	Primer interno	Tamaño	%GC	Tm
Género <i>Anaplasma</i>	F: ATGGACTCCCTTAGTTTGTG	22	45.5 %	62.2 °C
	R: ATCCAGCCCAAATATCAGC	20	45 %	60.4 °C
	Primer externo			
	F:AATATGCACTGGTGGTGGT	20	45 %	62.2 °C
	R:GGCACTACACTCATAACACG	20	50 %	60.2 °C
Grupo	Primer interno			
Grupo eritrocito	F: GTTCATTGCAAGGATGGGTC	21	47.6 %	61.8 °C
	R: TCCTTTGCAACGACGTAATG	20	45 %	60.9 °C
	Primer externo			
	F: AGTATAGGTCGTCCGGCGT	20	60 %	66.5 °C
	R:CCGAGGTTAGCTCCTAACAT	20	50 %	60.8 °C
Especie	Primer interno			
<i>Anaplasma marginale</i>	F: CATTGCTTTTGAAGGGGAA	20	40 %	59.4 °C
	R:GTGGCGTCTATCCCAGACAT	20	55 %	63.4 °C
	Primer externo			
	F: TGAACGAGGACTTAATCTGC	20	45 %	59.6 °C
	R:TGCTAAATCCACTATGGTGG	20	45 %	59.5 °C
Especie	Primer interno			
<i>Anaplasma ovis</i>	F:ACTGTTTCCCACAAAGGTGC	20	50 %	63.2 °C
	R:TAACAAGCCAAGTGACAGC	20	50 %	63.4 °C
	Primer externo			
	F:GCTCCGCGTTTTGTGGTGA	20	55 %	65.2 °C
	R:TATCTCGCTTGCTCTGTGCA	20	50 %	63.6 °C
Especie	Primer interno			
<i>Anaplasma centrale</i>	F: CTTCGCTACTGGGCAACAAT	20	50 %	62.4 °C
	R:TTACGCCCATGAAGTTTCC	20	45 %	60.8 °C
	Primer externo			
	F:TTGCTGAACTGCTTCTGCTG	20	50 %	63.1 °C
	R:CGCAATAAAGCAGCTGGTAA	20	45 %	61.1 °C
Especie	Primer interno			
<i>Anaplasma capra</i>	F:AAGGGCACAACAACAGGTC	20	50 %	63.2 °C
	R:TGCAGCACAACGTTCTTTTC	20	45 %	61.9 °C
	Primer externo			
	F: TCACCATCTCTGCAAATCC	20	50 %	62 °C
	R: ACAGTGGCGTTGTACGCATA	20	50 %	62.5 °C
Especie	Primer interno			
<i>Anaplasma phagocitophilum</i>	F:TTGCTTAAGGACGCACACG	20	50 %	62.4 °C
	R:ATCGCTGCCAACGTATAACC	20	50 %	62.5 °C
	Primer externo			
	F:GTCTTGCAATGCAAAGTCTCG	20	50 %	61.7 °C
	R: GAAACTCCGTGCATGAACTC	20	50 %	61 °C
Especie	Primer interno			
<i>Anaplasma bovis</i>	F:CATATTTGTGGACACTGCCG	20	50 %	61.2 °C
	R:TCATCAGCCTTGCTCAACAC	20	50 %	62.7 °C
	Primer externo			
	F:TGTGGGGCTGGATAATGTG	19	52.6 %	61.7 °C
	R:ATGGCAAAATGCCACATACC	20	45 %	61.5 °C
Especie	Primer interno			
<i>Anaplasma platys</i>	F:AAAGGCAAAAGATGCGAGA	20	40 %	60.9 °C
	R:TATCAAGACGCCATCCATGA	20	45 %	61 °C
	Primer externo			
	F:GATTGGAGTGAATGAACGAGC	21	47.6 %	61.2 °C
	R:AACAAAACAGGCCCACTACT	21	47.6 %	64.2 °C
Especie	Primer interno			
<i>Candidatus Anaplasma sp</i>	F:TCTGAACATCGTGACCTTGC	20	50 %	62.3 °C
	R:TCCAGTCAAATCTATCCGCC	20	50 %	61.4 °C
	Primer externo			
	F: TAATGGCGTCGCGTAAGAAG	20	50 %	62.3 °C
	R:CCTGGTGACTTAGTACCTTG	20	50 %	59.1 °C
Especie	Primer interno			
<i>Anaplasma endosymbiont of hyalomma asiaticum</i>	F:TACGCTCCACATCTGTTAG	20	45 %	58.4 °C
	R:TTTCGCGCAACGCCACTCTT	20	55 %	67.5 °C
	Primer externo			
	F:GGCGTGTGTTGCTGTTCTTT	20	50 %	63.8 °C
	R:GCCAGGCCCAATTAACAATGA	20	50 %	62.9 °C

Posterior a los análisis *in silico* mediante alineamientos por BLAST, los oligonucleótidos candidatos fueron evaluados utilizando OligoAnalyzer para determinar la presencia de estructuras secundarias potenciales, incluyendo hairpins, homodímeros y heterodímeros, así como para analizar sus parámetros termodinámicos (ΔG), contenido de GC y temperatura de alineamiento (TM). Con base en estos criterios, se seleccionaron los primers con mayor estabilidad, especificidad entre pares forward y reverse tanto interno como externos para su validación experimental. La **tabla 7** presenta los primers finales diseñados para la amplificación específica a nivel de género, grupo y especie. Se incluyen las secuencias en sentido (F) y (R), el tamaño del amplicón esperado (pb), el porcentaje de contenido de GC y la temperatura de alineamiento (Tm), calculada para cada uno.

TOMA DE MUESTRA

Para la validación de los oligos sintetizados, se recolectaron y procesaron muestras de sangre de ganado bovino provenientes de distintas granjas del estado de Morelos, específicamente en los municipios de Temoac, Zacualpan de Amilpas y Cuernavaca. Las muestras se obtuvieron por punción de la vena coccígea (ubicada en la base de la cola del animal). Durante la recolección, se registraron datos como edad, sexo y fecha de muestreo.

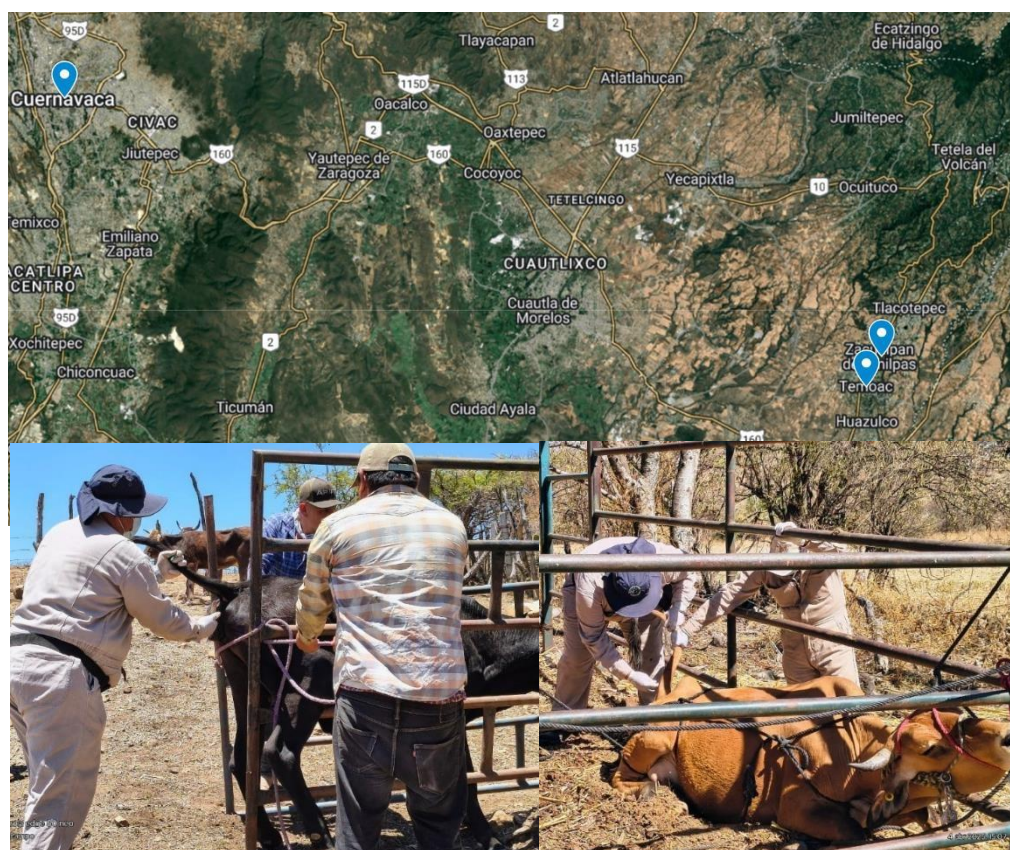


Figura 53. Localización geográfica de las granjas muestreadas en el estado de Morelos (Temoac, Zacualpan de Amilpas y Cuernavaca) y registro del procedimiento de toma de muestras en ganado bovino. La sangre se obtuvo por punción de la vena coccígea para la validación de los oligonucleótidos sintetizados. Se registraron edad, sexo y fecha de muestreo.

Extracción de DNA

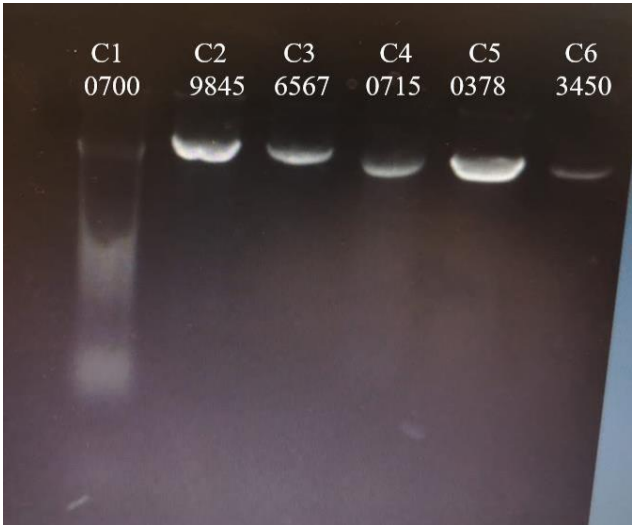


Figura 54. Gel de electroforesis de las muestras de ADN extraído. Los carriles corresponden a: C1 (0700), C2 (9845), C3 (6567), C4 (0715), C5 (0378) y C6 (3450). Se observa una banda intensa y definida en la mayoría de las muestras, lo que indica ADN íntegro y de buena calidad. En el carril C1 (0700) se aprecia fragmentación del ADN, evidenciada por un patrón difuso, lo que sugiere degradación parcial del material genético. Las muestras restantes presentan bandas compactas en la región de alto peso molecular, indicando adecuada integridad del ADN para análisis posteriores.

La extracción de DNA de las muestras sanguíneas se llevó a cabo mediante el método tradicional de fenol-cloroformo. En el gel resultante, las seis muestras muestran bandas de tamaño similar, salvo en el primer carril, donde el DNA se presentó fragmentado. No se utilizó marcador de peso molecular, ya que el objetivo era únicamente confirmar la presencia o ausencia del DNA aislado.

En el primer carril C1, se aprecia una banda difusa que se extiende desde el pozo hacía abajo por la fragmentación del DNA, de los carriles C2-C5 se muestra DNA intacto de alto peso molecular, mostrando bandas a la misma altura, lo que sugieren un tamaño comparable y definido con las extracciones de DNA, el C6 es una banda más delgada, pero a la misma altura de las demás.

Además de la visualización de DNA en luz UV

en gel de agarosa al 1%, también se cuantificó la pureza del DNA mediante espectrofotometría (NanoDrop), evaluando las relaciones de absorción 260/280 nm (indicador de proteínas) y 260/230 nm (indicador de contaminantes como fenol y sales).

Tabla 8. Concentración y pureza del ADN extraído de las muestras analizadas. La pureza del ADN se evaluó mediante las relaciones de absorbancia 260/280 y 230/260. El cociente 260/280 permite estimar contaminación por proteínas, considerándose valores cercanos a 1.8 como indicativos de ADN puro. El cociente 230/260 evalúa contaminación por compuestos orgánicos y sales, donde valores cercanos a 2.0 –2.2 indican mayor pureza. En esta tabla, las muestras 9845 y 0715 presentan valores de 260/280 más cercanos al óptimo, mientras que la muestra 0715 muestra el mejor valor en 230/260, sugiriendo mejor calidad general del ADN. En contraste, la muestra 0878 presenta los valores más bajos, lo que podría indicar mayor presencia de contaminantes.

Muestra	Concentración	260/280	230/260
0700	63.3	1.58	1.365
9845	93.4	1.72	1.41
6567	78.5	1.63	1.62
0715	229.3	1.72	1.94
0878	30.6	1.6	1.28
3450	40.7	1.55	1.38

DISCUSIÓN

Caracterización genómica

Se hizo una búsqueda de los genomas reportados de las especies del género *Anaplasma*. La base de datos Europea ENA proporcionaba la mayor cantidad de información, pero el acceso a detalles específicos de sus características era limitado. Por lo que se eligió la base de datos de NCBI. En el año 2025 se obtuvieron un total de 73 genomas disponibles, los cuales se clasificaron por especie y tipo de ensamblaje. En febrero del 2024 se presentó el primer ensamblaje del genoma de la especie *A. bovis*, complementando así el género *Anaplasma*, que fué incluido en este análisis. Posteriormente se llevó a cabo su caracterización genómica, utilizando el programa Quast versión 3.0, obteniendo su contenido de GC estando entre el 41.68% y 49.98%, siendo el más alto *A. centrale* y el más bajo *A. phagocytophilum*, al comparar el porcentaje de (GC%) vs el tamaño del genoma (Mpb), se observa que el grupo de los eritrocitos se mantienen relativamente juntos, siendo *A. centrale* más cercano con *A. marginale* y *A. ovis* más cercano con *A. capra*, confirmando que tienen características bastantes similares en este grupo.

A. phagocytophilum fue el más alejado de todas las especies, siendo la más diversa, teniendo el tamaño de genoma más alto, pero con el porcentaje de GC (%) más pequeño de todo el Género.

Generalmente tanto el tamaño del genoma y el contenido de GC (%) del Género *Anaplasma* es pequeño en comparación de una bacteria de vida libre, no presenta plásmidos, profagos intactos ni elementos transponibles, también se caracterizan por ser intracelulares lo que las limita interaccionar con otras bacterias ocasionando la pérdida de un gran número de genes, la producción de pseudogenes y la reducción de tamaño del genoma (Han XY, Du LF, Lin ZT; *et al* 2024). Otro análisis realizado para la caracterización fue a través del programa Prokka, una herramienta para identificar las secuencias codificantes por especie, y se determinó que los genes identificados estaban relacionados con la replicación, transcripción y traducción de proteínas, se identificaron secuencias repetidas, los rRNA, tRNA y tmRNAs por lo que indica que esta bacteria su única función es invadir, infectar y replicarse, siendo un parásito obligado.

Basándonos en el análisis filogenético con *A. bovis* (Han et al., 2024) utilizando la secuencia ortóloga de copia única, se identificaron dos clados. El primer clado incluía *A. capra*, *A. centrale*, *A. ovis* *A. marginale* especies que infectan eritrocitos.

El segundo clado estaba conformado por *A. bovis*, *A. platys* y *A. phagocytophilum*, que infecta a los leucocitos y plaquetas.

En este estudio, se clasificó el género según el tipo de célula que infectada: el primer grupo infecta eritrocitos, el segundo leucocito (monocitos y neutrófilos), el tercero, plaquetas.

También se incluyó el genoma *Candidatus Anaplasma sp* (GCA_028204095.1) aunque aún no se ha determinado qué células que infecta. Se requieren más estudios para clasificar esta especie ya que la información disponible es limitada.

Hospederos

Una comprensión detallada de la base de la especificidad del hospedero puede proporcionar información importante sobre la patogénesis molecular, la evolución de los patógenos y el potencial de los patógenos para infectar nuevos huéspedes es bien conocido que las especies patógenas pueden infectar a múltiples hospederos, pero algunos están altamente adaptados a una sola especie del hospedero (Bäumler A, Fang FC; 2013). Al analizar sus principales hospederos reportados en el género *Anaplasma*, se observó que las especies infectan son animales del sector pecuario y animales domésticos, sin embargo, actualmente ya se tiene reportes de que este género está infectando a nuevos hospederos a tal punto de nombrarse potenciales patógenos zoonóticos (Shi et al., 2019). En *A. phagocytophilum* se mantiene dentro de las poblaciones de garrapatas por transmisión transestadial y/o, por lo tanto, las garrapatas pueden albergar múltiples cepas de *A. phagocytophilum* que difieren en virulencia y transmisibilidad. (Crosby FL, Eskeland S, Bø-Granquist EG, et al., 2022).

Conocer los hospederos es muy útil para comprender mejor a estas bacterias, ya que estas bacterias se tenían reportado que infectaba sólo al sector pecuario y a pesar de ser una bacteria intracelular y tener limitaciones tanto nutricionales como de interacción, aun así, han demostrado tener una alta adaptación y capacidad de evadir el sistema inmune de otras especies ajenas al sector pecuario ampliando su rango de hospedero incluyendo los humanos.

Por lo que es importante la identificación de marcadores moleculares altamente específicos para su detección y la identificación de proteínas patógenas que ayude a servir de blancos para su tratamiento y prevención.

Distribución geográfica del género *Anaplasma* a nivel mundial

Conocer la distribución geográfica de estas bacterias patógenas es crucial para la salud pública, ya que permite predecir y controlar brotes de enfermedades infecciosas, su presencia puede estar influenciada por factores como el clima, la composición del suelo, el uso de antibióticos en ciertas regiones y la práctica agrícola, al estudiar estos factores geográficos y ambientales ayuda a implementar medidas de control preventivas (Mukherjee R, Vidic J, Auger S, *et al.*, 2023).

Las enfermedades transmitidas por vectores de los animales de compañía son causadas por parásitos, bacterias o virus transmitidos por la picadura de artrópodos hematófagos (principalmente garrapatas y mosquitos). A nivel mundial, las enfermedades transmitidas por vectores más importantes incluyen anaplasmosis, ehrlichiosis, borreliosis y dirofilariosis (Bedoya F, Beugnet F, Tobias E, *et al.*, 2022). La capacidad de infectar a un huésped o de ser transferido a través de un vector como las *Rickettsias*, ofrece vías alternativas para la persistencia y propagación de microorganismos (Evans AS; 2009). En la distribución global de diferentes especies del género *Anaplasma* representa únicamente los genomas reportados y depositados en las bases de datos públicos, lo cual es bastante limitado para determinar la distribución real del género *Anaplasma*.

Tal es el caso de México el cual se tiene reportes de infección de *A. platys* y *A. phagocytophilum*, pero sólo se tienen genomas ensamblados de *A. marginale*, y probablemente esto pase lo mismo a nivel mundial, por lo que la ausencia de genomas para estas especies resalta la necesidad de fortalecer y enriquecer la identificación de estos genomas y conocer sus hospederos, su capacidad de infectar, sus ciclos de transmisión y potencial impacto en la salud animal y humana (Rojero-Vázquez *et al.*, 2017; Jeréz-Sulvarán *et al.*, 2024).

Se puede observar que la especie *A. phagocytophilum* es la que está más ampliamente distribuida a nivel mundial y evolucionan en un contexto regional (Crosby *et al.*, 2022). *Anaplasma marginale* se tiene reportado en América del norte y Central y el resto se encuentra en Asia y Oceanía, adicionalmente también se tienen reportes de especies de *Anaplasma* en África, pero no existe algún tipo de ensamblaje de su genoma en las bases datos actualmente, es decir que el género *Anaplasma* está prevalente por todas partes del mundo y faltarían más estudios acerca de futuros ensamblajes de estos genomas y su distribución geográfica (Kolo, 2023).

Genómica comparativa e Identificación de marcadores moleculares

En la mayoría de los casos, un sólo genoma no cubre satisfactoriamente toda la variabilidad genética presente dentro de una especie bacteriana, por ello, en este trabajo se empleó un análisis pangenómico, analizando múltiples especies del Género *Anaplasma* permitiendo obtener marcadores moleculares específico y así contribuir al desarrollo de métodos diagnósticos más precisos, rápidos y rentables para el tratamiento oportuno en las infecciones (Karlsson R, Gonzales-Siles L, Gomila M et al., 2018). En este estudio, se llevaron a cabo varios análisis pangenómicos, uno a nivel de género *Anaplasma*, por especie y otros dos por grupo de célula infectada. En el pangenoma a nivel de género, se pudo identificar un sólo gen que se compartía entre todas las especies, al identificar este gen se trataba de una enzima ATP sintasa subunidad C cuya función está involucrada en el transporte de protones (H^+) a través de la membrana (Herndon DR, Palmer GH, Shkap V et al; 2010). Sin embargo, este gen podría ser un candidato potencial como marcador molecular a nivel de género, más adelante se esperan identificar más genes con potencial de marcador molecular a nivel de grupo, especie y cepa.

El hecho de que sólo se ha encontrado un gen en el pangenoma podría deberse a que estas especies infectan a diferentes tipos de célula y los genes accesorios le podría dar cierta variabilidad, además que, en el caso de bacterias, varios estudios han demostrado que la mayoría de los genes del pangenoma están ausentes en muchas cepas, lo que sugiere que la heterogeneidad de las especies es relativamente común (Donati C, Hiller NL, Tettelin H; et al., 2010).

En el pangenoma del grupo de los eritrocitos se identificó un core de 23, mucho más grande que el del género, por lo que comparten más genes en común, en el grupo de los leucocitos sólo se tuvo un core de 2, esto puede ser por que la especie *A. phagocitophilum* infecta a los neutrófilos y *A. bovis* a los monocitos, también puede deberse a que infectan a diferente hospedero y tienen diferente vector.

En el análisis de ANI para validar la taxonomía de las especies *Anaplasma*, los parámetros utilizados del valor de ANI para determinar a qué especie pertenecía era mayor de 95%. Se identificó un genoma a nivel scaffold de la especie *A. ovis* con acceso a GenBank GCA_002849345.1, al compararlo con el *A. ovis* a nivel de ensamblaje completo dió un valor de 87% idéntico, sin embargo era 99% idéntico a un *A. marginale* GCA_000020305.1, esto quiere decir que probablemente estuviera mal clasificado, por lo que fué descartado en los análisis pangenómicos, a pesar de que el genoma se encontraba en una base de datos reconocida, este descubrimiento nos confirma la importancia de los analizar la calidad y validación taxonómica de los genomas obtenidos e identificar posibles errores que puedan repercutir en futuros estudios. En el caso de *Candidatus Anaplasma sp*, con valor de ANI más alto era con la especie *A. marginale* con un valor casi del 89% de identidad y en el análisis de presencia y ausencia es muy cercano a *A. platys*, por lo que se sugiere que sea otra especie y se espera que con los análisis filogenéticos permita definir a qué grupo podría pertenecer.

A. capra sólo tenía dos genomas, al compararse entre ellas dió un valor de identidad de 99%. Los genomas de *A. marginale* dieron un valor mayor de 95% de identidad, y de los 29 genomas *A. phagocytophilum* 28 tuvieron un valor mayor del 95%.

En este estudio se le dio más importancia el ANI basado en MUMmer (ANIm) ya que este no fragmenta el genoma, no requiere el corte previo de los genomas en pedazos ni el tamizado de genes ortólogos compartidos, utiliza alineamientos exactos a nivel de nucleótido, siendo mucho más rápido que ANIb y exacto.

Identificación de las proteínas relacionadas con la patogenicidad, resistencia a antibióticos y evasión del sistema inmune

Un patógeno se define como un organismo que causa una enfermedad a su huésped, y la gravedad de los síntomas de la enfermedad se conoce como virulencia. En este análisis se enfocó en la identificación de proteínas patógenas en base a su genoma del género *Anaplasma*, normalmente los patógenos obligados tienden a estar muy adaptados a sus hospedadores, con mecanismos sofisticados para sincronizar sus ciclos de vida con el de estos últimos y la capacidad de manipular el sistema inmunológico, el metabolismo e incluso el comportamiento de estos (Balloux F, van Dorp L; 2017). Con la herramienta PathogenFinder versión 1.1 (<https://cge.food.dtu.dk/services/PathogenFinder/>) identifica proteínas que son patógenas en el ser humano, en el caso de *A. pagocitophylum* uno de sus principales hospederos es el humano, de estos genomas fue el que obtuvimos más de 200 resultados, con la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/help/publications>) se identificaron la funcionalidad de estas proteínas y se encontró que algunas están relacionadas con la secreción de factores de virulencia como son del tipo IV, (resultados similares se obtuvieron con la herramienta VFDB), translocasa preproteica (SecD, SecE y SecY), los sistemas de secreción permiten a los patógenos exportar toxinas y efectores virulentos, dañando las células del hospedero.

Se encontraron proteínas involucradas con la división celular y replicación de DNA, como la polimerasa III alfa, proteína de reparación DNA mutS, topoisomerasa I de DNA, DNA primasa, helicasa de DNA de la unión Holliday RuvA/B/C y Exodesoxirribonucleasa VII, estas proteínas participan en la replicación y reparación del DNA, procesos fundamentales para la replicación celular aumentando su infección. Otras proteínas estaban involucradas en el metabolismo y en la producción de energía como NADH deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, citrato sintasa, fumarato hidratasa, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y el isocitrato/isopropilmalato deshidrogenasa, estos procesos generan energía en forma de ATP, que es crucial para ciclos metabólicos como el ciclo de krebs y cadena de transporte de electrones.

Estas bacterias poseen mecanismos de defensa del hospedero, como las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por el sistema inmune, estos mecanismos involucran proteínas como FeS, glutamato-cisteína ligasa, glutamina sintetasa, proteínas antioxidantes de la familia AhpC/Tsa.

Se encontraron proteínas relacionadas con la traducción y síntesis de proteínas (Proteínas ribosómicas L1, L16, S5, por mencionar algunos, factores de iniciación de la traducción (IF-1, IF-2, IF-3), factores de elongación (Ts, P), sintetetas de RNA_t (isoleucil-, arginil-, glicil-RNA_t sinteteta), proteínas relacionadas con los procesos de membrana y transporte (transportadores ABC, transportador de magnesio, transportador ABC de fosfato, cotransportador de sodio:alanina) y proteínas involucradas a respuesta regulatoria y adaptación (proteína reguladora del nitrógeno, sensor histidina quinasa, reguladores transcripcionales (familia MerR, NusG) (Coudert E, Gehant S, de Castro E, *et al.*, 2023).

También se identificaron proteínas de división celular FtsA, proteína de división celular FtsZ, se tiene reportado que *A. phagocytophilum*, el sistema de división basado en FtsZ es característica de bacterias intracelulares y es fundamental para la división celular, sin embargo carece de peptidoglicano, esto se debe a que los productos de degradación de la pared celular de peptidoglicano altamente conservada presentan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) que son reconocidos por los receptores inmunes en su lugar incorpora colesterol de la célula huésped a sus membranas, lo que se cree que proporciona rigidez estructural a la célula y es necesario para que el organismo infecta las células diana, este sistema es un blanco potencial para inhibir su función bloqueando su división celular bacteriana y controlar infecciones (Harpring M, Cox JV; 2023).

De *A. marginale* sólo se identificaron proteínas patógenas, relacionadas con la síntesis de proteínas, replicación del DNA, producción de energía (factor sigma RpoD de la RNA polimerasa, proteína ribosómica S1, subunidad beta de la F1 ATP sintasa, subunidad beta de la ribonucleósido-difosfato reductasa, proteína ribosómica S3, proteína ribosómica S6, proteína HU de unión al DNA y cadena C de la F0 ATP sintasa).

En *A. bovis* solo se identificaron dos proteínas patógenas: proteína ribosómica S3 y proteína HU de unión al DNA.

En *A. platys* se identificaron proteínas de secreción de factores de virulencia como son del tipo IV, proteínas ribosomales (S3, S5s L7/L12, S6, S18), proteína HU de unión al DNA, cadena C de la F0 ATP sintasa, factor de elongación de la traducción P y chaperonina de 10 kDa. En *A. ovis* se identificaron cinco proteínas patógenas chaperonina de 10kDa, proteína HU de unión al DNA, cadena C de la F0 ATP sintasa, proteína ribosómica S3 y ribonucleósido-difosfato reductasa, subunidad beta.

En *A. centrale* se identificaron proteínas patógenas chaperonina de 10kDa, proteína HU de unión al DNA, cadena C de la F0 ATP sintasa, proteína ribosómica y ribonucleósido-difosfato reductasa, subunidad beta.

En *A. capra* se identificaron proteínas de secreción de factores de virulencia como son del tipo IV, proteínas ribosomales, proteína HU de unión al DNA y cadena C de la F0 ATP sintasa.

Finalmente, *Candidatus anaplasma sp.* se identificaron Ribonucleósido-difosfato reductasa, subunidad beta, Proteína ribosómica S3, Factor de elongación de la traducción P, Proteína ribosómica S5, Proteína, ribosómica L16, Proteína ribosómica S6, Proteína ribosómica S18, Proteína de unión al DNA HU, cadena C de la ATP sintasa F0.

Algo característico del género *Anaplasma* es que comparten proteínas patógenas en común, la proteína ABD43459 (proteína de unión al DNA HU) y ABD43781 (proteína ribosomal S3) se encuentran en todas las especies del género *Anaplasma* incluyendo *Candidatus Anaplasma sp.*

También se identificaron proteínas hipotéticas que serían de gran importancia estudiarlas. En la literatura mencionan que el género *Anaplasma* es un potencial emergente zoonótico, pero nunca se menciona cuales proteínas podrían ser las encargadas de invadir, sólo se conoce en *A. marginale* y en *A. phagocytophilum*, pero en el resto carecen de esta información. PathogenFinder identifica proteínas por CD-HIT-2D, reporta familias de proteínas asociadas a la patogenicidad, no todas están directamente relacionadas con la invasión, si no que identifica genes que son necesarios para sobrevivir y replicarse en el hospedero, calcula qué tan asociadas está a patógenos humanos vs no patógenos y le asigna un puntaje estadístico.

Por lo que estas proteínas facilitan la supervivencia, proliferación y virulencia del patógeno al cumplir funciones cruciales en la replicación del DNA, metabolismo, traducción de proteínas, secreción de factores de virulencia, resistencia al estrés y adaptación al entorno. Si se bloquean o inhiben, podría reducirse significativamente la capacidad de infección del patógeno y no sólo eso, la herramienta PathogenFinder predijo que todas las especies del género *Anaplasma* incluyendo el *Candidatus Anaplasma sp.*, son microorganismos patógenos humanos. Con base en la evidencia disponible, resulta más apropiado referirse a este agente no como un “potencial emergente zoonótico”, sino como un “patógeno zoonótico emergente reconocido”.

Resistencia a antibióticos

A pesar de que no se identificaron genes de resistencia a antibiótico, debido a que el género *Anaplasma* es una bacteria intracelular obligada, presenta una capacidad limitada para adquirir resistencia mediante transferencia horizontal de genes. No obstante, la aparición de resistencia en el futuro no puede descartarse, particularmente a través de mutaciones espontáneas (Hove P, Madesh S, Nair A, *et al.*, 2022).

Identificación de factores de Virulencia

A pesar de la continua evolución del genoma reductivo y la eliminación de la mayoría de los genes para el metabolismo intermediario y la biosíntesis de aminoácidos, *Anaplasma* también ha experimentado una expansión de genes que codifican varios componentes del aparato de secreción de tipo IV (T4S). Actualmente se conocen dos moléculas efectoras de T4S de *A. phagocytophilum* (Rikihisa Y, Lin M, Niu H; 2010). En *A. ovis* descubrieron que los genes que codifica a la proteína VirD4, esta proteína se une a la proteína ribosomal (RL12) de la garrapata *Dermcentor silvarum*, en donde determinaron una interacción proteína-proteína entre la bacteria y la garrapata funcionando como vías de señalización y comprender la interacción patógeno-vector (Iqbal N, Mukhtar MU, Yang J, *et al.*, 2021).

Aunque todas las especies del género usan el sistema de secreción del tipo IV (T4SS) para secretar factores que modulan la respuesta del hospedero, los factores varían entre ellos.

En este trabajo se identificó el gen que codifica la enzima enolasa (eno) en *A. marginale*, *A. ovis*, *A. bovis* y *A. capra*. En particular, en *A. capra*, el análisis bioinformático mostró similitud con la enolasa descrita en la bacteria *Streptococcus*, así como genes asociados a virulencia nutricional relacionados con la biosíntesis de pirimidinas previamente reportados en *Francisella*. La enzima enolasa ha sido ampliamente descrita en otras bacterias como en *Streptococcus* la cual se caracteriza por unirse específicamente a la plasmina humana, exhibiendo una alfa-enolasa que es necesaria para la viabilidad, este mecanismo contribuye a la activación del plasminógeno para patógenos humanos contribuyendo a un potencial de virulencia en procesos infecciosos invasivos (Bergmann S, Rohde M, Chhatwal GS, *et al.*, 2001). También en *A. marginale* ya se tiene reportado la presencia de este gen eno (Quiroz-Castañeda RE, Aguilar-Díaz H, Coronado-Villanueva E; 2024).

La virulencia nutricional es la capacidad de adquirir o sintetizar nutrientes esenciales dentro de hospedador se ha descrito en la bacteria *Francisella* (altamente patógeno en humano) se identificó que el gen pyrC que codifica la dihidroorotasa en la vía de biosíntesis de pirimidina un gen relacionado con la actividad inmunosupresora y patogenicidad de *Francisella* (Nakamura T, Shimizu T, Ikegaya R; 2022).

De este modo probablemente *A. capra* posee mecanismos similares que faltaría analizar a mayor profundidad. Estas proteínas adicionales de acuerdo con los reportes de otras bacterias son mecanismos específicos para infectar a los humanos, por lo que explicaría por qué el género *Anaplasma* es un potencial patógeno zoonótico en humanos y su importancia en prevenir esta enfermedad.

Base de datos de islas de patogenicidad

La base de datos empleadas predijo las PAI (islas de patogenicidad) y las islas de resistencia (IRE) ambas pertenecientes a las islas genómicas (IG) asociadas con virulencia y resistencia microbiana. En el caso del género *Anaplasma* no se detectaron estas islas debido a que es una bacteria intracelular obligada, carece de plásmidos y elementos móviles como transposones o integrones que facilite la transferencia horizontal de genes y su contenido genético es altamente conservado, sin embargo, la evolución de resistencia por mutaciones espontáneas sigue siendo posible. (Liu, Z., Peasley, A.M., Yang, J. *et al.*, 2019).

Identificación de los marcadores moleculares

De los archivos de salida de roary se identificaron marcadores moleculares a nivel de género, especie y grupo del que infecta.

En el caso de *A. marginale* y de *A. capra* la identificación de marcadores fue limitada, lo cual podría atribuirse a su alta conservación genómica. En el caso de *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *A. centrale*, *A. capra*, *A. ovis* y *A. bovis* debido a que son genomas únicos se pudieron identificar un mayor número de marcadores moleculares. Al ser tan específicos permitió distinguir entre especies con alta similitud genética y evitar falsos positivos, además de que se tienen análisis de su distribución geográfica, estos marcadores son útiles para identificar la presencia o ausencia en un determinado lugar y monitorear la presencia de esta enfermedad y poder controlarla y prevenirla en el sector pecuario y en la salud humana y animal.

PCR

La PCR anidada ofrece una alta sensibilidad y especificidad para detectar *A. marginale*, reduciendo significativamente la amplificación de señales inespecíficas gracias al uso de dos pares de cebadores (externos e internos). La elección del gen *msh4* como blanco molecular se basa en su conservación entre cepas y su capacidad para discriminar especies del género.

Conclusiones

Anaplasma es un género con muy poco estudiado, debido a que es una bacteria intracelular obligada incapaz de cultivarse lo que hace que sea limitado su estudio. Se recopilaron 73 ensamblajes genómicos de los cuales 64 cumplieron con los criterios de calidad por el programa CheckM. Se llevó a cabo una caracterización del genoma, fundamentales para entender su biología molecular, adaptación y evolución. La anotación reveló una gran cantidad de proteínas hipotéticas, lo que resalta el potencial descubrimiento de nuevas funciones biológicas y posibles mecanismos de patogenicidad, sobrevivencia, forma de infectar al hospedero aún no descritas, abriendo más estudios a futuro bioinformáticos y experimentales.

Se confirmó que todas las especies analizadas son posibles patógenos zoonóticos e identificamos cuales eran las proteínas relacionadas con patogenicidad y factores de virulencia. También se determinó la distribución geográfica de las cepas y mediante análisis de genómica comparativa, se observó una conservación notable entre cepas de una misma especie, grupo y región geográfica, lo que evidencia patrones evolutivos y adaptativos dentro del género.

A través de análisis pangenómicos, se identificaron candidatos a marcadores moleculares, útiles el diagnóstico en PCR, a nivel de género, grupo y especie, excepto el grupo de los leucocitos. Finalmente, se destaca que, al tratarse de bacterias intracelulares no expuestas directamente al ambiente, no se identificaron islas patógenas ni genes de resistencia a antibióticos, lo que coincide con su nicho ecológico especializado. Este trabajo demuestra que el uso de las herramientas bioinformáticas por medio de un análisis genómico, sin la necesidad de un cultivo bacteriano aporta información esencial sobre su diversidad genética, y no sólo eso, el diseño de marcadores moleculares teniendo la probabilidad de identificar a estas bacterias por medio de PCR en el laboratorio sea mucho más precisa, económica y exacta. Este trabajo al final sólo se limitó a la identificación de *A. marginale* pero se espera que, además de su utilidad para la identificación específica de estas bacterias del género *Anaplasma*, en distintos hospederos, los marcadores moleculares de este estudio podrían servir también para la caracterización genómica del género en México. Hasta ahora, en el país solo se cuenta con genomas ensamblados de *A. marginale* y a nivel mundial. Por lo que al tener la posibilidad de diagnosticarlo con precisión a nivel de género, grupo y especie ayudaría a obtener nuevos ensamblajes de genomas de cepas mexicanas enriqueciendo la información en las bases de datos actuales para ampliar el estudio de la diversidad genética, evolutiva y epidemiológica de *Anaplasma*.

Por último, en esto estudio solo no se pudo realizar el análisis filogenético de este género porque no se pudo hallar el gen 16S ribosomal del gen *Candidatus anaplasma sp*, un genoma ensamblado a nivel conting.

Perspectivas

En este trabajo se llevó a cabo un análisis bioinformático y experimental para el estudio del género *Anaplasma*, teniendo un amplio potencial para sus futuros estudios, comenzando con que existen relativamente pocos genomas disponibles del género *Anaplasma* en repositorios públicos; a esto se añade que la mayoría de los genomas disponibles son borradores de genomas. Por lo que se espera que, en futuro, con las propuestas de marcadores moleculares que pudimos seleccionar, sirvan para que se puedan identificar y ensamblar más genomas de este género, permitiendo comparar cepas con mayor precisión y ubicar regiones diagnósticas.

Al llevar a cabo su anotación nos percatamos que hay muchas proteínas hipotéticas, que probablemente tengan funciones importantes para su adaptación al hospedero, vectores o estilo de vida. Con los avances que tenemos actualmente con la inteligencia artificial y el aprendizaje automático, podría convertirse en una buena herramienta para predecir su función, estructura, dominios y localización subcelular, por ejemplo.

En México se tienen varios reportes de infección del género *Anaplasma*, por lo que se espera que los estudios se amplíen más allá de *A. marginale* por su importancia veterinaria, clínica, epidemiológica y zoonótica. Se espera que el muestreo, la secuenciación y el ensamblado de nuevas cepas mexicanas permitan construir un análisis regional y detectar variación entre hospedero y vector, y tener una prevención a nivel molecular.

El tener un estudio mucho más amplio de los genomas del género *Anaplasma* permite, a su vez, tener mejores resultados a nivel epidemiológico y actualizar el término que se tiene sobre el riesgo zoonótico que es *Anaplasma*, además de determinar estrategias de prevención y el desarrollo de tratamientos mucho más eficientes.

BIBLIOGRAFÍA

- Cao XQ, Gu XL, Zhang L, Xu J, Han HJ, Yu XJ. (2023). Molecular detection of *Rickettsia*, *Anaplasma*, and *Bartonella* in ticks from free-ranging sheep in Gansu Province, China. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 14(3), 102137. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102137>
- Makgabo, S. M., Brayton, K. A., Oosthuizen, M. C., & Collins, N. E. (2023). Unravelling the diversity of *Anaplasma* species circulating in selected African wildlife hosts by targeted 16S microbiome analysis. *Current Research in Microbial Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2023.100198>
- Uminski, K., Kadkhoda, K., Houston, B. L., Lopez, A., MacKenzie, L. J., Lindsay, R., Walkty, A., Embil, J., & Zarychanski, R. (2018). Anaplasmosis: An emerging tick-borne disease of importance in Canada. *IDCases*, 14, e00472. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2018.e00472>
- Tateishi, T., Viviana, L., L , E., Hoyos, S., Rivera, G., Manchego, S., Barrios, A., & More, B. (2015). Identificación hematol gica y molecular de *Anaplasma platys* en caninos domésticos de Lima Metropolitana con signos clínicos compatibles con anaplasmosis. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(1), 111–118. <https://doi.org/10.15381/rivep.v26i1.10920>
- Sainz,  ., Roura, X., Mir , G., Estrada-Peña, A., Kohn, B., Harrus, S., & Solano-Gallego, L. (2015). Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites & Vectors*, 8, 75. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0649-0>
- Arraga-Alvarado, C. M., Qurollo, B. A., Parra, O. C., Berrueta, M. A., Hegarty, B. C., & Breitschwerdt, E. B. (2014). Case report: Molecular evidence of *Anaplasma platys* infection in two women from Venezuela. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(6), 1161–1165. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0372>
- Li, H., Zheng, Y. C., Ma, L., Jia, N., Jiang, B. G., Jiang, R. R., Huo, Q. B., Wang, Y. W., Liu, H. B., Chu, Y. L., Song, Y. D., Yao, N. N., Sun, T., Zeng, F. Y., Dumler, J. S., Jiang, J. F., & Cao, W. C. (2015). Human infection with a novel tick-borne *Anaplasma* species in China: A surveillance study. *The Lancet Infectious Diseases*, 15(6), 663–670. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)70051-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70051-4)
- Peng, Y., Wang, K., Zhao, S., Yan, Y., Wang, H., Jing, J., Jian, F., Wang, R., Zhang, L., & Ning, C. (2018). Detection and phylogenetic characterization of *Anaplasma capra*: An emerging pathogen in sheep and goats in China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 283. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00283>
- Peng, Y., Lu, C., Yan, Y., Song, J., Pei, Z., Gong, P., Wang, R., Zhang, L., Jian, F., & Ning, C. (2021). The novel zoonotic pathogen, *Anaplasma capra*, infects human erythrocytes, HL-60, and TF-1 cells in vitro. *Pathogens*, 10(5), 600. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050600>

- Peng, Y., Lu, C., Yan, Y., Shi, K., Chen, Q., Zhao, C., Wang, R., Zhang, L., Jian, F., & Ning, C. (2021). The first detection of *Anaplasma capra*, an emerging zoonotic *Anaplasma* sp., in erythrocytes. *Emerging Microbes & Infections*, 10(1), 226–234. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1876532>
- Jouglin, M., Blanc, B., de la Cotte, N., Bastian, S., Ortiz, K., & Malandrino, L. (2019). First detection and molecular identification of the zoonotic *Anaplasma capra* in deer in France. *PLoS ONE*, 14(7), e0219184. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219184>
- Severo, M. S., Stephens, K. D., Kotsyfakis, M., & Pedra, J. H. (2012). *Anaplasma phagocytophilum*: Deceptively simple or simply deceptive? *Future Microbiology*, 7(6), 719–731. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.45>
- Stuenkel, S., Granquist, E. G., & Silaghi, C. (2013). *Anaplasma phagocytophilum*—A widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 31. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00031>
- Guzman, N., Yarrarapu, S. N. S., & Beidas, S. O. (2023). *Anaplasma phagocytophilum*. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513341/>
- Aktaş, M., Özübek, S., & Uluçesme, M. C. (2021). Molecular detection and phylogeny of *Anaplasma phagocytophilum* and related variants in small ruminants from Turkey. *Animals*, 11(3), 814. <https://doi.org/10.3390/ani11030814>
- Liu, Z., Peasley, A. M., Yang, J., Munderloh, U. G., & Brayton, K. A. (2019). The *Anaplasma ovis* genome reveals a high proportion of pseudogenes. *BMC Genomics*, 20, 69. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5374-6>
- ElHamdi, S., Mhadhbi, M., Ben Said, M., Mosbah, A., Gharbi, M., Klabi, I., Daaloul-Jedidi, M., & Gharbi, J. (2022). *Anaplasma ovis* prevalence assessment and cross validation using multiparametric screening approach in sheep from central Tunisia. *Pathogens*, 11(11), 1358. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111358>
- M'ghirbi, Y., Oporto, B., Hurtado, A., & Bouattour, A. (2022). First molecular evidence for the presence of *Anaplasma phagocytophilum* in naturally infected small ruminants in Tunisia, and confirmation of *Anaplasma ovis* endemicity. *Pathogens*, 11(3), 315. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030315>
- Chochlakis, D., Ioannou, I., Tselentis, Y., & Psaroulaki, A. (2010). Human anaplasmosis and *Anaplasma ovis* variant. *Emerging Infectious Diseases*, 16(6), 1031–1032. <https://doi.org/10.3201/eid1606.090175>
- Ybañez, A. P., & Inokuma, H. (2016). *Anaplasma* species of veterinary importance in Japan. *Veterinary World*, 9(11), 1190–1196. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1190-1196>
- Park, J., Han, D. G., Ryu, J. H., Chae, J. B., Chae, J. S., Yu, D. H., Park, B. K., Kim, H. C., & Choi, K. S. (2018). Molecular detection of *Anaplasma bovis* in Holstein cattle in the Republic of Korea. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 60, 15. <https://doi.org/10.1186/s13028-018-0370-z>

- Lu, M., Chen, Q., Qin, X., Lyu, Y., Teng, Z., Li, K., Yu, L., Jin, X., Chang, H., Wang, W., Hong, D., Sun, Y., Kan, B., Gong, L., & Qin, T. (2022). *Anaplasma bovis* infection in fever and thrombocytopenia patients—Anhui Province, China, 2021. *China CDC Weekly*, 4(12), 249–253. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2022.053>
- Liu, Z., Ma, M., Wang, Z., Wang, J., Peng, Y., Li, Y., Guan, G., Luo, J., & Yin, H. (2012). Molecular survey and genetic identification of *Anaplasma* species in goats from central and southern China. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(2), 464–470. <https://doi.org/10.1128/AEM.06848-11>
- Ashraf, S., Parveen, A., Asif, M., Alanazi, A. D., Alouffi, A., Awais, M., Khan, A., Aktas, M., Ozubek, S., & Iqbal, F. (2021). First report regarding molecular epidemiology and novel variant identification of *Anaplasma centrale* in cattle from Pakistan. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(11), 6488–6494. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.07.026>
- Inokuma, H., Terada, Y., Kamio, T., Raoult, D., & Brouqui, P. (2001). Analysis of the 16S rRNA gene sequence of *Anaplasma centrale* and its phylogenetic relatedness to other ehrlichiae. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(2), 241–244. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.2.241-244.2001>
- Bell-Sakyi, L., Palomar, A. M., Bradford, E. L., & Shkap, V. (2015). Propagation of the Israeli vaccine strain of *Anaplasma centrale* in tick cell lines. *Veterinary Microbiology*, 179(3–4), 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.008>
- Sisson, D., Beechler, B., Jabbar, A., Jolles, A., & Hufschmid, J. (2023). Epidemiology of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* infections in African buffalo (*Syncerus caffer*) from Kruger National Park, South Africa. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 21, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2023.04.005>
- Atif, F. A. (2015). *Anaplasma marginale* y *Anaplasma phagocytophilum*: Rickettsiales patógenos de importancia para la salud pública y veterinaria. *Parasitology Research*, 114, 3941–3957. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4698-2>
- Spare, M. R., Hanzlicek, G. A., Wootten, K. L., Anderson, G. A., Thomson, D. U., Sanderson, M. W., Ganta, R. R., Reif, K. E., & Raghavan, R. K. (2019). Bovine anaplasmosis herd prevalence and management practices as risk factors associated with herd disease status. *Veterinary Parasitology: X*, 3, 100021. <https://doi.org/10.1016/j.vpoa.2019.100021>
- De la Fuente, J., Van Den Bussche, R. A., Prado, T. M., & Kocan, K. M. (2003). *Anaplasma marginale* msp1 α genotypes evolved under positive selection pressure but are not markers for geographic isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4), 1609–1616. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1609-1616.2003>
- Railey, A. F., & Marsh, T. L. (2021). Economic benefits of diagnostic testing in livestock: Anaplasmosis in cattle. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 626420. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.626420>
- M'ghirbi, Y., Bèji, M., Oporto, B., Khrouf, F., Hurtado, A., & Bouattour, A. (2016). *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum* in cattle in Tunisia. *Parasites & Vectors*, 9(1), 556. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1840-7>

Singh, K., Kumar, S., Sharma, A. K., Jacob, S. S., Verma, M. R., Singh, N. K., Shakya, M., Sankar, M., & Ghosh, S. (2022). Economic impact of predominant ticks and tick-borne diseases on Indian dairy production systems. *Experimental Parasitology*, 243, 108408. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108408>

Aguilar Díaz, J. H., Quiroz Castañeda, R. E., Miranda Miranda, E., Cossío Bayúgar, R., & Salazar Morales, K. (2021). *Método de extracción de alto rendimiento de hemolinfa de la garrapata Rhipicephalus microplus* (Folleto núm. 23). Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad.

Sosa-Gutiérrez, C. G., Cervantes-Castillo, M. A., Laguna-González, R., López-Echeverría, L. Y., Ojeda-Ramírez, D., & Oyervides, M. (2021). Serological and molecular evidence of patients infected with *Anaplasma phagocytophilum* in Mexico. *Diseases*, 9(2), 37. <https://doi.org/10.3390/diseases9020037>

Inzunza-López, J. O., López-Ariza, B., Valdez-Cepeda, R. D., Mendoza, B., Sánchez-Cohen, I., & García-Herrera, G. (2011). La variación de las temperaturas extremas en la “Comarca Lagunera” y cercanías. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 17(spe), 41–61. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2010.09.071>

Almazán, C., González-Álvarez, V. H., Fernández de Mera, I. G., Cabezas-Cruz, A., Rodríguez-Martínez, R., & De la Fuente, J. (2016). Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(2), 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.11.002>

Martínez Ocampo, F. (2022). *Genómica comparativa de nueve cepas del patógeno Anaplasma marginale e identificación de posibles candidatos vacunales contra la anaplasmosis bovina en México* [Tesis de doctorado, Universidad Autónoma del Estado de México].

Casadevall, A., & Pirofski, L.-A. (2000). Host-pathogen interactions: Redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and Immunity*, 68(12), 6511–6518. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.6511-6518.2000>

Finlay, B. B., & Falkow, S. (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(2), 136–169. <https://doi.org/10.1128/MMBR.61.2.136-169.1997>

Hacker, J., & Kaper, J. B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Review of Microbiology*, 54, 641–679. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.641>

Schmidt, H., & Hensel, M. (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 14–56. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.14-56.2004>

Han, X. Y., Du, L. F., Lin, Z. T., Li, C., Xiong, T., Zhu, W. J., Ye, R. Z., Wang, N., Wang, Y. F., Gao, W. Y., Zhao, L., Cui, X. M., & Cao, W. C. (2024). Genomic characters of *Anaplasma bovis* and genetic diversity in China. *Emerging Microbes & Infections*, 13(1), 2323153. <https://doi.org/10.1080/22221751.2024.2323153>

- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*, 25(7), 1043–1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., & Parkhill, J. (2015). Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691–3693. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>
- Cosentino S, Voldby Larsen M, Møller Aarestrup F, Lund O. PathogenFinder - Distinguishing friend from foe using bacterial whole genome sequence data. PLoS ONE. 2013;8(10):e77302. doi: <https://10.1371/journal.pone.0077302>
- Florensa, A. F., Kaas, R. S., Clausen, P. T. L. C., Aytan-Aktug, D., & Aarestrup, F. M. (2022). ResFinder: An open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microbial Genomics*, 8(1), 000748. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000748>
- Chen, L., Yang, J., Yu, J., Yao, Z., Sun, L., Shen, Y., & Jin, Q. (2005). VFDB: A reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research*, 33(Database issue), D325–D328. <https://doi.org/10.1093/nar/gki008>
- Yoon, S. H., Park, Y. K., & Kim, J. F. (2015). PAIDB v2.0: Exploration and analysis of pathogenicity and resistance islands. *Nucleic Acids Research*, 43(Database issue), D624–D630. <https://doi.org/10.1093/nar/gku985>
- García-López, R., Vázquez-Castellanos, J. F., & Moya, A. (2015). Fragmentation and coverage variation in viral metagenome assemblies, and their effect in diversity calculations. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3, 141. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00141>
- Ciufo, S., Kannan, S., Sharma, S., Badretin, A., Clark, K., Turner, S., Brover, S., Schoch, C. L., Kimchi, A., & DiCuccio, M. (2018). Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(7), 2386–2392. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002809>
- Bäumler, A., & Fang, F. C. (2013). Host specificity of bacterial pathogens. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(12), a010041. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010041>
- Shi K, Li J, Yan Y, Chen Q, Wang K, Zhou Y, Li D, Chen Y, Yu F, Peng Y, Zhang L and Ning C (2019) Dogs as New Hosts for the Emerging Zoonotic Pathogen *Anaplasma capra* in China. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9:394. doi: 10.3389/fcimb.2019.00394
- Crosby, F. L., Eskeland, S., Bø-Granquist, E. G., Munderloh, U. G., Price, L. D., Al-Khedery, B., Stuen, S., & Barbet, A. F. (2022). Comparative whole genome analysis of an *Anaplasma phagocytophilum* strain isolated from Norwegian sheep. *Pathogens*, 11(5), 601.

Mukherjee, R., Vidic, J., Auger, S., Wen, H. C., Pandey, R. P., & Chang, C. M. (2023). Exploring disease management and control through pathogen diagnostics and One Health initiative: A concise review. *Antibiotics*, 13(1), 17. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13010017>

Bedoya, F., Beugnet, F., Tobias, E., Garcia-Mendizabal, E., Hay-Parker, S., Montes, N., Uribe, J., & Mondaca, E. (2022). Geographical analysis of seroprevalence of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi*, and *Dirofilaria immitis* in clinics and dog shelters in different Mexican states. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*, 3, 100112. <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2022.100112>

Evans, A. S. (2009). Epidemiological concepts. En A. S. Evans & P. S. Brachman (Eds.), *Bacterial infections of humans* (pp. 1–50). Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09843-2_1

Rojero-Vázquez, E., Gordillo-Pérez, G., & Weber, M. (2017). Infection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia* spp. in opossums and dogs in Campeche, Mexico: The role of tick infestation. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 5, 161. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00161>

Jeréz-Sulvarán, I. A., Martínez-Herrera, D. I., Vivanco-Cid, H., Villagómez-Cortés, J. A., Contreras-López, H. A., Muñoz-Muñoz, L. A., Hernández Vivanco, J. L., & Primo, A. F. (2024). Frequency of *Anaplasma platys* in dogs from the municipality of Veracruz, Mexico. *Veterinary Research Forum*, 15(12), 697–700. <https://doi.org/10.30466/vrf.2024.2021313.4154>

Kolo, A. (2023). *Anaplasma* species in Africa—A century of discovery: A review on molecular epidemiology, genetic diversity, and control. *Pathogens*, 12(5), 702. <https://doi.org/10.3390/pathogens12050702>

Karlsson, R., Gonzales-Siles, L., Gomila, M., Busquets, A., Salvà-Serra, F., Jaén-Luchoro, D., Jakobsson, H. E., Karlsson, A., Boulund, F., Kristiansson, E., & Moore, E. R. B. (2018). Proteotyping bacteria: Characterization, differentiation and identification of pneumococcus and other species within the Mitis group of the genus *Streptococcus* by tandem mass spectrometry proteomics. *PLoS ONE*, 13(12), e0208804. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208804>

Herndon, D. R., Palmer, G. H., Shkap, V., Knowles, D. P., Jr., & Brayton, K. A. (2010). Complete genome sequence of *Anaplasma marginale* subsp. *centrale*. *Journal of Bacteriology*, 192(1), 379–380. <https://doi.org/10.1128/JB.01330-09>

Herndon, D. R., Palmer, G. H., Shkap, V., Knowles, D. P., Jr., & Brayton, K. A. (2010). Complete genome sequence of *Anaplasma marginale* subsp. *centrale*. *Journal of Bacteriology*, 192(1), 379–380. <https://doi.org/10.1128/JB.01330-09>

Balloux, F., & van Dorp, L. (2017). Q&A: What are pathogens, and what have they done to and for us? *BMC Biology*, 15(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0433-z>

Coudert, E., Gehant, S., de Castro, E., Pozzato, M., Baratin, D., Neto, T., Sigrist, C. J. A., Redaschi, N., Bridge, A., & UniProt Consortium. (2023). Annotation of biologically relevant ligands in UniProtKB using ChEBI. *Bioinformatics*, 39, btac793. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac793>

Harpring, M., & Cox, J. V. (2023). Plasticity in the cell division processes of obligate intracellular bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1205488. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1205488>

Hove P, Madesh S, Nair A, Jaworski D, Liu H, et al. (2022) Targeted mutagenesis in *Anaplasma marginale* to define virulence and vaccine development against bovine anaplasmosis. *PLOS Pathogens* 18(5): e1010540. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010540>

Rikihisa, Y., Lin, M., & Niu, H. (2010). Type IV secretion in the obligate intracellular bacterium *Anaplasma phagocytophilum*. *Cellular Microbiology*, 12(9), 1213–1221. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01500>.

Iqbal, N., Mukhtar, M. U., Yang, J., Niu, Q., Li, Z., Zhao, S., Zhao, Y., Guan, G., Liu, Z., & Yin, H. (2021). Identification and evaluation of midgut protein RL12 of *Dermacentor silvarum* interacting with *Anaplasma ovis* VirD4. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 12(3), 101677. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101677>

Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G. S., & Hammerschmidt, S. (2001). Alpha-enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Molecular Microbiology*, 40(6), 1273–1287. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02448>.

Quiroz-Castañeda, R. E., Amaro-Estrada, I., & Rodríguez-Camarillo, S. D. (2016). *Anaplasma marginale*: Diversity, virulence, and vaccine landscape through a genomics approach. *BioMed Research International*, 2016, 9032085. <https://doi.org/10.1155/2016/9032085>

Nakamura, T., Shimizu, T., Ikegaya, R., Uda, A., Watanabe, K., & Watarai, M. (2022). Identification of *pyrC* gene as an immunosuppressive factor in *Francisella novicida* infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 1027424. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1027424>

Liu, Z., Peasley, A. M., Yang, J., Munderloh, U. G., & Brayton, K. A. (2019). The *Anaplasma ovis* genome reveals a high proportion of pseudogenes. *BMC Genomics*, 20, 69. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5374-6>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

POSGRADO EN CIENCIAS

Cuernavaca, Mor., a 23 de marzo de 2026

DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO
COORDINADORA DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la tesis titulada: "Identificación de marcadores moleculares para la detección de especies patógenas del género *Anaplasma* en el sector pecuario en México", que presenta la L. en C. Karla Mariana Martínez Rodríguez (10002825), para obtener el título de Maestra en Ciencias.

Dirección de tesis: Dr. Armando Hernández Mendoza

Unidad Académica: Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA)

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN
Dra. María Eugenia Núñez Valdez CIDC - UAEM	APROBADO
Dra. Sonia Dávila Ramos CIDC - UAEM	APROBADO
Dra. Rosa Estela Quiroz Castañeda CENID-SAI, INIFAP	APROBADO
Dra. Rosalba Salgado Morales CEIB - UAEM	APROBADO
Dr. Gamaliel López Leal CIDC - UAEM	APROBADO





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

GAMALIEL LOPEZ LEAL | Fecha:2026-04-29 10:09:42 | FIRMANTE

fOKQJ129glwAbiJ0J3YDGVfgeyLi5kOri7tt1CTgJkiWTbmBNQLSG4J+QPD8KmpkBLA6CkgPD0U2zOh2ZWGwpoxxyjSCyGHtMX7xz9dvc5Znp6Qlyhe4neB5g7FTG/fRAhq+OOkp
HP5BQHmxV6qNpiXx7iksB0IHXAETe38AmH2QmGDPsfSwhGtTxHRvJEAvazaesfoQlnDX63he6YWqUX7C3r5ez87pUedQ3Q5cZEzRxAHO3gRZIZOzhk/rUK5faavERPPNY
Wuqs/mvdp7b93A12yQIAuSrr02SjKPTKGzjzff3y0yU/LzK9TEC7RktMBnZ5ERY5339CRI3y5Vww==

ROSA ESTELA QUIROZ CASTAÑEDA | Fecha:2026-04-29 16:29:10 | FIRMANTE

PGeqdFU0LD8obih1ycrS2jKKx/73JhAuTZ7s11o0+BCBgA+iPXM3AHGh8/NdHJmK6wbLY5T8m+z5R03kgvU6R3dfqvlyfi97XXbUqZoTG3yufupsG43pVbkWb3gml6uNrKghqjHQS
HD819uU38klF87E/EI6/urb25z22KC0kbNf5NoHnINcZGTCmbaSD522vNuwjicFYEUZUnWmNaQ3PSZTFK5uiPZr7hudgS/2fSXRZZyrNqrvsHuhtJrLvi9IazP5jlmkr7kwaq56sX8
8LcnW8yk2s2S0kl2yOKUVUBsdUgH1x3uQkntJdKHnKJl6My/c9teO+t9KXTf9Nog==

SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2026-04-29 19:20:13 | FIRMANTE

GFRKcV6vIE5DPmUGESw9ebElzqUtWtO7gQRhp9yUPcm2mVvyKyVMUEVGKifJZAF1xMsfUd+6B5AVHleC9jGDSertWEqdyhlsdLI30RNdQSSMFRKuRMpZTifUqEW8saCcZl
5o0DOH188ywOtnPIL/Uxk4A51/VG3eohAj9yrZZ5CLXwIMYe7YjFe9Qi1OC2bj37Z+hjNOtoolYqAQAnHgBOFG7iB6YN6d/48tOqSjsa7GzjxDxeUdKD1DqrfD5rJZebNmnXOZ3KYs
KYRHj8a+Q9d7hHa26sl4Htj9TlqNUSbVqJBV+BE0yaN2tnr6fVxz1/qj26Ej2xfHAGKew7Q==

ROSALBA SALGADO MORALES | Fecha:2026-05-04 15:27:01 | FIRMANTE

CE+HsXJ3t3pVGdPoFgRoKl7/siFYqKbtDraSzPUvDm1EJTqCsfnmvgv6zFxxumkTnBi2hqECRcmCumQw8C48QBckcTB/mQQOxA3jdLTWpF6UE/1Gj7o4j8Bk4bGeG3DdtJVqwm
Mv9q9Yzn9hwhHhHoHlfoaFRYmPg9X3N5/n5Nml4iBbN6lHRBkBB4blo5konY0r+6tsOYHfmmneLeSs5zq0JXBfj4LGu3J/SoqQTdesYWyTRiDU6UnwNmxwvs1BJj+bobSZqPrSpdnWy
GR9RS0V0eDrXzqp8wjkyufg3fuRs58qY1fpOy33vyArNqTlMPFyAmeyBXEdrrXO3HtlInpmw==

MARIA EUGENIA NUÑEZ VALDEZ | Fecha:2026-05-06 15:55:15 | FIRMANTE

AHgBCI48HOtVN8P+CVVefE91zCTnu7VMiME4APy55YctI1UHG3kZLPqLpP4Tns1T6sJlcyiliiOdroaFGeJNd/ShS5VxvWw6253aEvY7mjWUDus3rxSnE/z62R3dPCKabcnJuM6S
EWd3Hk3ZjyrEJ+hIbdBTPA+Bgzj+JHGyWR30yGALPBILDIIEBurmzDDI3Eb+SjNO0DQ3AFgv4hp8+C/z3j1zGV65ojcSJ7cPQtHz35nUxeO7X2Nzfeqlu3lVcfHKV3otz1tMSPAwjvyk
CIf6LhZ4ktSiNOxXzRFNFMFv4Z6Z4XaLaUyBcUgJjpbZlzn3WrQVYctug4bsq2FSPSRw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



wifra9BBye

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/55AIPPi48yJbUa08sFJzZFu9VY92gXx0>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029