

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias de la Salud

Prevalencia de anaplasmosis bovina en los cantones Río Verde, Eloy Alfaro y Quinindé de la provincia de Esmeraldas
Trabajo de investigación

Daniela Alejandra Fernández Gómez

Medicina Veterinaria

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Médico Veterinario

Quito, 21 de mayo de 2018

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO CIENCIAS DE LA SALUD

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

Prevalencia de anaplasmosis bovina en los cantones Río Verde, Eloy Alfaro y Quinindé de la provincia de Esmeraldas

Daniela Alejandra Fernández Gómez

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Rommel L. Vinueza S., Dr. MSc.

Firma del profesor:

Quito, 21 de mayo de 2018

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Daniela Alejandra Fernández Gómez

Código: 00115196

Cédula de Identidad: 171588800-2

Lugar y fecha: Quito, 21 mayo de 2018

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de anaplasmosis bovina en los cantones de Río Verde, Eloy Alfaro y Quinindé, provincia de Esmeraldas, mediante la técnica de c-ELISA. Las muestras de suero se obtuvieron de 181 bovinos pertenecientes a 22 fincas mixtas. La prevalencia obtenida fue del 86%. Este resultado está ligado a factores como la falta de asistencia veterinaria, falta de vacunación, mal uso de acaricidas, por lo que no existe estabilidad enzoótica durante la época de muestreo.

Palabras clave: Anaplasmosis bovina, c-ELISA, Esmeraldas, ganado, prevalencia

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the prevalence of bovine anaplasmosis in the cantons of Río Verde, Eloy Alfaro y Quinindé, province of Esmeraldas, using the c-ELISA technique. Serum samples were obtained from 181 cattle from 22 mixed herds. The prevalence obtained was 86%. This result is linked to factors such as lack of veterinary assistance, lack of vaccination, misuse of acaricides, so there is no enzootic stability during the sampling period.

Key words: Bovine anaplasmosis, c-ELISA, Esmeraldas, cattle, prevalence.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
TABLA DE CONTENIDO	6
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE GRÁFICOS	8
INTRODUCCIÓN	9
MATERIALES Y MÉTODOS	18
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	31
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXOS	44
ANEXO A: LISTA DE MEDICAMENTOS PARA TRATAMIENTO DE ANAPLASMOSIS BOVINA ...	44
ANEXO B: LISTA DE PROTOCOLOS DE TRATAMIENTO PARA ANAPLASMOSIS BOVINA.....	44

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA DE ELISA COMPETITIVO E INDIRECTO.....	13
TABLA 2. RESUMEN DE ESTUDIOS REALIZADOS EN EL ECUADOR DESDE 2010 AL 2018, REFERENTES A ANAPLASMOSIS BOVINA.	15

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LOS RESULTADOS DE TEST DE ELISA INDIRECTO DE ANAPLASMA MARGINALE EN BOVINOS, EN EL CANTÓN RÍO VERDE, ELOY ALFARO Y QUININDÉ EN LA PROVINCIA DE ESMERALDAS (N=181).	22
---	----

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por garrapatas constituyen un problema sanitario para el desarrollo de la ganadería en regiones tropicales y subtropicales alrededor de todo el mundo. La anaplasmosis bovina es una enfermedad de distribución mundial mediada por vectores, que afecta tanto a ganado de carne como de leche (León et al, 2010). Según los informes de la OIE el Ecuador ha reportado la enfermedad como ausente desde el año 2005 hasta el 2017. La última fecha de ocurrencia de la enfermedad fue en el año de 1999 (OIE, 2017).

Esta enfermedad es causada por una Rickettsia, perteneciente a la familia Anaplasmatacea, género *Anaplasma*, especie *Anaplasma marginale*. A pesar de que existen otras especies de importancia veterinaria como *Anaplasma bovis* o *Anaplasma centrale*, la *Anaplasma marginale* es la que causa problemas más graves en los animales porque produce brotes de enfermedad clínica (OIE, 2015).

Las bacterias del género *Anaplasma* pueden ser transmitidas a través de tres métodos: biológica, mecánica y transplacentaria. En la forma biológica, las garrapatas son las responsables de inocular la bacteria en el animal susceptible. En este caso los eritrocitos infectados son ingeridos por las garrapatas. *Anaplasma spp.* se replica dentro del intestino y glándulas salivales del vector y a través de la saliva infecta rumiantes sanos (Aubry y Geale, 2011). Al menos 20 especies de garrapatas se han identificado a nivel mundial como vectores de *Anaplasma spp.* En general se incluye especies como *Dermacentor variabilis*, *Dermacentor andersoni*, *Dermacentor alpinitus*, *Dermacentor occidentalis*, *Rhipicephalus annulatus*, *Rhipicephalus microplus* e *Ixodes ricinus*. Las bacterias permanecen dentro de un

ciclo entre los rumiantes (domésticos o silvestres) y las garrapatas machos, donde ambos son considerados como reservorios de la infección, ya que ambos tendrán una infección persistente. (The Center for Food Security and Public Health, 2013). Algunas cepas de *A. marginale* no son infecciosas o transmisibles por garrapatas, como por ejemplo las cepas de Florida (Kocan, et al., 2010).

La transmisión mecánica se produce a través de insectos hematófagos. Estudios han demostrado que alrededor de 12 especies de moscas mordedoras son capaces de transmitir la enfermedad de manera experimental. Dentro de las especies principales se encuentran las moscas del establo (*Stomoxys calcitrans*), 8 especies de tábanos y 3 especies de mosquitos (Culicoidae) (Aubry y Geale, 2011). Los fómites contaminados con sangre también son parte de este tipo de transmisión. Los objetos como agujas, sierras de descorne, pinzas de nariz, instrumentos de tatuaje, dispositivos de marcado de orejas e instrumental de castración son los más comunes (Kocan, et al., 2008). En el caso de la transmisión transplacentaria se ha determinado que puede producirse durante los dos últimos trimestre de gestación (Zaugg, 1985).

Anaplasma marginale puede producir una enfermedad hiperaguda, aguda o crónica. La forma hiperaguda se presenta en animales mayores de 3 años sin contacto previa con la enfermedad, de tipo *Bos taurus* y suele ser fatal en la mayoría de los casos. Hay disminución pirexia, rápida disminución de la producción, anemia, mucosas pálidas, taquipnea y salivación excesiva (Andrews, 2004). En una infección aguda el 70% de animales puede enfermarse e incluso morir (Birdane, et al., 2006). Los signos clínicos aparecen cuando más del 15% de los eritrocitos han sido infectados. El periodo prepatente de la enfermedad (periodo de incubación) varía según la cantidad de organismos en dosis infectiva y está dentro

de un rango de 7 a 60 días con un promedio de 28 días. Después de que la infección es detectada, el número de eritrocitos parasitados incrementa geométricamente (Kocan, et al., 2003 a). Durante la fase aguda de la enfermedad, los niveles de rickettsemia son mayores a 10^9 de eritrocitos infectados por ml (French, et al., 1998). El primer signo de la enfermedad es una fiebre de hasta 41 °C. Esta es seguida por anemia hemolítica, aislamiento del animal, debilidad, disminución de la producción, pérdida del apetito, deshidratación, disnea, taquicardia, temblores musculares, palidez de mucosas, bilirrubinemia y posteriormente ictericia. Al cabo de 24 a 36 horas del pico de infección, hay un 90% de eritrocitos infectados pudiendo ocasionar fallo cardiopulmonar y la muerte (Alderink y Dietrich, 1981). La disminución del hematocrito llega a su punto máximo a los seis días después de la infección y persiste por 15 días más, con una disminución del 75% de los eritrocitos. Los animales que sobreviven pueden generar una respuesta regenerativa a la anemia disminuyendo los valores de parasitemia y recuperando los valores hematológicos normales después de muchas semanas (Swift y Thom, 1983; Viseshakul, et al., 2000). La recuperación de la fase aguda resulta en una infección persistente que se caracteriza por ciclos repetitivos de rickettsemia que varía entre un $10^{2.5}$ a 10^7 de eritrocitos infectados por ml (French, et al., 1998).). Estos animales presentan una enfermedad crónica con escasos signos clínicos como fiebre leve (Andrews, 2004). Los animales más jóvenes pueden presentar mayor resistencia debido a los anticuerpos maternos, a la respuesta inmune celular mayor por la competencia del timo, el sistema hematopoyético es más activo y por la mayor actividad de la hemoglobina fetal (Richey y Palmer, 1990).

Para el diagnóstico existen diferentes métodos, de los cuales el más utilizado para la detección en enfermedad aguda es el frotis sanguíneo con tinción de Giemsa (OIE, 2015). El

problema con este método es que la infección se hace visible al microscopio entre 2 a 6 semanas después de la transmisión. Durante la enfermedad clínica, la parasitemia se va a duplicar cada día hasta los 10 días y luego decrece a una velocidad similar. Los frotis teñidos con Giemsa usados para confirmar una enfermedad aguda, solo pueden detectar niveles mayores a 10^6 de eritrocitos infectados por ml (Gale, et al., 1996). Por estas razones en animales que se encuentran en la fase prepatente y en aquellos que se recuperaron de la enfermedad pero permanecen infectados persistentemente, será más difícil evidenciar los eritrocitos afectados (OIE, 2015).

Los métodos serológicos se desarrollaron con el fin de medir anticuerpos específicos. El enzimoimmunoanálisis de competición (c-ELISA) fue desarrollada basado en la unión del anticuerpo a una proteína de superficie recombinante (MSP5) de *A. marginale*. Permite detectar anticuerpos específicos contra *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale* y *Anaplasma ovis* en animales persistentemente infectados (VMRD, 2017). Este test utiliza un antígeno recombinante denominado rMPS5 y un anticuerpo monoclonal (MAb) específico para MSP5. Todas las cepas probadas de *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale* y *Anaplasma ovis* expresan este antígeno, induciendo la producción de anticuerpos contra este epítipo inmunodominante y que es reconocido por el MAb específico. En el caso de *Anaplasma phagocytophilum* no se recomienda usar el test para su detección porque estudios recientes no han demostrado que exista reacción cruzada. En el caso del enzimoimmunoanálisis indirecto se lo utiliza si el c-Elisa no está disponible dando buenos resultados con una buena sensibilidad y especificidad. Estas técnicas serológicas son usadas para determinar la prevalencia de la enfermedad (OIE, 2015).

Tabla 1. Sensibilidad y Especificidad de la técnica de ELISA competitivo e indirecto.

Método diagnóstico	Sensibilidad	Especificidad
c-Elisa	96%	95%
i-Elisa	➤ 90%	➤ 90%

(Torioni De Echaide et al., 1998; Svanova, n.d)

El “Gold Estándar para” confirmar la infección es a través de la inoculación de sangre de animales sospechosos en terneros esplenectomizados. La desventaja de este método es que es un procedimiento costoso (Luther, et al., 1980). Otros tipos de métodos diagnósticos usados son el PCR, la prueba de aglutinación en placa, fijación de complemento e inmunofluorescencia indirecta (OIE, 2015).

Los métodos de prevención y control son importantes para evitar la aparición de la enfermedad. Dentro de estos se incluyen el control de las garrapatas con acaricidas, uso de antibióticos y la vacunación. El control de artrópodo no es práctica en muchas áreas donde la enfermedad es endémica ya que solo se previene de manera parcial la transmisión de *A. marginale*. El control de garrapatas con acaricidas representa un problema actual ya que el uso indiscriminado de estas sustancias ha hecho que los vectores adquieran resistencia por lo que se recomienda el control de las pasturas (libres de garrapatas) (CFSPH, 2013). Los grupos de acaricidas asociados a cepas resistentes de garrapatas son los organofosforados, piretroides sintéticos, amitraz y lactonas macrocíclicas (Kearne, 2013). El excesivo uso de antibióticos puede producir cepas resistentes. En algunas ocasiones se trata con tetraciclinas

a animales que pasan de pasturas libres a contaminadas como medida profiláctica, aunque no es un método común de control (CFSPH, 2013).

Las vacunas son un método económico utilizado en todo el mundo para controlar la anaplasmosis bovina. Estas vacunas se dividen en dos grupos: vivas y muertas. Ambas vacunas se basan en el uso de *A. marginale* a partir de eritrocitos bovinos infectados. Sin embargo, a pesar de que la vacunación es efectiva en evitar los signos clínicos, no evita la infección. (Kocan, et al., 2010). El uso de una especie menos patógena *A. centrale*, proporciona una protección parcial cruzada frente *A. marginale*. Este método es ampliamente usado en África, Australia, Israel y América Latina, sin embargo no se utiliza en América del Norte (OIE, 2015). Actualmente no existen vacunas aprobadas para proteger contra *A. marginale* disponible en Estados Unidos, excepto por una vacuna experimental muerta que se distribuye en 14 estados (Luther, 2007; Kocan, et al., 2010) Otro tipo de vacuna son las que implican el uso de una cepa de *A. marginale* atenuada que ha pasado por hospedadores no bovinos, como el ciervo o la oveja. (OIE, 2015). El desarrollo de vacunas que previene la infección es difícil debido al incremento de cepas de campo de *A. marginale*. Por mucho tiempo se supo que las diferentes cepas de *A. marginale* no presentan un protección cruzada. Estudios recientes han determinado que existen mayor cantidad de genotipos de lo que se había reconocido previamente. Este incremento puede ser resultado de la movilización del ganado. El éxito del desarrollo de nuevas vacunas por medio de tecnología molecular, dependerá en la habilidad de promover una respuesta cruzada entre los diferentes genotipos y de imitar o redireccionar la respuesta del huésped frente a la infección natural o bloquear la infección de las células del huésped (Palmer et al., 1999).

En el Ecuador se han realizados diversos estudios en bovinos sobre la prevalencia de la enfermedad en diferentes regiones del Ecuador, incluyendo Galápagos. La mayoría de trabajos se concentran en la región de la Costa y Oriente (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de estudios realizados en el Ecuador desde 2010 al 2018, referentes a Anaplasmosis bovina.

Nombre del estudio	Región	Provincia	Método diagnóstico	Prevalencia	Autor
Prevalencia de Hemoparásitos (<i>Trypanosoma spp</i> , <i>Anaplasma spp</i> , <i>Babesia spp.</i>) en tres núcleos productores bovinos, de la parroquia de Santa Rosda, Cantón El Chaco, Provincia de Napo	Amazonía	Napo	Frotis sanguíneo: <i>In situ</i> : vena marginal de la oreja. <i>Laboratorio</i> : vena coccígea en tubo con EDTA.	Frotis in situ: 20% Laboratorio: 4%	(Vargas, et al., 2014)
Prevalencia de anaplasma marginale mediante extendidos sanguíneos en el cantón zamora, provincia de zamora chinchipe	Amazonía	Zamora Chinchipe	Frotis sanguíneo	68%	(Muñoz, et al., 2014)
Prevalencia y detección por PCR anidada de <i>Anaplasma marginale</i> en bovinos y garrapatas en la zona central del Litoral ecuatoriano	Costa	Los Ríos	PCR anidada	Garrapatas <i>Rhipicephalus micropuls</i> : 13,46% Población bovinos: 85,48%	(Escobar, et al., 2015)
Prevalencia de anaplasmosis en bovinos de la zona central del Litoral Ecuatoriano	Costa	Los Ríos	PCR anidada	87,5%	(Escobar, et al., 2014)
Determinación de la prevalencia de anaplasmosis en el ganado bovino faenado en la Empresa Metropolitana de Rastro de Quito (EMRQ) mediante la aplicación de las técnicas de diagnóstico: microscopía de frotis sanguíneos,	Sierra	Pichincha	Frotis sanguíneo, cELISA y PCR	Frotis sanguíneo: 28.18% cELISA: 91,16% PCR: 91.71%	(Soto, 2010)

reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ensayo inmunoenzimático competitivo (cELISA)					
Prevalencia de <i>Anaplasma marginale</i> en bovinos de la provincia Zamora Chinchipe, Ecuador	Amazonía	Zamora Chinchipe	Frotis sanguíneo	49,5%	(Muñoz-Guarnizo, et al., 2017)
Determinación de la seroprevalencia de <i>Anaplasma marginale</i> , a través del Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) en la población Bovina de la provincia de Galápagos-Ecuador	Insular	Galápagos	iELISA	64,1%	(Monroy, 2015)
PCR in the diagnosis of <i>Anaplasma marginale</i> in cattle populations of Ecuador and its further molecular identification by 16S ribosomal sequencing	Sierra	Santo Domingo de los Tsáchilas	PCR	86,1%	(Tana-Hernández, et al., 2016)
Diagnóstico de los hemotrópicos <i>Anaplasma marginale</i> , <i>Trypanosoma spp.</i> y <i>Babesia spp.</i> mediante las técnicas de ELISAi y OCR en tre fincas ganaderas de la provincia de Pastaza, Ecuador	Amazonía	Pastaza	iELISA	65,51%	(Medina-Naranjo, et al., 2017)
Incidencia de <i>Anaplasma bovis</i> (<i>Anaplasma marginale</i>) en hatos bovinos de las asociaciones ganaderas del cantón Vinces provincia de Los Ríos.	Costa	Los Ríos	Frotis sanguíneos	39,14%	(Luzarraga, 2015)
“Diagnóstico de <i>Anaplasma spp.</i> y <i>Babesia spp.</i> en el ganado bovino que se faena en el Camal Frigorífico “CAFRILOSA” de Loja mediante la técnica de Giemsa”	Sierra	Loja	Frotis sanguíneos	28,3%	(Celi, 2013)
Prevalencia de anaplasmosis bovina en el cantón Yantzaza, provincia de Zamora Chinchipe	Amazonía	Zamora Chinchipe	Frotis sanguíneo	82,5%	(Muñoz, et al., 2013)

“Determinación de la Incidencia de Anaplasmosis y Babesiosis en el ganado bovino sometido a explotación en la parroquia Huigra, cantón Alausí, provincia de Chimborazo	Sierra	Chimborazo	Frotis sanguíneo	98%	(Yáñez, 2013)
Bovine anaplasmosis and tick-borne pathogens in cattle of the Galapagos Islands	Insular	Galápagos	PCR	96,7%	(Gioia, 2018)

En países como Venezuela los estudios realizados determinan que la prevalencia de la enfermedad es alta. En el sector la Piñata se determinó una prevalencia mayor o igual al 75% en todas las fincas, indicando la estabilidad enzootica de la enfermedad (Díaz et al, 2003). En Colombia es considerada como una enfermedad de gran importancia debido a las restricciones en el incremento de la productividad (Benavides et al, 2000). En México se determinó una prevalencia de 69.2% en el estado de Veracruz por medio de la técnica de PCR (Cossío et al, 1997). En la provincia de Caylloma, Departamento de Arequipa se registró una prevalencia de Anaplasmosis del 29.9% con 102 casos positivos de un total de 347 muestras (Laguna, 2005).

Este estudio determinó la prevalencia de anaplasmosi en la Provincia de Esmeraldas en los cantones de Rio Verde, Eloy Alfaro y Quininde con la participación de 22 fincas, a través del método de ELISA competitivo en suero sanguíneo, además se estableció recomendaciones importantes para los productores.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la provincia de Esmeraldas en el Cantón Río Verde, Eloy Alfaro y Quinindé, a finales del mes de Septiembre del 2017. Las temperaturas máximas de esta zona varía entre los 36-39°C, ocasionalmente con temperaturas mínimas menores a 20°C (Gálvez y Regalado, 2007). Los participantes de este estudio fueron 22 fincas en total, pertenecientes al proyecto Planes de Finca que está impulsado por el GADPE (Gobierno Autónomo Descentralizado de la Provincia de Esmeraldas) y el IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura).

Las fincas elegidas pertenecían a pequeños productores y presentaban las mismas características de acuerdo a las condiciones de manejo y número de animales (40 a 60 animales). Las características de los predios fueron identificadas a través de entrevistas a los propietarios. La selección de los animales se hizo de acuerdo a un criterio de inclusión que fue el alto grado de infestación de garrapatas y la presencia de signos clínicos correspondientes con anaplasmosis/babesiosis. De este grupo de animales se realizó un muestreo aleatorio. El estudio al ser de tipo epidemiológico no fue necesario un mantenimiento de animales ni sacrificio de los mismos ya que la única intervención fue al momento de la toma de muestra sanguínea. Todos los procesos fueron supervisados por profesionales del área veterinaria. Para determinar el cálculo del tamaño de la muestra se utilizó la siguiente fórmula (Aguilar-Barojas, 2005):

$$n = \frac{Z_a^2 * p * q}{d^2}$$

Donde:

n = tamaño de la población

Z = nivel de confianza

p = probabilidad de éxito, o proporción esperada

q = probabilidad de fracaso

d = precisión (Error máximo admisible en términos de proporción)

Para este estudio se tomó como referencia una población de 1100 animales inscritos en el proyecto Planes de Finca del GADPE, 88% de prevalencia de *Anaplasma marginale* reportado por Escobar et al. (2015) en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas que tiene condiciones similares a las de Esmeraldas. Asumiendo una distribución normal simétrica, nivel de confianza de 95% y un error del 5%, el resultado fue de 163 animales que se deben muestrear.

El primer paso fue extraer aproximadamente 5 ml de sangre de las venas yugular/coccígea de 181 animales de diferentes edades, sexo y razas. La sangre se colocó en tubos vacutainer sin anticoagulante. Los tubos fueron identificados según el número del animal y dueño del predio. Las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos para promover la formación del coágulo. Después se refrigeraron en un cooler con geles a una temperatura de alrededor de 5 °C. A continuación, las muestras se centrifugaron en el laboratorio del Hospital Docentes de Especialidades Veterinarias de la USFQ a 2500 revoluciones por minuto (rpm) durante tres minutos. El suero obtenido se depositó en tubos eppendorf de 1,5 ml, los cuales fueron congelados a una temperatura de -20 °C.

Posteriormente con los sueros se realizó el test de Elisa en el laboratorio de Entomología Médica y Medicina Tropical de la USFQ, para determinar la prevalencia de la enfermedad

en la zona. El test utilizado fue un kit comercial de Elisa competitivo (*Anaplasma* antibody test kit, cELISA v2; VMRD Inc., Pullman, WA). El principio del test se basa en que los anticuerpos presentes en el suero del animal inhiben la unión del anticuerpo monoclonal de peroxidasa de rábano picante (HRP) a la placa cubierta con antígenos de *Anaplasma*. La unión o falta de unión del anticuerpo monoclonal HRP se detecta cuando se añade la solución de sustrato y se produce una coloración que se puede cuantificar. Una coloración fuerte indica que hay poca o ninguna inhibición en la unión de los anticuerpos monoclonales HRP por lo tanto no hay presencia de anticuerpos contra *Anaplasma* en los sueros. En el caso de que la coloración sea débil o no se haya desarrollado, indica que hay inhibición en la unión de los anticuerpos monoclonales HRP debido a que hay presencia de anticuerpos contra *Anaplasma* en el suero. El fin es detectar anticuerpos específicos en suero e identificar a portadores y saber cuál es el estatus individual de los animales. Los ELISAS de tipo competitivo pueden detectar anticuerpos específicos independientemente de su isotipo (Fernández, 2007).

El protocolo usado fue el descrito por el fabricante. Los reactivos fueron mantenidos a una temperatura de 2-7 °C hasta el momento de su uso. Los reactivos fueron equilibrados a temperatura ambiente (23 ± 2 °C) antes de ser usados. El primero paso fue preparar todos los reactivos necesarios. Primero se realizó la dilución del conjugado al mezclar 1 parte del anticuerpo conjugado con peroxidasa (100X) con 99 partes del Buffer de dilución del conjugado para preparar 1X del anticuerpo-conjugado con peroxidasa (ejemplo: para los 96 pocillos, mezclar 60 µl del anticuerpo conjugado con peroxidasa (100X) con 5.940 ml del Buffer de dilución del conjugado para preparar 6 ml de mezcla, tomando en cuenta que cada pocillo necesita 50 µl). Para preparar 1X de solución de lavado se necesita mezclar una parte del concentrado de la solución de lavado con 9 partes de agua destilada o desionizada

(aproximadamente 1.5 ml por pocillo pocillo son necesarios). Tanto las muestras como los controles se depositaron en los pocillos de las placas y se colocaron duplicados de los controles positivos y triplicados de los controles negativos en ambas placas. A continuación se incubó las placas por una hora a temperatura ambiente (23 ± 2 °C), para después lavarlas dos veces con la solución de lavado, llenado los pocillos correctamente. Posteriormente se añadió 50 µl de los anticuerpos conjugados en cada pocillo e incubar por 20 minutos a temperatura ambiente (23 ± 2 °C). Después de pasado el tiempo se lavó 4 veces y se añadió 50 µl de la solución de sustrato en cada pocillo y volver a incubar 20 minutos a temperatura ambiente (23 ± 2 °C), evitando la luz solar directa. Importante no vaciar los pocillos y continuar con la adición de la solución de frenado para interrumpir la reacción. Inmediatamente después de adicionar la última solución se prosiguió a leer las placas en un espectrofotómetro de absorbancia de microplacas. La lectura de la densidad óptica se debe colocar a una longitud de onda de 620, 630 o 650 nm. Los resultados y la validación del test se determinaron según las recomendaciones propias del kit. En este caso se determinó el porcentaje de inhibición para validar el test por medio de los controles. El promedio del control negativo debe tener una densidad óptica > 0.40 y ≤ 2.10 , mientras que el promedio del control positivo debe presentar una inhibición ≥ 30 %. En promedio el valor del control positivo fue de 73,03% de inhibición y del control negativo fue 0,76 de OD (Veterinary Medical Research and Development, 2017)

RESULTADOS

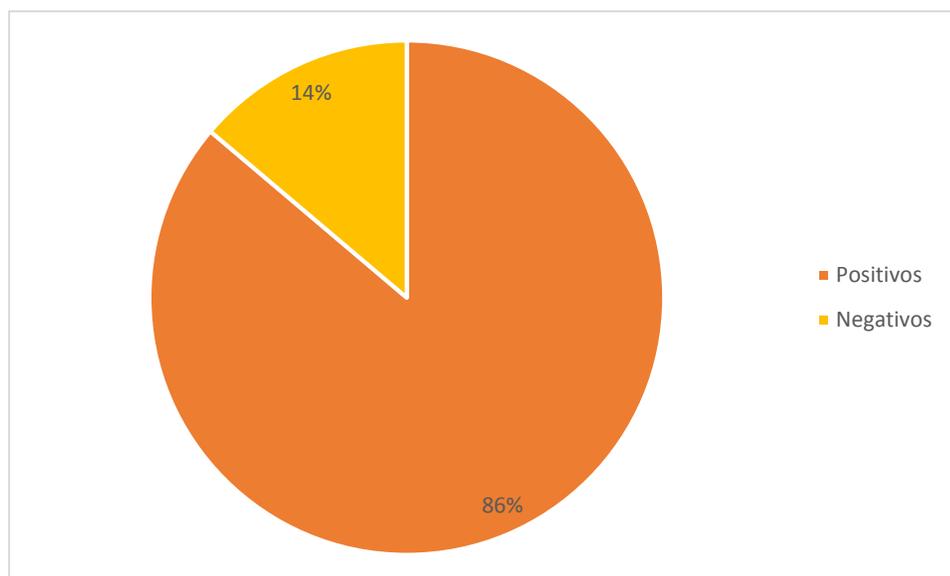


Gráfico 1. Distribución porcentual de los resultados de test de Elisa indirecto de *Anaplasma marginale* en bovinos, en el cantón Río Verde, Eloy Alfaro y Quinindé en la provincia de Esmeraldas (n=181).

A través de la técnica de ELISA competitivo se determinó que de las 181 muestras evaluadas, 156 fueron positivas lo cual representa el 86% de los animales analizados. Los animales negativos representan un 14% lo que equivale a 25 animales (Gráfico 1). En este caso la prevalencia de las 22 fincas de los cantones Río Verde, Quinindé y Eloy Alfaro en la provincia de Esmeraldas es de 86%.

DISCUSIÓN

Los productores de estos cantones utilizan razas como Hosltein, Brown Swiss, Jersey, Charolaís y Braham para la producción de leche y carne (Luzarraga, 2015). A partir de entrevistas personales se evidenció que no cuentan con asistencia veterinaria y vacunación

de sus animales, no tienen conocimiento sobre la enfermedad, hay un uso inadecuado de acaricidas y no llevan registro de sus animales. Todo esto generando índices productivos no superiores a 6 litros diarios. La principal afección de estos pequeños productores fue la presencia de garrapatas y signología clínica como hematuria, emaciación y pérdida de la producción.

Las prevalencias obtenidas en países como Sudáfrica, Italia, Brasil fueron de alrededor del 84%, 80% y 87% respectivamente (Mtshali, et al, 2007; De la fuente et al, 2005; Barros, 2005). En el Ecuador la prevalencia varía según el estudio y la región (Tabla 2). En el presente estudio se obtuvo una prevalencia del 86%, que coincide con las obtenidas en los países antes mencionados y con la Provincia de los Ríos de 85.4% (Escobar, et al., 2015) y en Santo Domingo de los Tsáchilas con un 86.1% (Hernández et al, 2016). Sin embargo varía con otras áreas como Galápagos 64.1% (Monroy, 2015) y Zamora Chinchipe con un 63% (Muñoz et al. 2014).

La prevalencia obtenida es considerablemente alta, la cual puede ser explicada por una estabilidad enzoótica o por la presencia de factores como el manejo, raza, edad, uso de acaricidas, clima, etc, generando brotes de la enfermedad (Corpoica, 1996; Parra, et al., 1999). Debido a que la estabilidad enzoótica ocurre cuando la dinámica de los vectores es suficientemente activa, permitiendo que la mayoría de terneros en un área se infecten antes de los 8 meses de edad (Fivaz, Petney, Horak, 1992) no se puede considerar esta como la causa. Principalmente porque no se cuenta con el número de ternero positivos y no se puede establecer si existe un equilibrio entre el huésped, agente y medio ambiente (Corpoica, 1996; Cipolini, et al., 2006).

La diferencia de prevalencias esta correlacionado con las prácticas de manejo, la raza del animal, el mal uso de acaricidas para el control de garrapatas y por el método diagnóstico utilizado (Ashuma, et al., 2013). Las prevalencias ligadas a estos factores, no aseguran la exposición del animal al parásito (Parra, et al., 1999). Esto determina la presencia de anaplasmosis clínica en animales susceptibles, con posibles brotes. Según Fivaz, Petney, Horak (1992) los brotes de la enfermedad suceden porque hay un incremento del número de vectores aumentando así el porcentaje de transmisión de la enfermedad y por la importación de ganado sano a localidades donde la enfermedad es endémica.

Las prevalencias que se observan en los diferentes estudios (Tabla 2) esta determinada por el tipo de método diagnóstico usado, ya que varían según su especificidad y sensibilidad. Por ejemplo los frotis de sangre teñidos con giemsa son el gold estándar para diagnosticar anaplasmosis bovina en individuos, pero es eficaz únicamente en casos donde hay sinología clínica. Esto se debe a que animales que están cursando el período prepatente de la enfermedad o presentan enfermedad subclínica (reservorio de la enfermedad) tienen poca cantidad de eritrocitos infectados por lo que no son detectables microscópicamente (French et al., 1998). Este es el caso del estudio realizado por Soto (2010) donde la prevalencia obtenida en el Camal Metropolitano de Quito con frotis sanguíneo fue del 28,18%, comparada con 91,71% y 91,16% por medio de las técnicas PCR y c-ELISA respectivamente.

Los métodos serológicos son útiles para identificar animales infectados persistentemente. El Elisa competitivo (C-Elisa) utilizado en este estudio ha demostrado tener una sensibilidad del 98% y una especificidad del 100% comparada con el PCR anidada, además de ser efectivo para detectar infecciones aguda y crónicas en ganado (Birdane, et al., 2006). El test ha sido capaz de detectar animales infectados a los 16 días post-infección,

además de que también ha sido capaz de detectar animales infectados experimentalmente hace 6 años (OIE, 2015). La presencia de animales negativos puede deberse a que estos animales están fuera del rango por lo que el test no fue capaz de identificarlos. Por otro lado, hay la posibilidad de que estos animales pertenezcan a hatos donde no existe anaplasmosis, sino otra enfermedad como la babesiosis.

La genética utilizada en estos cantones representa uno de los desafíos más grandes. Por ser ganaderías de doble propósito emplean ganado tipo *Bos taurus*, ganado *Bos indicus* y sus cruza. Por otro lado también hay movilización de ganado desde zonas donde no hay la presencia de garrapatas como por ejemplo desde la Sierra. Por lo que estos animales no han estado expuestos a estos vectores ni a las enfermedades que transmiten. Tampoco son vacunados antes de ser movilizados. El ganado cebú es más resistentes a los efectos causados por garrapatas y las enfermedades que transmiten, sobretodo en lugares donde la enfermedad es endémica (Ashuma et al, 2013). En los últimos años se han realizado diferentes estudios para determinar la susceptibilidad de bovinos *Bos indicus* y *Bos taurus* frente a la infección con *Anaplasma marginale*. Parker, Shepherd y Trueman (1985) determinaron que la enfermedad es ligeramente mayor en bovinos *B. taurus* en comparación con *B. indicus*, pero no se encontró que exista diferencia en relación a los signos clínicos entre las diferentes razas. Más bien se concluyó que tanto en razas cebuinas y taurinas puede haber una reacción severa, lo que implica que las razas cebuinas en situación de campo no presentan mayor resistencia a la anaplasmosis una vez los animales contrajeron la enfermedad. Sin embargo, se evidencio que la cantidad de anticuerpos circulantes en el grupo *B. taurus* era menor en comparación con el grupo *B. indicus*, por lo que se concluyó que las razas taurinas son más vulnerables a *A. marginale*, es decir que son animales más susceptibles a contraer la enfermedad.

El aumento de los vectores dependerá de la época. Los cambios evolutivos de las garrapatas de tipo ixodidae no están restringidos a una época o estación del año, sino que hay una adaptación de las diferentes especies a la temperatura y humedad. Por ejemplo cuando hay condiciones favorables las hembras realizan la ovoposición en dos días. Si el clima es demasiado frío se puede tardar semanas o meses. El periodo de incubación está determinado por la temperatura, por lo que puede ir de 2 semanas a 7 meses. Las poblaciones de garrapatas como *Rhipicephalus* suelen disminuir durante los meses de época seca, aumentando paulatinamente conforme aumenta la humedad y temperatura (Quiroz, 2013). En el caso de *Dermacentor* los picos de abundancia en zonas templadas son en los meses de junio y julio, mientras que en zonas sub-tropicales aumentan las poblaciones en los meses de julio a agosto (Cilek, Olson, 2000).

Esmeraldas cuenta con un clima tropical monzón, ya que está influenciado por vientos provenientes del mar y la tierra. La temperatura media mensual es mayor en épocas lluviosas, alrededor de 26.6°C, entre enero y mayo y va disminuyendo paulatinamente a partir del mes de junio (Estupiñán 2013). Las precipitaciones en la costa ecuatoriana están presentes en los meses de diciembre a mayo; las mayores precipitaciones se observan entre febrero y marzo. El régimen termométrico es similar al pluviométrico, ya que los meses con mayores promedio son diciembre a mayo y los de menores promedios de junio a noviembre (Gálvez y Regalado, 2007). Estas variaciones climáticas están estrechamente relacionadas con la estabilidad enzoótica. Debido a que las poblaciones de vectores fluctúan de un año a otro, la estabilidad puede romperse y como consecuencia se eleva la proporción de animales no infectados durante la etapa de mayor resistencia. Esto provoca que los animales se infecten en la edad adulta y haya presencia de signos clínicos. Tomando en cuenta que las condiciones climáticas

no eran las más favorables durante el mes de septiembre, la prevalencia obtenida fue alta. Se recomienda hacer estudios posteriores en épocas lluviosas para determinar si la cantidad de vectores aumento y por ende la prevalencia y si se logra o no llegar a una estabilidad enzoótica. Al poder comparar las prevalencias en diferentes épocas del año también se podría determinar la forma principal de transmisión de la enfermedad. Por ejemplo si el brote ocurre en la época de mayor actividad del vector, se determina que esta es la forma de transmisión. Si ocurre 3 a 6 semanas después de procesar el ganado, sugiere que *Anaplasma* fue transferido de un animal infectado a uno susceptible durante el procesamiento. Si el brote sucede en cualquier otra época del año se asume que se debe por la llegada de nuevos animales o incremento del estrés en el hato (Whittier et al, 2009). Por último la identificación de las especies de garrapatas es importante para determinar cuál es principal agente presente y si es capaz de transmitir otro tipo de hemoparásito como la *Babesia spp.*

Los ganaderos de la zona dependen completamente en el uso de acaricidas para el control de garrapatas. Los principios activos más usados son los piretroides (cipermetrina, flumetrina) y organofosforados (Bazurto, 2014). Según George (2000) la mayoría de productores no cuentan con acceso a pautas sobre cómo obtener ganancias con sus programas de control de vectores y tampoco saben cómo detectar y resolver problemas de resistencia a acaricidas. Estas pérdidas económicas se deben por los daños directos e indirectos causados por las garrapatas como laceraciones de la piel, reducción de los niveles de producción, alteraciones reproductivas y transmisión de patógenos en este caso de *Anaplasma spp* (Lima et al, 2000). Además se le suma los gastos por tratamientos químicos, que no resuelve el problema y puede favorecer a la aparición de garrapatas resistentes y contaminación del medio ambiente (Roulston et al, 1968). Las pérdidas económicas son menores en lugares

donde se utilizan razas propias, donde los vectores y las enfermedades transmitidas por vectores han coexistido (Food and Agriculture Organization, 1984). Sin embargo la introducción de animales exóticos, sumada a la incapacidad de controlar las poblaciones de vectores rompe la estabilidad enzoótica. Esto permite que haya brotes de la enfermedad clínica en animales susceptibles. En estos casos se debe instaurar alternativas para el control de garrapatas como utilización de hospedadores resistentes (*Bos indicus* x *Bos taurus*), uso de ciertos pastos y leguminosas con propiedades acaricidas (*Commiphora erythraea*, *Artocarpus altilis*, *Stemona collinsa*, etc), mejorar los valores nutritivos de los pastos (favorecen a la función de las células T), uso de hongos entomopatógenos (micopesticidas), pájaros, hormigas, avispas parasitoides y ácaros (Wharton, 1983; Samish y Rehace, 1999; Jonsson y Piper 2007; Abbas et al, 2014). Estos constituyen alternativas menos contaminantes y tóxicas para el ambiente y el ganado. También es necesario identificar si existe resistencia a acaricidas y cuáles de los principios activos están involucrados. Esto con el fin de evitar su uso y de rotar o combinar diferentes principios activos.

En resumen, para evitar la pérdida de estabilidad enzoótica y poder mantener mejores índices de producción es necesario implementar programas de control que difieren según la prevalencia del área. La caracterización de las áreas se divide en 1) áreas altamente infectas, 2) áreas moderadamente infectadas y 3) áreas no infectadas (Whittier et al, 2009).

En el caso de áreas altamente infectadas los animales suelen infectarse naturalmente. En estos lugares la mayoría de animales están infectados, llegando hasta el 100%. La estrategia consiste en vacunar animales a partir de los 6 meses de edad y aquellos que ingresan por primera vez al hato. La recomendación es que se aplique 2 dosis separadas por 4 semanas. El calendario a usar debe permitir que la segunda dosis se aplique al menos dos semanas antes

de que empiece la temporada de vectores. Los refuerzos deben ser seguidos según las recomendaciones del fabricante. El problema es que animales vacunados van a resultar positivos en pruebas para detectar anaplasmosis, ya que no se puede distinguir entre vacunados e infectados naturalmente. Los tratamientos con tetraciclinas e imidocarb son utilizados de manera profiláctica (Anexo 1). El tipo de protocolo que se deberá usar dependerá de la situación y necesidades de cada hato (Anexo 2). La administración oral de clortetraciclinas en sales minerales a dosis de 0.1 a 0.25 mg/lb durante la temporada del vector ayuda a prevenir la aparición de anaplasmosis clínica. La desventaja de este método es que puede permitir la aparición de animales portadores o prolongar el periodo de incubación, permitiendo la aparición de anaplasmosis clínica una vez retirado el medicamento. Existen diferentes terapias antibióticas para eliminar el estado de portador en estos animales, sin embargo no hay seguridad de que la infección desaparezca totalmente (Anexo 2). La clortetraciclina se puede usar en dosis de 0,5mg/lb/día por 120 días o 5 mg/lb/día por 60 días en el alimento, sales minerales mixtas medicadas o por medio de bloques de alimento medicado. La oxitetraciclina se puede administrar de manera subcutánea a una dosis de 9 mg/lb en 4 dosis con 3 días de intervalo (Whittier et al, 2009; Trabattoni, 2015). El imidocarb al ser un agente que elimina y metaboliza lentamente es ideal para tratamiento y profilaxis. La dosis recomendada es de 3 mg/kg (2.5 ml cada 100 kg). Administrar 5 a 7 días después de la introducción del ganado al potrero y repetir dosis a los 33 días (MSD Animal Health, 2018). Dosis esterilizante es de 5 mg/kg (Trabattoni, 2015).

En áreas donde la infección es moderada existen dos estrategias. La primera tiene como objetivo mantener al hato negativo a anaplasmosis a través de la administración de clortetraciclina oral u oxitetraciclina de manera inyectable, durante la temporada del vector

(Anexo 2). La segunda estrategia por la que se puede optar es la vacunación de animales sobre los 6 meses de edad. En áreas donde no hay infección es necesario un monitoreo continuo. Observar por signos sugerentes a anaplasmosis. Un veterinario debe examinar animales que hayan muerto por cuasas desconocidas ya que esta es la primera señal que se observa en un brote (Whittier et al, 2009; Abbas et al, 2014) .

Para complementar las medidas de prevención antes mencionadas es importante el uso racional de garrapaticidas. La aplicación de acaricidas cada 3 semanas durante la época de mayor población de garrapatas se recomienda en lugares donde la resistencia es común. Sin embargo esto puede ser un factor predisponente por lo que no se debe exceder más de 5 veces por temporada. Otra opción es la rotación de acaricidas con diferentes modos de acción e inclusive la mezcla de diferentes principios activos. La rotación de potreros en conjunto con acaricidas es un método efectivo para controlar a estos parásitos. Lo que se debe hacer es dejar los potreros libres de ganado hasta que las larvas mueran. El uso de corrales de engorde o feedlots disminuyen el riesgo de infestación ya que las condiciones no son las ideales para las etapas de vida libre de las garrapatas. Los factores importantes que se deben considerar son una buena ventilación, limpieza completa de forma rutinaria, densidad animal óptima y buena administración de alimento y agua. Dietas ricas en proteínas favorecen a la función de las células T que juegan un rol importante frente a la resistencia adquirida contra estos parásitos. Además de tener un manejo adecuado de fómites contaminados con sangre de animales enfermos. Por ejemplo no utilizar las mismas agujas en muchos animales o hacer una limpieza adecuada del equipo. Se puede usar blanqueador diluyendo 3 onzas por galón de agua (Whittier et al, 2009; Abbas et al, 2014).

Por último, se debe seleccionar áreas endémicas con ganado genéticamente resistente a las garrapatas. También se debe permitir la posibilidad de infección dentro del primer año de vida, debido a que los animales jóvenes son naturalmente resistente a la enfermedad. (Corpoica, 1996; Cipolini, et al., 2006; Aubry y Gale, 2011). La implementación de estas medidas preventivas se podría lograr por medio de la creación de un plan nacional en el que se incluya charlas, talleres y asistencia veterinaria para productores pequeños.

CONCLUSIONES

- Al tomar en cuenta las características de los predios existen animales susceptibles que han sido movilizados sin vacunación, hay mal manejo de potreros, uso irracional de garrapaticidas e insecticidas.
- La prevalencia del 86% es alta, sin embargo está ligada a factores como la raza, mal uso de garrapaticidas, falta de vacunación y movilización de animales susceptibles por lo que no existe estabilidad enzoótica durante la época de muestreo.
- Identificación de los productos relacionados con resistencia para el control de vectores.
- Identificación de los vectores para determinar cuál es de mayor importancia y poder determinar que otras posibles enfermedades están presentes en estas zonas.
- La capacitación de los pequeños productores y la proporción de asistencia veterinaria mejoraría la producción ganadera de estas zonas. Se debe abarcar temas como la vacunación de animales, manejo adecuado de material contaminado con sangre, introducción de animales de zonas libres de la enfermedad para predios libres,

cuarentenas y diluciones adecuadas de los productos garrapaticidas para evitar la resistencia.

- Es necesario realizar otros estudios abarcando más cantones de Esmeraldas para determinar la prevalencia de toda la provincia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, R. Z., Zaman, M. A., Colwell, D. D., Gilleard, J., y Iqbal, Z. (2014). Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Veterinary Parasitology*, 203, 6-20.
- Aguilar-Barojas, S. (2005). Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. *Salud en Tabasco*, 11 (1-2), 333-338.
- Alderink, F. G., y Dietrich, R. (1981). Anaplasmosis in Texas: epidemiologic and economic data from a questionnaire survey. *Proc. Natl. Anaplasmosis. Conf*, 7, 27-47.
- Andrews, A., Blowey, R., Boyd, H., Eddy, R. (2004). *Bovine medicine diseases and husbandry of cattle*. Oxford: Blackwell science Ltd.
- Ashuma, Sharma, A., Das Singla, L., Kaur, P., Singh Bal, M., Kaur Batth, B., y Dutt Juyal, P. (2013). Prevalence and haemato-biochemical profile of *Anaplasma marginale* infection in dairy animals of Punjab (India). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6 (2), 139-144.
- Aubry, P., y Geale, D. W. (2011). A Review of Bovine Anaplasmosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58, 1-30.
- Barros, S., Madruga, C., Araújo, F., Menk, C., O de Almeida, M., Melo, E., y Kessler, R. (2005). Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100 (6), 513-517.

- Barzuto, D. (2014). Incidencia productiva y socioeconómica en productores de ganado bovino doble propósito en cuatro cantones del litoral, como consecuencia del grado de empoderamiento de tecnologías promovidas por el iniap (Tesis de pregrado). Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo, Ecuador.
- Benavides, E., Vizcaino, O., Britto, C., Romero, A., & Rubio, A. (2000). Attenuated Trivalent Vaccine against Babesiosis and Anaplasmosis in Colombia. *Ann N Y Acad Sci*, 613-616.
- Birdane, F., Sevinc, F., & Derinbay, O. (2006). ANAPLASMA MARGINALE INFECTIONS IN DAIRY CATTLE: CLINICAL DISEASE WITH HIGH SEROPREVALENCE . *Bull Vet INst Pulawy*, 467-470.
- Celi, M. (2013). Diagnóstico de Anaplasma spp. y Babesia spp. en el ganado bovino que se faena en el Camal Frigorífico "CAFRILOSA" de Loja mediante la técnica de Giemsa (Tesis de pregrado). Universidad de Loja, Loja, Ecuador.
- Cilek, J.E., Olson, M.A. (2000). Seasonal distribution and abundance of ticks (Acari: Ixodidae) in northwestern Florida. *Journal of Medical Entomology*, 37, 439-444.
- Cipolini, M. F., Jacobo, R. A., Draghi, G., y Martinez, D. E. (2006). Detección de anticuerpo contra Anaplasmosis Bovina en el departamento de Bella Vista, Corrientes. Obtenido de: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt2006/04-Veterinarias/2006-V-045.pdf>
- CORPOICA (1996). *Epidemiología, diagnóstico y control de enfermedades parasitarias en bovinos*. Medellín, Colombia: CORPOICA.

- Cossío, R., Rodríguez, S., García, M., García, D., & Aboytes, R. (1997). Bovine anaplasmosis prevalence in northern Veracruz state, Mexico. *Prev Vet Med*, 165-170.
- De la Fuente, J., Torina, A., Naranjo, V., Caracappa, S., Vicente, J., Mangold, A., Vicari, D., Alongi, A., Scimeca, S., y Kocan, K. (2005). Genetic Diversity of *Anaplasma marginale* Strains from Cattle Farms in the Province of Palermo, Sicily. *J. Vet. Med*, 52, 226-229.
- Díaz, D., Valera, Z., Andrade, E. d., Parra, O., Escalona, F., & Ramírez, R. (2003). PREVALENCIA DE *Anaplasma marginale* EN BOVINOS DEL SECTOR LA PIÑATA, MUNICIPIO LA CAÑADA DE URDANETA, ESTADO ZULIA, VENEZUELA. *Revista Científica*, 193-198.
- Escobar, A., Cevallos, O., Villareal, P., Zambrano, S., Nieto, H., Carranza, M., y Pinargote, E. (2014). Prevalencia de anaplasmosis en bovinos de la zona central del Litoral Ecuatoriano. *Spanish Journal of Rural Developmente*, 2, 41-48.
- Escobar, A., Cevallos, O., & Villarreal, P. (2015). Prevalencia y detección por PCR anidada de *Anaplasma marginale* en bovinos y garrapatas en la zona central del Litoral ecuatoriano. *Ciencia y Tecnología*, 11-17.
- Estupiñan, B. (2013). Políticas locales de cambio climático en el Cantón Esmeraldas 2013-2022 (Tesis de posgrado). Instituto De Altos Estudios Nacionales. Quito, Ecuador.
- Fernández, N. (2007). E.L.I.S.A: Enzyme Linked Inmuno Sorbent Assay. Obtenido de: <http://www.higiene.edu.uy/parasito/trabajos/elisa.pdf>
- Fivaz, B., Petney, T., y Horak, I. (1992). *Tick Vector Biology*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

- French, D. M., McElwain, T. F., McGuire, T. C., y Palmer, G. H. (1998). Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. *Infect Immun*, 66 (3), 1200-1207.
- Food and Agriculture Organization (1984). Module 1: Ticks: Acaricide Resistance: Diagnosis, Management and Prevention. Obtenido de: <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/010/ag014e/ag014e05.pdf>
- Gale, K.R., Dimmock, C. M., Gartside, M., y Leatch, G. (1996). *Anaplasma marginale*: detection of carrier cattle by PCR-ELISA. *Int J Parasitol*, 26 (10), 1103-1109.
- Gálvez, H., y Regalado, J. (2007). Características de las precipitaciones, la temperatura del aire y los vientos en la costa ecuatoriana. obtenido de: https://www.inocar.mil.ec/web/phocadownloadpap/actas_oceanograficas/acta14/OC E1401_25.pdf
- George, J. E. (2000). Present and future technologies for tick control. *Ann NY Acad Scie*, 916, 583-588.
- Gioia, G. V., Vinueza, R. L., Marsont, M., Devillers, E., Cruz, M., Petit, E., Boulouis, H. J., Moutailler, S., Monroy, F., Coello, M. A., Gondard, M., Bournez, L., Haddad, N., y Zanella, G. (2018). Bovine anaplasmosis and tick-borne pathogens in cattle of the Galapagos Islands. *Transbound Emerg Dis*, 1-10.
- Jonsson, N. N., Piper, E. K. (2007). Integrated control programs for ticks on cattle. Australia, Brisbane: UQ Printery.
- Kocan, K., de la Fuente, J., Blouin, E., & Coetzee, J. (2008). The Natural History of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, 1-53.

- Kearney, S. (2013). Acaricide (chemical) resistance in cattle ticks. obtenido de:
https://dpir.nt.gov.au/__data/assets/pdf_file/0007/233269/845.pdf
- Kocan, K., de la Fuente, J., Guglielmone, A., & Meléndez, R. (2003). Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(4), 698-712. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC207124/#r98>
- Kocan, K., de la Fuente, J., Blouin, E., Coetzee, J., y Ewing, S.A. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, 167, 95-107.
- Laguna, E. (2005). Prevalencia de Babesiosis y Anaplasmosis en vacas en producción de la sección C distrito de Majes provincia de Caylloma, Departamento de Arequipa 2003. Tesis de pregrado. UNAS, Arequipa, Perú.
- León, M., Ribera, H., & Villegas, F. (2010). *DETECCION DE ANTICUERPOS IgG CONTRA Babesia bovis, Babesia bigemina y Anaplasma marginale EN BOVINOS (Municipios de Roboré y San José de Chiquitos del Departamento de Santa Cruz)*. Obtenido de [http://www.fcv.uagrm.edu.bo/sistemabibliotecario/doc_tesis/LEON,%20MARLEN E-20101124-095644.pdf](http://www.fcv.uagrm.edu.bo/sistemabibliotecario/doc_tesis/LEON,%20MARLEN%20E-20101124-095644.pdf)
- Lima W S, M F Ribeiro, M P Guimaraes. 2000. Seasonal variation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in cattle in Minas Gerais State, Brazil. *Trop Anim Health Prod*, 32, 375-380.

- Luther, D. G., Cox, H. U., y Nelson, W. O. (1980). Comparisons of serotests with calf inoculations for detection of carriers in anaplasmosis-vaccinated cattle. *Am J Vet Res*, 41 (12), 2085-2086.
- Luther, D. G. (2007). History of our anaplasmosis vaccine. obtenido de : <http://www.anaplasmosisvaccine.com/history.html>
- Luzarraga, A. (2015). Incidencia de *Anaplasma bovis* (*Anaplasma marginale*) en hatos bovinos de las asociaciones ganaderas del cantón Vinces de los Ríos (Tesis de pregrado). Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.
- Medina-Naranjo, V. L., Reyna-Bello, A., Tavares-Marques, L. M., Campos, A. M., Ron-Román, J. W., Moyano, Jarrín-Porras, E. C., Sandoval-Morejón, E. D., y Chávez-Larrea, M. A. (2017). Diagnóstico de los hemotrópicos *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma* spp. y *Babesia* spp. mediante las técnicas de ELISA y PCR en tres fincas ganaderas de la provincia de Pastaza, Ecuador. *Revista Científica*, 27 (3), 162-171.
- Monroy, M. (2015). *Determinación de la seroprevalencia de Anaplasma marginale, a través del Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) en la población Bovina de la provincia de Galápagos-Ecuador* (Tesis de pregrado). Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador.
- MSD Animal Health (2018). Antiparasitario Hemático. Control de Anaplasmosis y Piroplasmosis. obtenido de: http://www.msd-salud-animal.ec/products/imizol/020_informaci_n_del_producto.aspx

Mtshali, M., de la Fuente, J. Ruybal, P., Kocan, K., Vicente, J., Mbatia, P., Shkap, V., Blouin, E., Mohale, N., Moloi, T., Spickett, A., y Latif, A. (2007). Prevalence and Genetic Diversity of *Anaplasma marginale* Strains in Cattle in South Africa. *Zoonoses and Public Health*, 54, 23-30.

Muñoz-Guarnizo, T., Ayora-Fernández, P., y Chamba-Puglla, S. (2013). Prevalencia de Anaplasmosis bovina en el cantón Yantzaza, Provincia de Zamora Chinchipe. *Centro de Biotecnología*, 2 (1), 45-52.

Muñoz, T., Ayora, P., y Jiménez, V. (2014). Prevalencia de *Anaplasma marginale* mediante extendidos sanguíneos en el cantón Zamora, Provincia de Zamora Chinchipe. *Centro de Biotecnología*, 3 (1), 44-51.

Muñoz-Guarnizo, T. R., Ayora-Fernández, P., Luzuriaga-Neira, A., Corona-González, B., Martínez-Marrero, S. (2017). Prevalencia de *Anaplasma marginale* en bovinos de la provincia de Zamora Chinchipe, Ecuador. *Rev. Salud Anim*, 39 (1), 68-74.

Organización Mundial de Sanidad Animal. (2015). *Manual Terrestre de la OIE 2015*.
Obtenido de Anaplasmosis Bovina :
http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.01_Anaplasmosis_bovina.pdf

Organización Mundial de Sanidad Animal. (2017). *Animal Health situation*. Obtenido de:
https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/animalsituation

- Palmer, G. H., Rurangirwa, F. R., Kocan, K. M., y Brown, W. C. (1999). Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitology Today*, 15 (7), 281-286.
- Parra, M. H., Pelaez, L., Segura, F., Arcos, J. C., Londoño, J. E., Diaz, E., y Vanegas, M. (1999). *Manejo Integrado de Garrapatas en Bovinos*. Ibagué, Colombia: CORPOICA
- Parker, R. J., Shepherd, R. K., Trueman, K. F. (1985). Susceptibility of *Bos indicus* and *Bos taurus* to *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina* infections. *Veterinary Parasitology*, 17 (1), 205- 213.
- Quiroz, R. H. (2013). *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. México: Limusa
- Quiroz-Castañeda, R., Amaro-Estrada, I., y Rodriguez-Camarillo, S. (2016). *Anaplasma marginale*: Diversity, Virulence and Vaccine Landscape through a Genomics Approach. *BioMed Research Internacional*, 2016, 1-18.
- Richey, E. J., y Palmer, G. H. (1990). Bovine anaplasmosis. *Pract. Vet*, 12, 1661-1668.
- Samish, M., y Rehacek, J. (1999). Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annu Rev Entomol*, 44, 159-182.
- Svanova (n.d). *Identifying Anaplasma marginales in cattle populations*. obtenido de: http://www.svanova.com/content/dam/internet/ah/svanova/dk_EN/documents/bovine/A.Marginale_Infosheet_V2.pdf
- Swift, B. L., y Thom, G. M. (1983). Bovine anaplasmosis elimination of the carrier state with injectable long-acting oxytetracycline. *Am. J. Vet. Med. Assoc.* 183, 63- 65.

Soto, K. (30 de noviembre de 2010). Determinación de la prevalencia de anaplasmosis en el ganado bovino faenado en la Empresa Metropolitana de Rastro de Quito (EMRQ) mediante la aplicación de las técnicas de diagnóstico: microscopía de frotis sanguíneo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ensayo inmunoenzimático competitivo (cELISA) (tesis de pregrado). Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.

Tana-Hernández, L. R., Reyna-Bello, A., Ron-Román, J., Chávez-Larrea, M. A. (2016). PCR in the diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle populations of Ecuador and its further molecular identification by 16s ribosoma sequencing. obtenido de: https://www.researchgate.net/profile/Jorge_Ron-Roman/publication/308327000_PCR_in_the_diagnosis_of_Anaplasma_marginale_in_cattle_populations_of_Ecuador_and_its_further_molecular_identification_by_16S_ribosoma_sequencing/links/57e0e71108aec6ce9f28f958/PCR-in-the-diagnosis-of-Anaplasma-marginale-in-cattle-populations-of-Ecuador-and-its-further-molecular-identification-by-16S-ribosoma-sequencing.pdf

The Center for Food Security and Public Health. (2013). *Ehrlichiosis and Anaplasmosis: Zoonotic Species*. Obtenido de <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/ehrlichiosis.pdf>

Torioni De Echaide, S., Knowles, D. P., McGuire, T. C., Palmer, G. H., Suarez C. E., y McElwain, T. F. (1998). Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *J. Clin. Vaccine Immunol*, 14, 262-268.

- Trabattoni, E. (2015). Tratamiento y Vacunación en Anaplasmosis y Babesiosis en Bovinos. Recopilación Bibliográfica. obtenido de: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/Bovinos_garrapatas_tristeza/44-tratamiento_y_vacunacion.pdf
- Vargas, O. (2014). *Prevalencia de hemoparásitos (Trypanosoma spp, Anaplasma spp, Babesia spp.) en tres núcleos productores bovinos, de la parroquia de Santa Rosa, cantón el Chaco, Provincia del Napo* (Tesis de pregrado). Universidad de las Americas, Quito, Ecuador.
- Veterinary Medical Research and Development (2017). *Veterinary Diagnostic Test Kits and Reagents*. obtenido de: <https://www.vmr.com/core/files/vmr/uploads/files/VMRD%20Catalog%202017.pdf>
- Viseshakul, N., Kamper, S., Bowie, M. V., y Barbet, A. F. (2000). Sequence and expression analysis of a surface antigen gene family of the rickettsia *Anaplasma marginale*. *Gene*, 253 (1), 45-53.
- Wharton, R. H. (1983). Tick-borne livestock diseases and their vectors. Acaricide resistance and alternative methods of tick control. *Wld Anim Rev*, 36, 34-41.
- Whittier, D., Currin, N., y Currin, J. (2009). Anaplasmosis in Beef cattle. *Virginia Cooperative Extension*. Obtenido de: https://pubs.ext.vt.edu/content/dam/pubs_ext_vt_edu/400/400-465/400-465_pdf.pdf

Yáñez, C. (2013). Determinación de la Incidencia de Anaplasmosis y Babesiosis en el ganado bovino sometido a explotación en la parroquia Huigra, cantón Alausí, porvincia de Chimborazo (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.

Zaugg, J. L. (1985). Bovine anaplasmosis: Transplacental transmission as it relates to stage of gestation. *American Journal of Veterinaru Research*, 46 (3), 570-572.

ANEXOS

Anexo A: Lista de medicamentos para tratamiento de anaplasmosis bovina

Tratamiento	
Medicamento	Dosis
Oxitetraciclina soluble (Clorhidrato) Retiro: leche 3 días – carne 10 días Presentación comercial: 500 mg/ml	10 mg/kg. Vía IM o EV
Oxitetraciclina LA (Base) Retiro: leche 6 días – carne 28 días Presentación comercial: 200 mg/ml	20 mg/kg. Vía IM
Imidocarb Dipropionato Retiro dosis no esterilizante: leche 6 días – carne 7 meses Retiro dosis esterilizante: 14 días Presentación: Imizol (Intervet Ecuador) de 120 mg/ml	Dosis no esterilizante: 3 mg/kg (2.5 ml cada 100 kg) Dosis esterilizante: 5 mg/kg (2.5 ml cada 100 kg)

(Trabattoni, 2015)

Anexo B: Lista de protocolos de tratamiento para anaplasmosis bovina

Protocolos de Tratamiento	
Protocolo N° 1 Anaplasmosis Clínica	Se obtiene mejores resultados al iniciar el tratamiento antes de que el hematocrito descienda por debajo del 15%. Si el % de eritrocitos infectados es mayor al 15%, el tratamiento es poco efectivo y la recuperación dependerá de la médula ósea.

	<p>Opción a) Clásico: elegir una de las dos drogas</p> <p>Oxitetraciclina soluble (Clorhidrato): 10 mg/kg IM o EV (2 ml cada 10 kg), una dosis diaria, durante cuatro días bien...</p> <p>Oxitetraciclina LA: 20 mg/kg, IM (1 ml cada 10 kg), una dosis.</p> <p>Opción b) De elección: “Tratamiento combinado” (aplicar en el mismo momento pero en puntos diferentes)</p> <p>Oxitetraciclina Soluble: 5 mg/kg IM o EV (1 ml cada 10 kg), una dosis. +</p> <p>Oxitetraciclina LA: 20 mg/kg, IM (1 ml cada 10 kg) una dosis.</p>
<p>Protocolo N°</p> <p>2</p> <p>Eliminación de estado de portador o esterilización del animal</p>	<p>Opción a) Oxitetraciclina LA: 20 mg/kg, (1 ml cada 10 kg), IM, en total 3 dosis, con 7 días de intervalo entre cada una. Opción b) Oxitetraciclina Soluble: 20 mg/kg (4 ml cada 10 kg), IM o EV, una dosis diaria durante 5 días.</p> <p>Opción c) Oxitetraciclina Soluble: 10 mg/kg I (2 ml cada 10 kg), M o EV, una dosis diaria durante 10 días.</p>
<p>Protocolo N°</p> <p>3</p> <p>Medicación durante la estación del año donde hay más vectores</p>	<p>Opción a) Oxitetraciclina LA: 20 mg/kg, (1 ml cada 10 kg), IM, una dosis diaria, cada 21 a 28 días.</p> <p>Opción b) Oxitetraciclina Soluble: 10 mg/kg (2 ml cada 10 kg), IM o EV, una dosis diaria, cada 21 a 28 días.</p>

<p>Protocolo N° 4 Brote severo de Anaplasmosis</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Realizar un protocolo de vacunación bajo control veterinario porque pueden haber reacciones adversas. 2. Aplicar tratamiento combinado a todos los animales. 3. Luego tomar muestras de sangre en una proporción del 10% del hato (con un mínimo de 20 y máximo de 100 muestras). 4. A los 7 días del tratamiento vacunar animales. 5. Hacer control de temperatura y otros signos de la enfermedad 10 días después de la aplicación de la vacuna. En lote grande tomar lote testigo. 6. Si hay signos de la enfermedad tratar al lote a los 30 días posteriores a la vacunación con oxitetraciclina LA 20 mg/kg IM, una dosis. No hay riesgo de esterilizar.
<p>Protocolo N° 5 Identificación y tratamiento de los portadores</p>	<ul style="list-style-type: none"> • % de animales positivos a ELISA inferior al 8%: hay bajo riesgo de aparición de casos clínicos. Identificar por medio del test de ELISA (anticuerpos) a todos los positivos y eliminar el estado de portador (esterilizar). Definir si es necesario vacunar a terneros de entre 4 y 10 meses de edad. • % de animales positivos a ELISA entre el 8 al 75%: Identificar por medio del test de ELISA a todos los positivos y eliminar a todos los portadores (esterilizar). Vacunar a terneros de entre 4 y 10 meses de edad.

	<ul style="list-style-type: none"> • % de animales positivos a ELISA superior al 75%: tratamiento masivo. No es necesario vacunar. 				
Protocolo N° 6 Vacunación masiva y control con Imidocarb a los 28 días post vacunación	Categoría	Rango de preñez en días	Aplicación de vacuna monovalente	Aplicación Imidocarb28 días post vacunación Dosis/animal cc/100 kg	Observaciones
	Ternero 4-11 meses	0	Si	0	Controlar posibles casos de enfermedad al días 30-45 pos- vacunación
	Vaquillonas > 11 meses preñadas	35- 150	Si	2,5	
		151- 282	No	1	Vacunar luego del parto con el criterio de vaca vacía y hacer profilaxis con Imidocarb

	Vacas secas	Vacías	0	Si	1	
		Preñadas	35-150	Si	2,5	
			151-282	Si	1	Vacunar luego del parto con el criterio de vaca vacía y hacer profilaxis con Imidocarb
	Vacas en ordeño	Vacías	0	Si	1	
		Preñadas	35-150	Si	2,5	
			151-220	No	1	Vacunar luego del parto con el criterio de vaca vacía y hacer profilaxis con Imidocarb

(Trabattoni, 2015)