

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias de la Salud

**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**

María Fernanda Monroy Baroja

Rommel L. Vinueza S., Dr. MSc., Director de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de
Médico Veterinario

Quito, mayo de 2015

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias de la Salud

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**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**

María Fernanda Monroy Baroja

Lenin Vinueza, Dr. MSc.
Director de Tesis

.....

Gabriela Chávez, DMVZ. Esp.
Miembro del Comité de Tesis

.....

Francisco Cabrera, DMVZ.
Miembro del Comité de Tesis

.....

Sebastián Galecio, DMVZ.
Miembro del Comité de Tesis

.....

Ivette Dueñas, Dra., MSc.
Decana de Escuela de Medicina Veterinaria

.....

Quito, mayo de 2015

© DERECHOS DE AUTOR

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

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

Firma:

Nombre: María Fernanda Monroy Baroja

C. I.: 1717528267

Fecha: Quito, mayo de 2015

DEDICATORIA

A mi familia por todo el apoyo y cariño que me brindan siempre.

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que colaboraron de manera directa o indirecta en la elaboración de este trabajo. A mi familia por creer en mí, a mis compañeras de carrera por el apoyo que me supieron dar durante todos estos años y a todos mis profesores que lograron incentivarme para ser cada día mejor, especialmente al Dr. Lenin Vinuesa por haberme brindado su conocimiento para realizar un trabajo de calidad y ayudarme a crecer tanto profesional como personalmente.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la seroprevalencia de *Anaplasma marginale* en una muestra probabilística representativa, de los predios de las 3 principales islas (Isabela, Santa Cruz y San Cristóbal) de la provincia de Galápagos-Ecuador, mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) indirecto basado en la proteína principal de superficie 5 recombinante (rMSP5). Las muestras de suero fueron obtenidas de 184 bovinos de 33 predios de las islas. La seroprevalencia general de anaplasmosis fue de 64.1% y por isla fue de 67.4%, 64.1% y 60.9% en Isabela, Santa Cruz y San Cristóbal, respectivamente. Los resultados indican que la exposición de los bovinos a *A. marginale* es común en los predios ganaderos de las islas Galápagos y la situación de inestabilidad enzoótica probablemente se debe al inadecuado control de los vectores.

Palabras claves: *Anaplasma marginale*, seroprevalencia, garrapatas, MSP5, Galápagos.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the seroprevalence of *Anaplasma marginale* in a representative probability sample of cattle farms of the 3 main islands (Isabela, Santa Cruz and San Cristobal) of the province of Galapagos-Ecuador by the recombinant truncated MSP5 (rMSP5) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Serum samples were obtained from 184 cattle from 33 herds of the islands. The overall seroprevalence was 64.1% and by island was 67.4%, 64.1% y 60.9% in Isabela, Santa Cruz y San Cristobal, respectively. The results indicated that exposure of cattle to *A. marginale* is common in cattle herds of Galapagos Islands and endemic instability situation probably is due to inadequate vector control.

Keywords: *Anaplasma marginale*, seroprevalence, ticks, MSP5, Galapagos.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	12
REVISIÓN DE LITERATURA	17
Definición	17
Historia.....	18
Etiología.....	19
Distribución geográfica.....	20
Morfología	20
Genoma	21
MSP1	22
MSP2.....	23
MSP3.....	23
MSP4.....	24
MSP5.....	24
Mecanismos de transmisión.....	25
Transmisión biológica.....	25
Transmisión mecánica.....	27
Transmisión iatrogénica	27
Transmisión transplacentaria.....	28
Ciclo evolutivo.....	28
Riesgo zoonótico.....	31
Epidemiología.....	32
Patogenia.....	36
Inmunopatología	37
Signos clínicos	38

Lesiones anatomopatológicas	39
Diagnóstico	40
Laboratorio clínico	40
Frotis sanguíneo	41
Pruebas serológicas	41
Pruebas moleculares	45
Cultivo	46
Estándar de oro o gold estándar	47
Diagnóstico diferencial	47
Tratamiento	48
Control y prevención	50
Métodos químicos	51
Métodos no químicos	53
Premunización	56
Vacunación anti-garrapatas	56
Vacunación contra <i>A. marginale</i>	57
METODOLOGÍA	62
Área de estudio	62
Estrategia de muestreo	63
Protocolo del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas indirecto (ELISA)	65
Análisis estadístico	66
RESULTADOS	67
DISCUSIÓN	69
CONCLUSIONES	79
RECOMENDACIONES	80
REFERENCIAS	82
ANEXOS	93

LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Eritrocitos infectados con <i>Anaplasma marginale</i> (flechas) teñidos con colorante de Giemsa.	21
Ilustración 2. <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	26
Ilustración 3. Ciclo de <i>A. marginale</i> en el ganado y garrapatas.....	29
Ilustración 4. Micrografía electrónica de una colonia (C) de <i>A. marginale</i> en una célula intestinal de garrapata.....	30
Ilustración 5. Personal de la ABG durante el manejo de un bovino para la toma de muestras.. ..	64
Ilustración 6. Recolección de muestras sanguíneas de la vena yugular.....	64
Ilustración 7. Recolección de muestras sanguíneas a partir de la vena coccígea.....	65

LISTA DE MAPAS

Mapa 1. Islas Galápagos.....	62
-------------------------------------	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Seroprevalencia de <i>A. marginale</i> en bovinos de las islas Galápagos.	67
--	----

INTRODUCCIÓN

Anaplasma marginale, es una bacteria intraeritrocitaria del orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceae (Ashuma *et al.*, 2013) responsable de producir la anaplasmosis bovina, que constituye una de las enfermedades transmitidas por garrapatas más prevalentes y costosas en la ganadería mundial (Suarez y Noh, 2011); no solamente por las pérdidas económicas debido a la mortalidad, disminución en la producción de leche y carne, y el costo de las medidas de control, sino también por el impacto en el comercio internacional de ganado (Center for Food Security and Public Health [CFSPH], 2008). En América Latina, se estima que esta enfermedad causa pérdidas económicas que rodean los USD 875 millones por año (Kocan *et al.*, 2003).

De acuerdo a Brayton *et al.* (2009), *Anaplasma marginale* es el patógeno transmitido por garrapatas de mayor prevalencia en bovinos a nivel mundial, siendo endémico en regiones de Norte, Sur y Centro América, así como en África, Asia y Australia, especialmente en las áreas tropicales y subtropicales (Kocan *et al.*, 2010). El principal mecanismo de transmisión de esta enfermedad es a través de vectores, específicamente en Estados Unidos las garrapatas implicadas son *Dermacentor variabilis*, *D. andersoni* y *D. alpiscitus*, mientras que *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *R. annulatus* son los principales vectores en las regiones tropicales y subtropicales (De Clercq *et al.*, 2015; Aubry & Geale, 2011; Kocan *et al.*, 2004). Adicionalmente, la transmisión mecánica sucede por insectos hematófagos como *Stomoxys calcitrans*, *Haematobia irritans* y *Tabanus spp.* (Kocan *et al.*, 2003). De forma iatrogénica, la anaplasmosis se puede transmitir mediante fómites contaminados con sangre (Asuman *et al.*, 2013) o instrumentos quirúrgicos no esterilizados (Organización Mundial de Sanidad Animal [OIE], 2004), durante los procesos de descorne, tatuado, areteado y castración

(Kocan *et al.*, 2010). Por otro lado, Barbosa *et al.*(2014) demostraron mediante análisis moleculares que existe la transmisión transplacentaria de *A. marginale*, por lo que establecen que esta vía puede contribuir a la epidemiología de la anaplasmosis en áreas endémicas.

Adicionalmente, esta bacteria forma parte del complejo de enfermedades conocido como fiebre bovina por garrapatas, que incluye letargia, anorexia marcada, disminución en la producción de leche, tos, distrés respiratorio, abortos, mortinatos y reducción en la calidad del semen (CFSPH, 2013). Este microorganismo se caracteriza por infectar exclusivamente a los eritrocitos de hospedadores vertebrados causando una enfermedad clínica aguda (Suarez y Noh, 2011). Otra característica de esta enfermedad, es que a pesar de que los animales se recuperan de la infección primaria, permanecen como portadores persistentes y continúan jugando un papel clave en la epidemiología de la enfermedad, porque sirven como reservorios de infección para otras garrapatas y para la introducción de anaplasmosis a nuevas regiones (Bilgiç *et al.*, 2013).

Actualmente, la anaplasmosis es considerada una zoonosis emergente (Doudier *et al.*, 2010). Cabe mencionar que aunque los humanos no son reservorios naturales, pueden actuar como hospedadores intermediarios accidentales (Holler *et al.*, 2013). La anaplasmosis humana predominantemente es causada por *Anaplasma phagocytophilum* (Ghafar y Amer, 2012). A través de vigilancia serológica se ha identificado que entre el 15 al 36% de las poblaciones en áreas endémicas en el mundo han estado expuestas a *A. phagocytophilum* (CFSPH, 2013). En contraste, *A. marginale* es una bacteria con hospedador específico, por lo que infecta solo a rumiantes y causa principalmente enfermedad en el ganado bovino (Kocan *et al.*, 2010).

Las especies silvestres infectadas con *Anaplasma spp.* representan un factor potencialmente importante en la epidemiología y dispersión de anaplasmosis, ya que al ser

hospedadores reservorio pueden servir como una fuente para la diseminación mecánica por distintas rutas y para la transmisión biológica por garrapatas (Kocan *et al.*, 2010). Entre las especies silvestres que han sido infectadas con *Anaplasma marginale* se encuentran el búfalo de agua (*Bubalus bubalis*), bisonte americano (*Bison bison*), venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), ciervo mulo (*Odocoileus hemionus hemionus*), venado de cola negra (*Odocoileus hemionus columbianus*) y ciervo de las Montañas Rocosas (*Cervus elaphus nelsoni*); (Kuttler, 1984; Zaugg *et al.*, 1996).

En ciertas regiones geográficas, *A. marginale* coexiste con otros hemoparásitos como *Babesia bovis* y *Theileria annulata* y su diagnóstico enfocado principalmente en el examen clínico no determina el patógeno específico ya que en estas enfermedades se presentan signos clínicos comunes (Bilgic *et al.*, 2013). El método tradicional más adecuado para identificar *Anaplasma spp.* en animales infectados en la etapa aguda, es el examen microscópico de frotis fino de sangre teñido (OIE, 2004). Sin embargo, este método es poco sensible para la detección de casos crónicos, porque tienen un nivel de bacteriemia muy bajo (Yabsley & Shock, 2013; Terkawi *et al.*, 2012). Por esta razón, los ensayos serológicos se emplean comúnmente para estudios epidemiológicos de la anaplasmosis bovina (Oliveira *et al.*, 2011). Entre las pruebas serológicas, la de preferencia es el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) debido a que ofrece mayor sensibilidad, objetividad y capacidad de adaptación para trabajar con mayor cantidad de sueros que cualquiera de las pruebas serológicas existentes (Araújo *et al.*, 1998). Se reporta que el ELISA basado en la proteína mayor de superficie 5 de *A. marginale* (rMSP-5) posee una sensibilidad de 96.9% y una especificidad de 100% (Araújo *et al.*, 2004). Por otra lado, las pruebas moleculares como la

reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple se ha utilizado para detectar *A. marginale* junto a otros patógenos en un solo procedimiento (Bilgic *et al.*, 2013).

Existe poca información de la prevalencia de anaplasmosis en bovinos en Ecuador y aunque de manera extraoficial se ha reportado la presencia de sus vectores y signos clínicos compatibles con la enfermedad (Vinueza, 2013), se desconoce si existe la presencia de anaplasmosis bovina en las Islas Galápagos. Además, es importante conocer si la anaplasmosis está presente en las Islas Galápagos debido a que la producción ganadera es un componente integral del sistema de producción agrícola y tiene un rol imperativo en el desarrollo de la economía de un país, así como en la seguridad nutricional y en el desarrollo socio-económico de pequeños y medianos ganaderos (Vasanthachar *et al.*, 2014).

De acuerdo al censo agropecuario del Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) realizado en el año 2000, la ganadería de manera directa o indirecta abarcaba entre el 70 al 80% de la zona agropecuaria de Galápagos (Chiriboga, Maignan & Fonseca, 2006). Específicamente, la actividad ganadera se concentra en las 4 islas pobladas, siendo Santa Cruz el centro de producción lechera del Archipiélago (Chiriboga, Maignan & Fonseca, 2006), que según la Agencia de Regulación y Control para la Bioseguridad y Cuarentena para Galápagos (ABG) (comunicación personal, 17 de julio 2014) posee aproximadamente 6862 cabezas de ganado, seguida por San Cristóbal con 1551 e Isabela con 1498 bovinos. Por su parte, Floreana tiene una menor cantidad de ganado y la mayoría de sus predios se encuentran en áreas de Parque Nacional (Chiriboga, Maignan & Fonseca, 2006).

Por lo mencionado anteriormente se propone la siguiente hipótesis:

1. Existe la presencia de anticuerpos contra *Anaplasma marginale* en bovinos de las islas Isabela, Santa Cruz y San Cristóbal.

Para evaluar esta hipótesis se establecieron los siguientes objetivos:

Objetivo general

Determinar la seroprevalencia de anticuerpos contra *Anaplasma marginale* en bovinos de las Islas Isabela, Santa Cruz y San Cristóbal, Galápagos - Ecuador.

Objetivos específicos

- I. Establecer la presencia/ausencia de anticuerpos contra *Anaplasma marginale* mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).
- II. Calcular los valores de prevalencia aparente obtenidos en cada isla.

REVISIÓN DE LITERATURA

Definición

Anaplasmosis es una enfermedad infecciosa aguda o crónica, no contagiosa, del ganado (Kuttler & Todorovic, 1973) transmitida por garrapatas, causada por una rickettsia intraeritrocitaria obligada, *Anaplasma marginale* (*A. marginale*). En principio, las especies de *Anaplasma* fueron reconocidas como parásitos protozoos debido a la ausencia de una pared celular tradicional e incapacidad de sintetizar lipopolisacárido y peptidoglicano (Brayton *et al.*, 2005), además no tienen la cromatina organizada en un núcleo con membrana limitante, ni retículo endoplásmico (Rodríguez *et al.*, 2003). Sin embargo, desde el año 1957, *A. marginale* se encuentra clasificada dentro de la familia Anaplasmataceae del orden Rickettsiales (Ashuma *et al.*, 2013; Hornok *et al.*, 2012, Oliveira *et al.*, 2011; OIE, 2004), perteneciente al genogrupo II de las Ehrlichias y se caracteriza por parasitar los eritrocitos maduros de los bovinos (Corona & Martínez, 2011; OIE, 2004).

Esta bacteria es responsable de importantes pérdidas económicas en la industria ganadera debido a sus efectos directos como mortalidad, reducción en la producción de leche y carne, además de los efectos indirectos relacionados con la aplicación de medidas para su control (Barros *et al.*, 2005), principalmente en áreas tropicales y subtropicales del mundo donde es endémica (Oliveira *et al.*, 2011; Kocan *et al.*, 2010). La enfermedad aguda se manifiesta con anemia, pérdida de peso y la muerte del animal (Brayton *et al.*, 2005).

El género *Anaplasma* incluye tres especies que infectan a rumiantes: *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis* (Dumler *et al.*, 2001). La anaplasmosis bovina es causada principalmente por *A. marginale* y *A. centrale*. Esta última es menos patógena para el ganado y de hecho se la ha utilizado como vacuna viva en Israel, Australia, África y Sudamérica (Kocan *et al.*, 2010).

La infección con organismos menos patógenos puede, en ocasiones, causar la enfermedad clínica. Por su parte, *A. ovis* es un parásito de ovinos y no establece infección persistente en los bovinos (Kocan *et al.*, 2010).

Historia

En el año 1893, Smith y Kilborne describieron un cuerpo bien pigmentado, pequeño, de forma cocoide, en el margen de eritrocitos y lo consideraron como una fase del ciclo de vida de *Babesia bigemina*. No fue hasta el año 1910, que Sir Arnold Theiler reconoció estos cuerpos marginales en eritrocitos teñidos de bovinos enfermos en Sudáfrica (Kocan *et al.*, 2010), como el agente causal de una enfermedad totalmente separada, a la cual denominó anaplasmosis (Kuttler & Todorovic, 1973). Theiler consideró a este organismo como un núcleo carente de protoplasma, por lo que lo llamó *Anaplasma* (Kuttler & Todorovic, 1973). Después de este reporte, la anaplasmosis fue reconocida como una enfermedad de rumiantes en zonas tropicales, subtropicales y templadas del Viejo Mundo (Ashuma *et al.*, 2013).

Además Theiler determinó correctamente que la babesiosis y anaplasmosis eran enfermedades separadas, que a menudo coexisten en un mismo animal y logró producir infecciones primarias con *A. marginale* (Kocan *et al.*, 2010). La enfermedad fue reconocida por primera vez en Estados Unidos en el año 1926 por Darlington, quien reportó que el ganado del sureste de Kansas presentaba una enfermedad febril y concluyó que se trataba de anaplasmosis (Kocan *et al.*, 2010). No se conoce la fecha aproximada ni la ruta de ingreso y diseminación de anaplasmosis en América Central y del Sur (De Clercq *et al.*, 2015).

Otros nombres con los que se conoce a la anaplasmosis bovina son enfermedad de la vesícula biliar, ranilla blanca y tristeza de los bovinos (Yáñez, 2013).

Etiología

Los organismos del orden Rickettsiales fueron reclasificados con base en el análisis genético de los genes 16S rARN, groESL y genes de proteínas de superficie y fueron asignados a una de las dos familias: Anaplasmataceae o Rickettsiaceae (Dumler *et al.*, 2001).

A diferencia de los organismos de la familia Rickettsiaceae, que son bacterias intracelulares obligadas que crecen libremente en el citoplasma de las células eucariotas, los organismos de la familia Anaplasmataceae, que también son parásitos intracelulares obligados, se caracterizan por encontrarse exclusivamente en vacuolas definidas con membranas dentro del citoplasma de las células del hospedador (Kocan *et al.*, 2010). Además, los organismos de la familia Anaplasmataceae se multiplican tanto en vertebrados como invertebrados (Kocan *et al.*, 2010).

La taxonomía de *A. marginale*, agente causal de anaplasmosis bovina, es la siguiente:

Pertenece al Genogrupo II de las *Ehrlichias*

Super Reino: *Bacteria*

Clase: *Proteobacteria*

Subclase: *Alfa*

Orden: *Rickettsiales*

Familia: *Anaplasmataceae*

Género: *Anaplasma*

Especie: *A. marginale* (CFSPH, 2013; Rivera, 2012).

Distribución geográfica

La anaplasmosis está presente en América del Norte y del Sur, África, el Caribe, Rusia, países europeos que bordean al Mediterráneo y en Medio y Lejano Oriente (Bilgic *et al.*, 2013). De acuerdo a Kocan *et al.* (2010), la enfermedad ha sido reportada en casi todos los estados de Estados Unidos y es endémica en México, América Central y del Sur y en las islas del Caribe (Kocan *et al.*, 2010). De acuerdo a la OIE (2004), *A. marginale* ha sido identificada en la mayoría de países tropicales y subtropicales, al igual que en algunas regiones templadas alrededor del mundo.

Morfología

El cuerpo intraeritrocitario de *A. marginale* mide entre 0.3 a 1.0 μm de diámetro, es pequeño, cocoide, azul oscuro o púrpura (si se utiliza la tinción Giemsa), localizado en el margen del eritrocito (Kuttler & Todorovic, 1973) (Ilustración 1). Se ha demostrado que cuerpos grandes de *Anaplasma* tienen varias unidades más pequeñas consideradas como cuerpos iniciales (Kuttler & Todorovic, 1973). De acuerdo a Rodríguez *et al.* (2003), este microorganismo forma cuerpos de inclusión mediante fisión binaria que pueden llegar a contener entre seis a ocho cuerpos iniciales.

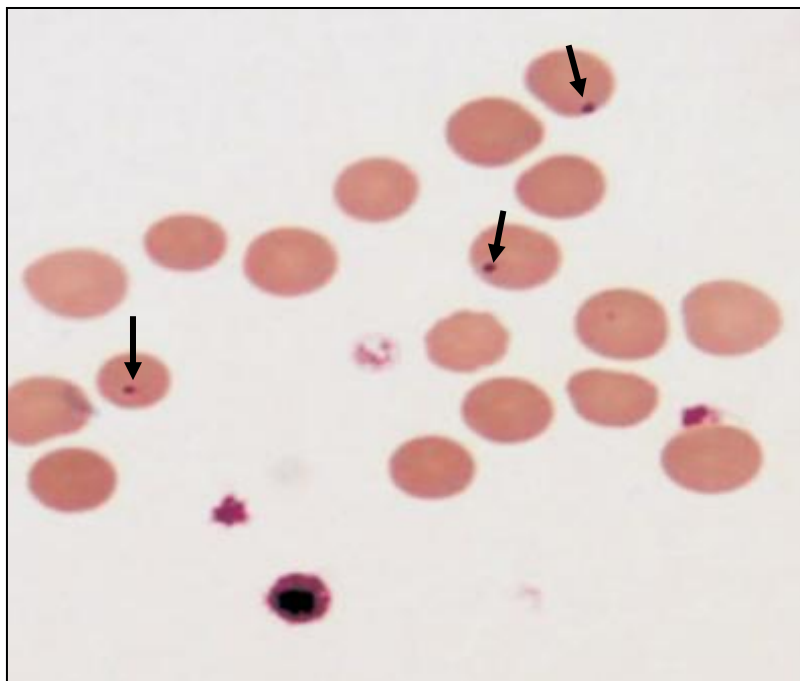


Ilustración 1. Eritrocitos infectados con *Anaplasma marginale* (flechas) teñidos con colorante de Giemsa. A partir de Ashuma *et al.*, 2013.

Genoma

Brayton *et al.* (2005) reportaron que el genoma de la cepa St. Maries de *A. marginale* contiene 1.2 millones de bases (Mb) de ácido desoxirribonucleico (ADN). De las 949 secuencias codificadas, 62 se determinaron como proteínas de la membrana externa, y de estas, 49 pertenecen a las superfamilias de proteínas principales de superficie *msp1* y *msp2* (Brayton *et al.*, 2005). Las proteínas principales de superficie (MSPs, por sus siglas en inglés) de *A. marginale* están relacionadas con las interacciones del parásito tanto con el hospedador vertebrado como con el invertebrado (Kocan *et al.*, 2010; Brayton *et al.*, 2005; Kocan *et al.*, 2003) e incluyen proteínas de adhesión y MSPs de familias multigénicas que sufren variaciones antigénicas, lo que contribuye al mantenimiento de infecciones persistentes (Kocan *et al.*, 2010). La causa de que estos genes evolucionen más rápido es

probablemente debido a que están sujetos a la presión selectiva ejercida por dos diferentes sistemas inmunes de los hospedadores (Kocan *et al.*, 2010).

Estas MPSs son útiles para comparar las cepas de *A. marginale* en distintas regiones del mundo y pueden proveer información sobre la evolución de las relaciones entre el hospedador-patógeno y vector-patógeno (Kocan *et al.*, 2010). La diversidad de cepas geográficas basadas en su genotipo, composición antigénica, morfología y capacidad de infectar a garrapatas, se debe probablemente al extenso movimiento de ganado, lo que ocasionó la introducción de múltiples cepas en regiones geográficas contribuyendo a la diversidad genética que se presenta en *A. marginale* (Kocan *et al.*, 2010).

Corona *et al.* (2001) indican que se han identificado seis MSPs en la membrana celular de *A. marginale*, denominadas MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 y la MSP5.

MSP1

Es un dímero formado por dos polipéptidos, MSP1a y MSP1b codificados por un gen de una sola copia *msp1 α* y por la familia polimórfica de genes *msp1 β* , respectivamente (Bilgic *et al.*, 2013). El fragmento variable de la proteína está expuesto en la membrana de la bacteria y se ha comprobado que interactúa en la unión con un receptor no identificado en los eritrocitos de los bovinos y con células de ciertas garrapatas (McGarey & Allred, 1994; Garcia *et al.*, 2004), por lo que se considera que MSP1 tiene un papel importante en la inmunidad del animal y en el ciclo dentro de la garrapata (Ocampo *et al.*, 2008). Esta proteína se ha utilizado como un marcador para caracterizar la diversidad genética y para identificar geográficamente las cepas de *A. marginale* (Silva, Santana & Fonseca, 2014), se

han encontrado alrededor de 131 cepas en América, Europa, Asia, África y Australia (de la Fuente *et al.*, 2007b).

MSP2

Esta proteína junto con MSP3 están asociadas a la evasión del sistema inmune y establecimiento de la infección persistente mediante un mecanismo de variación antigénica (Suárez & Noh, 2011). Ambas proteínas tienen una región hipervariable ubicada en la membrana exterior y fueron consideradas como posibles blancos para la vacunación (Suárez & Noh, 2001). Sin embargo, Abbott *et al.* (2005) demostraron que inmunizar a los bovinos con una amplia diversidad de variantes nativas de MSP2 purificadas no logró brindar protección al ganado expuesto a una cepa de *A. marginale* con una MSP2 con las mismas variantes del antígeno. Por lo que actualmente se busca identificar antígenos subdominantes ya que tienden a ser menos variables (Suárez & Noh, 2011).

MSP3

Está codificada por una familia multigénica donde la variación del gen *msp3* expresada se genera por recombinación usando pseudogenes *msp3* (Meeus *et al.*, 2003) y ha demostrado ser inmunodominante en las infecciones natural y experimental (Rivera, 2012). De acuerdo a McGuire *et al.* (1991) la detección de anticuerpos contra la MSP3 identifica el estado de portador en el ganado. No obstante, Alleman & Barbet (1996) sugieren que la MSP3 no es un candidato adecuado para ser utilizado en pruebas diagnósticas como antígeno recombinante, debido a que presenta reacciones cruzadas con *A. ovis* y algunas especies de *Ehrlichia*, aparte de que tiene una amplia variabilidad entre los diferentes aislados.

Descubrir cómo estas familias multigénicas, *msp2* y *msp3*, están reguladas y son capaces de emplear la variación antigénica para evadir el sistema inmune es un paso fundamental para entender la infección persistente en los hospedadores vertebrados (Meeus *et al.*, 2003).

MSP4

Es codificada por un único gen *msp4*, por lo que es una proteína que se conserva en todas las cepas geográficas de *A. marginale* (Rivera, 2012). No es considerada apta para la inmunización de animales, debido a que pocos sueros de animales infectados se identifican (Ocampo *et al.*, 2008). Vidotto *et al.* (2006) sugieren que las secuencias de aminoácidos del gen *msp4* se deberían utilizar para la identificación filogenética de las cepas de *A. marginale* y puede que se convierta en una herramienta fundamental para la epidemiología y control de la enfermedad.

MSP5

Esta proteína es codificada por el gen *msp5*, que tiene solamente una copia en el genoma, altamente conservada entre todas las especies de *Anaplasma* y aislados de *A. marginale* estudiados (Corona *et al.*, 2009). La MSP5 tiene una estructura poco compleja, igualmente conservada e induce altos títulos de anticuerpos (Knowles *et al.*, 1996). Por lo tanto se considera como la candidata óptima para el diagnóstico de anaplasmosis (Corona *et al.*, 2009) en bovinos y en garrapatas infectadas (Knowles *et al.*, 1996).

Mecanismos de transmisión

Anaplasma marginale puede transmitirse a través de mecanismos biológicos, mecánicos, iatrogénicos y transplacentarios.

Transmisión biológica

Las garrapatas transmiten una gran variedad de microorganismos patógenos, más que cualquier otro grupo de vectores artrópodos y representan uno de los más importantes vectores de enfermedades que afectan a los bovinos (Ameen, Abdullah & Abdul-Razaq, 2012). Las garrapatas son ácaros artrópodos (Ojeda *et al.*, 2011) responsables de varias pérdidas dentro de la producción ganadera y directamente al adherirse al hospedador, le inyectan toxinas, causan pérdida de sangre, estrés, heridas, irritación, lo que conlleva a una disminución en la producción láctea y de carne (Vasanthachar *et al.*, 2014). En Australia, las pérdidas producidas por la garrapata del ganado, *Rhipicephalus microplus*, se estimaron en USD 62 millones y en Brasil las pérdidas rodean los USD 2 billones por año (Vasanthachar *et al.*, 2014).

De acuerdo a Kocan *et al.* (2004), la transmisión biológica de *A. marginale* sucede mediante al menos 20 especies de garrapatas. En Estados Unidos, los vectores de *A. marginale* son *Dermacentor variabilis*, *D. andersoni* y *D. alpicitus*, mientras que *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Ilustración 2) y *R. annulatus* son los principales vectores en las regiones tropicales y subtropicales (De Clercq *et al.*, 2015; Aubry & Geale, 2011; Kocan *et al.*, 2004). Los miembros del género *Rhipicephalus*, que forman parte de la familia *Ixodidae* o garrapatas duras (Ojeda *et al.*, 2011), tienen una distribución geográfica amplia y establecen efectos debilitantes cuando se presentan en números elevados en un hospedador (Suárez & Noh, 2011). Adicionalmente, el control de estos vectores representa un reto, debido a que se ha reportado que son resistentes a los acaricidas de uso común (De Clercq *et al.*, 2015).

La transmisión en las garrapatas puede ser transestadial o interestadial, lo que implica que la infección con *A. marginale* pasa de una etapa a otra del ciclo de vida de las garrapatas; o intraestadial, lo que significa que dentro de una etapa específica, ya sea de larva, ninfa o adulto, el vector se infecta con el patógeno al alimentarse de un portador con *A. marginale* (CFSPH, 2013; Hornok *et al.*, 2012; Doudier *et al.*, 2010; OIE, 2004; Kocan *et al.*, 2010). La transmisión transovarial, de una generación de garrapatas a la siguiente, no ha sido demostrada, aunque es posible que los huevos de garrapatas se infecten con una frecuencia muy baja (CFSPH, 2013), por lo que el establecimiento de las infecciones persistentes de anaplasmosis en los bovinos es vital para la permanente transmisión de este patógeno (Suárez & Noh, 2011; Doudier *et al.*, 2010).

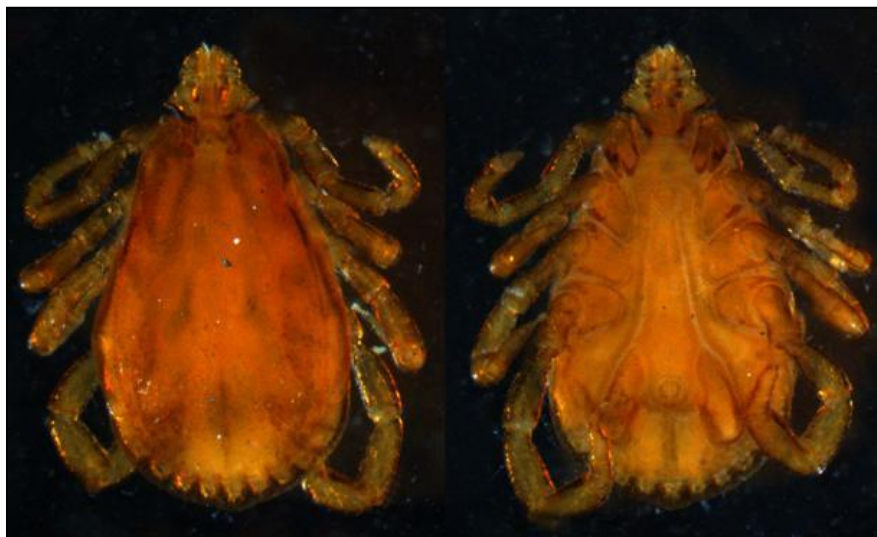


Ilustración 2. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Fotografía: Dr. J. Ostojic, Iowa State University, CFSPH, 2015.

Existen cepas de *A. marginale* que no se transmiten a través de garrapatas, como las cepas de Florida y Mississippi (Ueti *et al.*, 2007). De acuerdo a Suárez & Noh (2011), estas diferencias en el fenotipo de transmisión no se deben a un contenido genético específico de la cepa, sino posiblemente a las diferencias en los elementos genéticos compartidos, ya sea en

regiones codificantes o reguladoras. Aún con estas excepciones, la transmisión biológica por garrapatas es considerada más eficiente que la transmisión mecánica y puede promover la estabilidad enzoótica (Baldacchino *et al.*, 2014; Scoles, Miller & Foil, 2008).

Transmisión mecánica

Se considera que al menos 10 especies de dípteros hematófagos incluyendo *Stomoxys calcitrans*, *Haematobia irritans* y *Tabanus spp.* (Kocan *et al.*, 2003) son capaces de transmitir la anaplasmosis (Kuttler & Todorovic, 1973). La transmisión mecánica depende del nivel de bacteriemia del hospedador al momento de la alimentación del vector, por lo que se presume que solamente es posible durante la fase aguda de la infección, cuando la rickettsemia está en su pico máximo (Scoles *et al.*, 2008). De acuerdo a Baldacchino *et al.* (2014), la transmisión mecánica puede ser tan eficiente como la transmisión biológica bajo ciertas circunstancias y su potencial impacto es difícil de evaluar o predecir.

Transmisión iatrogénica

Sucede mediante fómites contaminados con sangre (Asuman *et al.*, 2013), por ejemplo durante la vacunación contra otras enfermedades, cuando no se utiliza una aguja nueva o esterilizada para cada animal o cuando se utilizan instrumentos quirúrgicos no esterilizados (OIE, 2004), durante los procesos de descorne, tatuado, areteado y castración (Kocan *et al.*, 2010).

Tanto la transmisión mecánica por moscas o iatrogénica parecen ser el principal modo de transmisión en áreas donde las poblaciones de garrapatas están limitadas o cuando las cepas de *A. marginale* no son transmisibles por garrapatas (Baldacchino *et al.*, 2014; Kocan *et al.*, 2010).

Transmisión transplacentaria

En la transmisión transplacentaria, los eritrocitos infectados se mueven a través de la placenta en el útero de vacas infectadas hacia sus crías, sin amplificación de *A. marginale* (Silva *et al.*, 2014). En el estudio realizado por Barbosa *et al.* (2014), los resultados de la amplificación de ADN revelaron la presencia de ADN de *A. marginale* en 41% (9/22) de las muestras sanguíneas de recién nacidos, por lo que los autores concluyeron que la transmisión transplacentaria puede contribuir a la epidemiología de anaplasmosis en áreas endémicas.

Ciclo evolutivo

La multiplicación, desarrollo y transmisión del patógeno a los hospedadores vertebrados están coordinadas con el ciclo de alimentación de la garrapata (de la Fuente *et al.*, 2007a) (Ilustración 3). Los eritrocitos bovinos infectados con *A. marginale* son ingeridos por las garrapatas y el primer sitio de infección en las garrapatas son las células intestinales, después varios tejidos de estos vectores son infectados incluidas las glándulas salivales a partir de las cuales *A. marginale* se transmite al hospedador vertebrado durante su alimentación (Rivera, 2012; Suárez & Noh, 2011; Kocan *et al.*, 2010; de la Fuente *et al.*, 2007a; Kocan *et al.*, 2004).

En cada lugar de infección dentro de las garrapatas, *A. marginale* se desarrolla dentro de inclusiones unidas a las membranas conocidas como vacuolas o colonias (Rivera, 2012; Kocan *et al.*, 2004). La primera forma de *A. marginale* se conoce como vegetativa o reticulada, esta se divide por fisión binaria, formando colonias que pueden contener centenares de organismos (Kocan *et al.*, 2010) (Ilustración 4). La forma reticulada se transforma en la

forma densa o infectiva, la cual puede sobrevivir por un corto periodo de tiempo fuera de las células (Kocan *et al.*, 2010; de la Fuente *et al.*, 2007a).

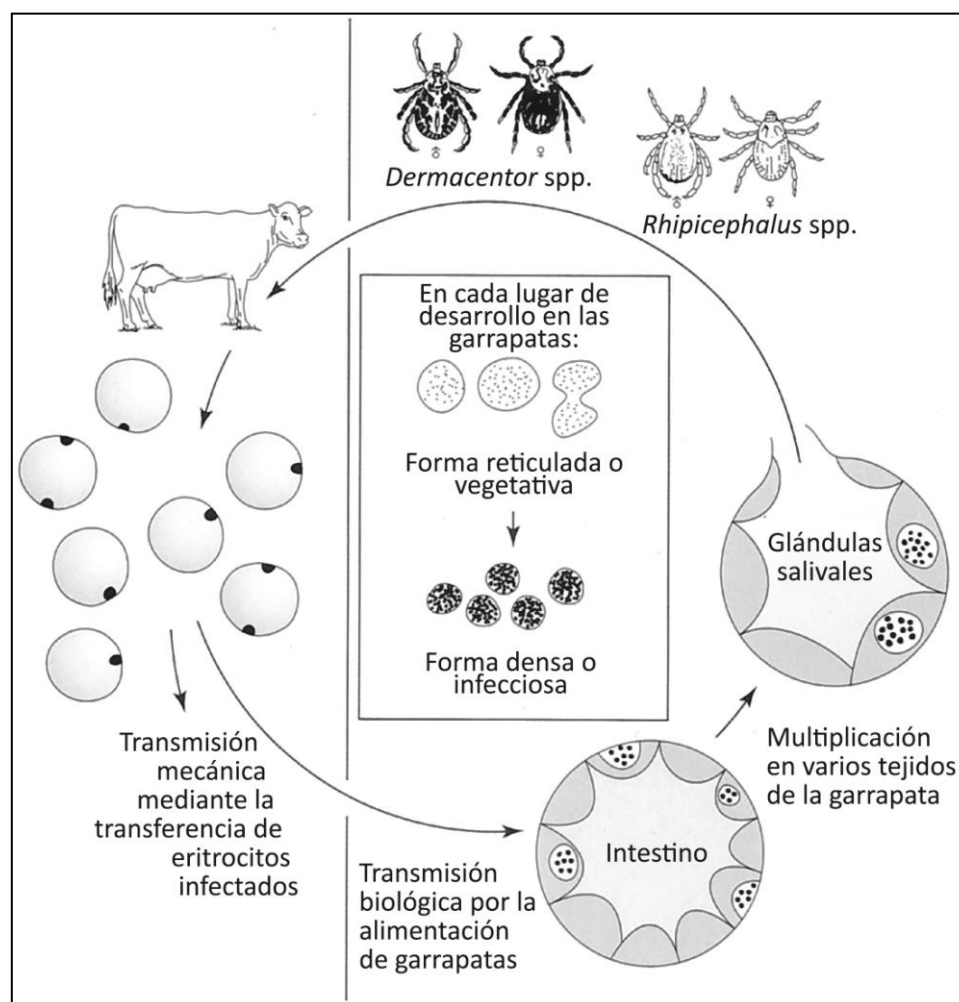


Ilustración 3. Ciclo de *A. marginale* en el ganado y garrapatas. A partir de Kocan *et al.*, 2003.

Una vez que *A. marginale* se encuentra en la circulación sanguínea del bovino, penetra por invaginación a los eritrocitos sin que exista destrucción de las células, se recluye en una vacuola y comienza a multiplicarse mediante fisión binaria dentro de cuerpos de inclusión (Yáñez, 2013).

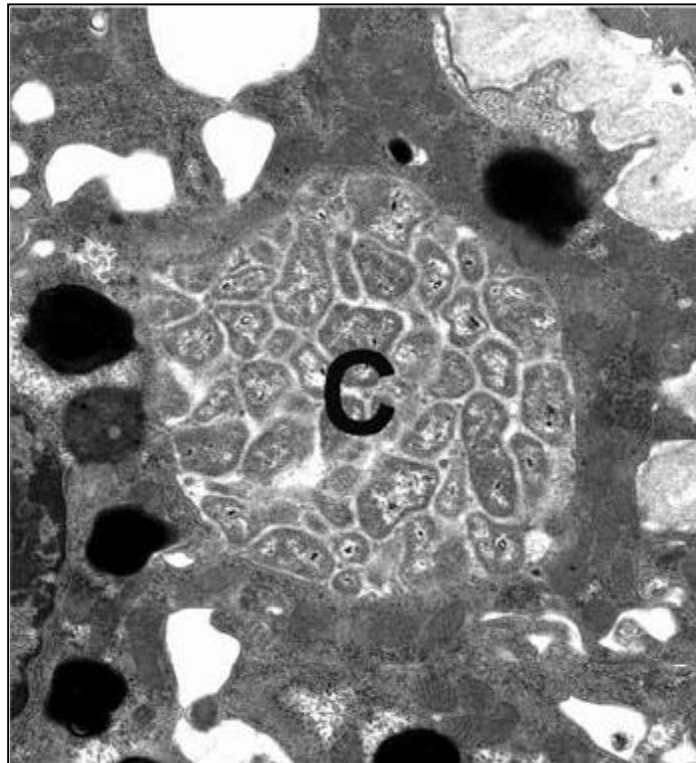


Ilustración 4. Micrografía electrónica de una colonia (C) de *A. marginale* en una célula intestinal de garrapata. A partir de Kocan *et al.*, 2004.

De acuerdo a Kocan *et al.* (2010), los eritrocitos son el único sitio conocido de infección de *A. marginale* en los bovinos, aunque recientemente se comprobó que también las células endoteliales son infectadas por esta rickettsia y se cree que es ahí donde la bacteria permanece en los portadores (Yáñez, 2013).

Tanto el ganado como las garrapatas macho desarrollan infecciones persistentes de *A. marginale*, por lo que sirven como reservorios de infección para la transmisión mecánica o biológica del patógeno (Kocan *et al.*, 2010).

Riesgo zoonótico

A pesar de que la anaplasmosis es conocida hace muchos años en la medicina veterinaria, actualmente es considerada una enfermedad emergente ya que el número de casos reportados ha aumentado en las dos últimas décadas debido a las mejoras en las técnicas de diagnóstico y programas de vigilancia, así como a los cambios ambientales, crecimiento de poblaciones humanas susceptibles (Doudier *et al.*, 2010), comercio y viajes (Kilpatrick & Randolph, 2012). El ser humano es un hospedador accidental que se infecta por la picadura de una garrapata infectada con rickettsias (Doudier *et al.*, 2010).

La anaplasmosis granulocítica humana, es una enfermedad sistémica febril y su severidad varía desde un cuadro asintomático o con síntomas no específicos parecidos a los de la gripe, hasta la muerte por falla multiorgánica (Ghafar & Amer, 2012; Zhang *et al.*, 2011). El agente causal de esta zoonosis es *Anaplasma phagocytophilum*, perteneciente al orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceae (Ghafar & Amer, 2012). Los principales vectores de *A. phagocytophilum*, a nivel mundial son las garrapatas *Ixodes* como: *Ixodes scapularis*, *Ixodes pacificus*, *Ixodes ricinus* y *Ixodes persulcatus* (Zhang *et al.*, 2011). Por otro lado, la seroprevalencia de *A. phagocytophilum* en bovinos es muy baja, de acuerdo a los resultados del estudio realizado por Zhang *et al.* (2012) fue del 0%, mientras que en perros y cabras fue de 33.3% y 0.8%, respectivamente.

En contraste, *Anaplasma marginale* tiene un hospedador específico, por lo que solo infecta a rumiantes y provoca la enfermedad principalmente en el ganado bovino (Kocan *et al.*, 2010). Según la OIE (2004), no se han reportado infecciones por *A. marginale* en humanos. Sin embargo, es probable que en el futuro se reconozcan más patógenos humanos

dentro de la familia Anaplasmataceae, a medida que se desarrollen estudios clínico-epidemiológicos, prospectivos bien diseñados (Doudier *et al.*, 2010).

Epidemiología

Según Díaz *et al.* (2003), existen dos condiciones epidemiológicas en la anaplasmosis:

1. Estabilidad enzoótica: en esta situación una gran parte del rebaño desarrolla inmunidad contra el agente etiológico sin presentar signos clínicos, debido a que más del 75% de los terneros son expuestos a una carga suficiente del microorganismo antes de los 9 meses de edad, lo que promueve la seroconversión y disminuye el riesgo de que la enfermedad se presente en la edad adulta. De acuerdo a Silva *et al.* (2006), en esta situación, el riesgo de que suceda un brote es muy bajo.
2. Inestabilidad enzoótica: sucede cuando entre el 10 al 75% de la población bovina llega a los 9 meses de edad sin enfrentarse a la infección de *A. marginale*, por lo que la seroconversión no sucede, aumentando significativamente el riesgo de la enfermedad en la ganadería. En producciones donde menos del 10% de los terneros son expuestos a *A. marginale* antes de los 9 meses, los rebaños son susceptibles pero tienen un bajo riesgo, ya que la tasa de inoculación es insuficiente para infectar a los animales en la adultez (Díaz *et al.*, 2003).

Se debe tomar en consideración que a parte del mecanismo de transmisión, también la edad, raza, cantidad de vectores presentes y densidad poblacional, son importantes factores en la epidemiología de anaplasmosis (Barbosa *et al.*, 2014).

Con respecto a la edad, los terneros menores a un año de edad son por lo general más resistentes y la infección en estos animales pasa desapercibida (Kuttler & Todorovic, 1973). El

incremento de edad, se asocia con una infección progresivamente más grave, las infecciones agudas ocurren en bovinos de 2 a 3 años pero las infecciones severas son más comunes en animales mayores a los 4 años (Kuttler & Todorovic, 1973).

También la seroprevalencia de anaplasmosis varía significativamente según la raza (Barbosa *et al.*, 2014). Al respecto, Atif *et al.* (2013b) determinaron una mayor seroprevalencia en animales mestizos en comparación con el ganado autóctono. Esta menor prevalencia en las razas originarias de la región indican que los animales tienen una resistencia inherente a las infestaciones por garrapatas (Swai *et al.*, 2005) sobre todo si son de la especie *Bos indicus*, que usualmente es considerada resistente a *Anaplasma* y otras infecciones hemoparasitarias pero que sirven como portadores de la infección para ganado susceptible *Bos taurus* (Barbosa *et al.*, 2014; Ashuma *et al.*, 2013, Henrioud, 2011; Rodríguez *et al.*, 2003). Sin embargo, de acuerdo a Silva & Fonseca (2013) los animales de la especie *Bos indicus* presentaron 5.21 veces más probabilidad de ser seropositivos a *A. marginale* en comparación con los bovinos *Bos taurus* (Silva & Fonseca, 2013) e igualmente Sackett & Holmes (2006) establecen que el ganado *Bos indicus* y sus cruces son susceptibles a *A. marginale*.

Por su parte, Hamou *et al.* (2012) no reportaron una asociación significativa por raza con la prevalencia de anaplasmosis aunque existió una prevalencia ligeramente mayor en ganado importado en comparación con razas mestizas y autóctonas. Barbosa *et al.* (2014) mencionan que el ganado susceptible altamente especializado de áreas no endémicas es más propenso a infectarse cuando es introducido en zonas de alta endemicidad o en lugares donde las poblaciones de garrapatas fluctúan durante el año.

Los hospedadores mamíferos o aves, al igual que las garrapatas con una infección persistente de *Anaplasma spp.* pueden servir como reservorios naturales de la enfermedad

(Kashif *et al.*, 2014) y fuente de infección para los vectores artrópodos (Hornok *et al.*, 2012). El estado de portador sucede por la evasión del sistema inmune del hospedador como resultado de las variantes emergentes de *A. marginale* y su replicación antigénica (Aubry & Geale, 2011). De acuerdo a Atif *et al.* (2013a), la identificación de portadores es importante desde el punto de vista epidemiológico, así como para la planificación de estrategias de prevención y control, ya que los brotes pueden ocurrir cuando el ganado portador, que ha sido incorrectamente diagnosticado como libre de la infección, es transportado a áreas no endémicas, introduciendo la enfermedad a nuevas regiones y constituyendo la fuente de anaplasmosis para garrapatas no infectadas (Bilgic *et al.*, 2013). Adicionalmente, se debe considerar que incluso los animales con infección persistente al ser trasladados a otra zona endémica posiblemente no sean inmunes al desafío y exposición a nuevas cepas por ser genéticamente diferentes a la cepa de *A. marginale* a la que crearon inmunidad (Kocan *et al.*, 2010).

A pesar de que la anaplasmosis clínica ocurre principalmente en el ganado bovino, otros rumiantes como el búfalo de agua (*Bubalus bubalis*), bisonte americano (*Bison bison*), el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), el venado bura (*Odocoileus hemionus hemionus*), el venado de cola negra (*Odocoileus hemionus columbianus*) y el alce de la montaña rocosa (*Cervus elaphus nelsoni*) pueden infectarse con *A. marginale* (Zaugg *et al.*, 1996). Así lo demostraron Ashuma *et al.* (2013), en la India, quienes concluyeron que los búfalos actúan como portadores de la enfermedad, ya que no presentan signos clínicos pero albergan la infección. Igualmente, en la Isla Marajó en Brasil, Silva *et al.* (2014) identificaron a los búfalos como reservorios de *A. marginale* para el ganado que vive en la misma zona. La importancia de estas especies silvestres persistentemente infectadas con anaplasmosis, es que

sirven como reservorios de infección tanto para la transmisión mecánica como para la biológica mediante garrapatas (Kocan *et al.*, 2010).

En los sistemas de producción ganadera, principalmente de las zonas tropicales y subtropicales, la anaplasmosis es considerada una causa importante de pérdidas de productividad, por la morbilidad y mortalidad de los animales y por sus efectos negativos en la ganancia de carne y producción de leche (FAO, 2003). De acuerdo a la FAO (2003), por cada 1400 garrapatas adultas por año, se calcula una pérdida de un kg de carne por animal. Considerando que un bovino puede albergar entre 25000 a 95000 garrapatas por año, con un promedio de 55000, se estima que la pérdida total es entre 18 a 68 kg de carne por animal (Yáñez, 2013). Por otro lado, la producción de leche también se ve afectada, ya que una garrapata succiona entre 0.5 a 3 mL de sangre durante su fase parasitaria, lo que implica que la glándula mamaria recibe menos aporte sanguíneo (Yáñez, 2013). Según Vasanthachar *et al.* (2014), en cruces de vacas Holstein con Zebú, una infestación promedio con 105 garrapatas, provoca una reducción del 23% en la producción diaria de leche. Además, la piel de los animales infestados con garrapatas sufre una disminución de hasta un 90% de su valor comercial (Yáñez, 2013). Asimismo, las garrapatas provocan una disminución en los parámetros reproductivos y dificultan la importación de razas mejoradas para aumentar la calidad genética de los animales dentro de áreas afectadas (Rodríguez *et al.*, 2006).

En áreas endémicas, los productores sospechan de anaplasmosis por la historia de brotes pasados de la enfermedad en la localidad y usualmente estos brotes suceden en las estaciones calientes y húmedas, cuando la transmisión por vectores es más prevalente (Kocan *et al.*, 2010).

Patogenia

El periodo de incubación de la infección varía dependiendo de la dosis infectiva y puede ser desde 7 a 60 días, con un promedio de 28 días (Aubry & Geale, 2011; Kocan *et al.*, 2010). En condiciones de laboratorio, el periodo de incubación puede ser de 2 a 3 días cuando se utilizan varios inoculados de sangre contaminada, mientras que al utilizar pequeñas cantidad de inoculados, el periodo puede extenderse desde los 60 a 80 días (Kuttler & Todorovic, 1973).

Una vez en el torrente sanguíneo, *A. marginale* ingresa por endocitosis a los eritrocitos, donde forma una vacuola en la cual se multiplica por fisión binaria para formar ocho cuerpos iniciales (Rivera, 2012). Posteriormente, el número de eritrocitos infectados aumenta exponencialmente (Kocan *et al.*, 2010). La eritrofagocitosis inicia por el daño parasitario a los eritrocitos, lo que conlleva a la disminución de los glóbulos rojos, desarrollando una ligera o severa anemia con ictericia sin presencia de hemoglobinemia o hemoglobinuria (Kocan *et al.*, 2010). La anemia también es consecuencia de los elevados niveles de los productos del complemento activados y la remoción de eritrocitos destruidos por el sistema reticuloendotelial del bovino (Kashif *et al.*, 2014; Ashuma *et al.*, 2013). El nivel de anemia máxima sucede de uno a seis días después del inicio de la infección y persiste por 4 a 15 días, donde alrededor del 75% de los eritrocitos se eliminan del torrente sanguíneo (Yáñez, 2013).

En la fase aguda de la enfermedad existe un porcentaje de bacteriemia alto, según Singh *et al.* (2012) y Scoles *et al.* (2008), el número de eritrocitos infectados en esta fase es de 10^9 eritrocitos infectados por milímetro de sangre. El periodo de convalecencia dura uno a dos meses, en este, existe un incremento de la hematopoyesis, con probabilidad de recurrencia de la bacteriemia (Yáñez, 2013) y después de algunas semanas, los valores hematológicos

regresan a la normalidad (Rivera, 2012). Durante la infección persistente, los animales mantienen un nivel bajo de rickettsemia de por vida que va entre $10^{2.5}$ a 10^6 eritrocitos infectados/ml (Scoles *et al.*, 2008). Estos animales portadores, tienen inmunidad de por vida y a partir de la exposición al desafío, no desarrollan la enfermedad clínica (Kocan *et al.*, 2010).

Inmunopatología

Todavía no se entienden completamente los mecanismos de control inmune de *A. marginale* (Suárez & Noh, 2011; Bautista, 1996), los cuales probablemente están influenciados por las características genéticas, la raza y edad del individuo (Bautista, 1996). Con respecto a la edad, se conoce que la anaplasmosis es moderada en terneros de hasta un año de edad, aguda pero no fatal en animales menores de dos años, aguda y ocasionalmente fatal en individuos de hasta tres años e hiperaguda y frecuentemente fatal en animales de más de tres años (Bautista, 1996).

Rodríguez *et al.* (2003) y Vidotto & Marangoni (2001) establecen que los mecanismos de inmunidad celular y humoral participan en coordinación para controlar la infección. Un modelo de inmunidad inducida por vacunación sugiere que los epítomos de superficie del patógeno son identificados por anticuerpos en combinación con la activación de macrófagos para aumentar la fagocitosis y muerte (Kocan *et al.*, 2010). Las células destacadas en este modelo son los linfocitos T CD4 que expresan interferón gamma (IFN- γ), el cual promueve la síntesis de la subclase de inmunoglobulina G dos (IgG2), que se encarga de la opsonización de los eritrocitos infectados y de los cuerpos inaciales libres de *A. marginale* y concomitantemente activa a los macrófagos para aumentar la expresión de receptores, fagocitosis, fusión fagolisosomal y liberación de óxido nítrico de manera extracelular en el bazo (Kocan *et al.*,

2010; Rodríguez *et al.*, 2003). Además del IFN- γ , la interleucina 2 (IL-2), interleucina 1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) intervienen en la respuesta inmune al igual que la mayoría de las MSPs de *A. marginale* que cumplen un papel importante durante la infección y mantenimiento de la persistencia de la enfermedad (Rodríguez *et al.*, 2003).

Signos clínicos

La enfermedad clínica ocurre durante la fase aguda, donde el número de eritrocitos infectados es de $\sim 10^7$ a $\sim 10^9$ / ml de sangre (Scoles *et al.*, 2008). En general, los signos clínicos que se han reportado en anaplasmosis son: anemia hemolítica, anorexia, pérdida de peso, fiebre de hasta 41°C, mucosas pálidas, ictericia, taquicardia, disnea, letargia, lagrimeo, salivación, diarrea, micción frecuente, atonía ruminal y en algunos casos, la muerte en menos de 24 horas posiblemente por los pirógenos endógenos liberados por *A. marginale* que causan la destrucción de eritrocitos y la activación de los centros hematopoyéticos y de termorregulación del cuerpo (Ashuma *et al.*, 2013; Hornok *et al.*, 2012; Kocan *et al.*, 2010; Vidotto & Marangoni, 2001). La producción de leche disminuye, las vacas preñadas pueden abortar durante el último tercio de la gestación y en los toros se puede desarrollar infertilidad temporal (Rivera, 2012; Kocan *et al.*, 2010). En el estudio realizado por Florio, Tamasaukas & Rivera (2012) se identificó una asociación entre una baja condición corporal y mucosas pálidas con la presencia de hemoparásitos y anemia.

La pirexia es comúnmente el primer signo que se presenta en la anaplasmosis y puede ocurrir previamente a la infección del 1% de eritrocitos, la fiebre de más de 40°C puede persistir durante el periodo de incremento de la bacteriemia (Kocan *et al.*, 2010). En la enfermedad avanzada, el ganado desarrolla atonía gastrointestinal, estasis ruminal y

constipación, que se asocian con deshidratación y pérdida de peso (Kocan *et al.*, 2010). La ictericia sucede por la liberación de los pigmentos durante la hemólisis extravascular (Singh *et al.*, 2012), usualmente aparece al final del curso de la enfermedad y con más frecuencia en el periodo temprano de convalecencia (Kocan *et al.*, 2010; OIE, 2004). Algunos animales pueden presentar déficits neurológicos, que se atribuyen a episodios de anoxia cerebral (Kocan *et al.*, 2010).

La recuperación es más común en animales jóvenes, en adultos se han reportado tasas de mortalidad de 50-60%, especialmente en animales viejos sometidos a estrés (Kocan *et al.*, 2010). Frecuentemente, cuando los signos clínicos son muy severos, el animal puede estar cerca de la muerte (Kuttler & Todorovic, 1973) y no es raro que los bovinos infectados mueran durante el manejo preparatorio para el tratamiento (Kocan *et al.*, 2010).

Lesiones anatomopatológicas

Los hallazgos de necropsia incluyen mucosas pálidas e ictericas, esplenomegalia y hepatomegalia (Rivera, 2012; Kocan *et al.*, 2010; Kuttler & Todorovic, 1973). La vesícula biliar puede contener bilis oscura y viscosa, en el epicardio se evidencian hemorragias petequiales, también los linfonodos se encuentran edematizados y con petequias (Kuttler & Todorovic, 1979). No existen cambios patológicos característicos atribuibles a *A. marginale* en portadores con infecciones crónicas (Kuttler & Todorovic, 1973).

Diagnóstico

Laboratorio clínico

En los resultados de hemograma se puede evidenciar una disminución en el recuento de glóbulos rojos, concentración de hemoglobina y porcentaje de hematocrito, con linfocitosis (Ashuma *et al.*, 2013; Hornok *et al.*, 2012). Mientras que en los resultados de la bioquímica sanguínea, se revela un incremento significativo de la concentración de proteína total, bilirrubina total y cantidad de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) lo que indica una disfunción hepática (Ashuma *et al.*, 2013). De acuerdo a los resultados de la investigación de Ashuma *et al.* (2013), la mayoría de bovinos con anaplasmosis presentan valores dentro de los rangos de referencia del volumen corpuscular medio (VCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), por lo que concluyen que es frecuente la presencia de anemia normocítica normocrómica, lo que refleja que el sistema hematopoyético del bovino se activa en respuesta a la eritrofagocitosis (Ashuma *et al.*, 2013). También la cantidad de globulinas aumenta, lo que demuestra que el sistema inmune está activado para combatir la infección en el organismo del hospedador (Ashuma *et al.*, 2013).

Sin embargo, debido a la dificultad de diagnosticar infecciones de *A. marginale* solamente basándose en los hallazgos clínicos y resultados de laboratorio, existe una serie de técnicas de laboratorio empleadas para la detección de esta enfermedad en el ganado (Bacanelli, Ramos & Araújo, 2014). El diagnóstico de la anaplasmosis bovina se puede realizar principalmente mediante frotis sanguíneos, técnicas serológicas y moleculares (Barbosa *et al.*, 2014; Kocan *et al.*, 2010). Es importante resaltar que las pruebas serológicas y

moleculares son los únicos medios para identificar a los animales portadores con una infección subclínica persistente (Kocan *et al.*, 2010).

Frotis sanguíneo

Es la técnica diagnóstica de referencia y el método más común para la identificación de anaplasmosis en animales clínicamente sospechosos (Singh, 2012; OIE, 2004). Los frotis sanguíneos finos teñidos con Giemsa, Wright Giemsa o Diff-Quick, pueden facilitar la demostración de *A. marginale* en los eritrocitos (Kocan *et al.*, 2010). En los frotis, *A. marginale* se encuentra dentro de los eritrocitos como cuerpos densos y redondeados de 0.3-1.0 μm de diámetro, situados en la zona marginal del eritrocito (OIE, 2004). En animales vivos, las muestras sanguíneas se deben obtener preferentemente de la vena yugular o vena coccígea (OIE, 2004). Es importante tener en cuenta que después de la transmisión, la infección se hace microscópicamente visible entre 2 a 6 semanas (OIE, 2004). En casos post-mortem, los frotis se realizan con los órganos internos como hígado, riñón, corazón y pulmones y de la sangre que se encuentra en vasos periféricos (OIE, 2004).

En la fase aguda, esta técnica tiene una sensibilidad baja y especificidad alta. Sin embargo, no es recomendada para la detección de la infección subclínica en animales portadores (Barbosa *et al.*, 2014; Ashuma *et al.*, 2013; Kocan *et al.*, 2010), ya que no posee suficiente sensibilidad y especificidad (Hamou *et al.*, 2012).

Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas que se utilizan comúnmente para el diagnóstico de *A. marginale* son: prueba de aglutinación, prueba de inmunofluorescencia indirecta, fijación de

complemento y ELISA indirecto (OIE, 2004). Estas pruebas se desarrollaron con la finalidad de detectar a los animales con infección persistente y se caracterizan por la variabilidad en sus resultados, debido a los diferentes niveles de sensibilidad y especificidad de cada técnica, por lo que se debe tener precaución al momento de certificar la enfermedad (OIE, 2004) y es recomendable confirmar el resultado mediante pruebas moleculares (Barbosa *et al.*, 2014), ya que existe un alto grado de probabilidad de que sucedan reacciones cruzadas entre *A. marginale* y *A. centrale* (OIE, 2004).

Prueba de aglutinación en placa

De acuerdo a la OIE (2004), la ventaja de esta técnica es que es sensible, se la puede realizar en el laboratorio o en campo y los resultados se obtienen en poco tiempo. Una desventaja de esta prueba es que pueden suceder reacciones inespecíficas (OIE, 2004). El antígeno que se utiliza es una suspensión de partículas de *A. marginale*, que se obtiene al infectar terneros esplenectomizados mediante inoculación intravenosa con sangre contaminada (OIE, 2004). Posteriormente, cuando el nivel de rickettsemia excede el 50%, el animal es exsanguinado y los eritrocitos son sometidos a procedimientos de lavado, lisis y centrifugación. Finalmente, los sedimentos se suspenden en una solución colorante para conseguir la solución de antígeno (OIE, 2004).

Fijación del complemento

Esta prueba se utiliza para la identificación de ganado infectado con *A. marginale* antes de que sea transportado dentro de un país o internacionalmente (Bradway *et al.*, 2001). Sin embargo, Coetzee *et al.* (2007) reportaron que la sensibilidad de la prueba de fijación de complemento fluctúa entre 7.5-37.5%, con un sensibilidad global de 26.5%. Igualmente,

Bradway *et al.* (2001) determinaron una sensibilidad de 20% y especificidad de 98%. Debido a su baja sensibilidad, la OIE (2004) no recomienda esta prueba para la identificación de animales portadores de *A. marginale* porque es inadecuada para la regulación de programas de vigilancia de anaplasmosis (Bradway *et al.*, 2001).

Las reacciones falsas negativas en esta prueba suceden por la ausencia de la unión de los anticuerpos de distintos isotipos al complemento de cobayos, que es lo que se utiliza en las pruebas comerciales de fijación de complemento (McGuire, 2005).

Prueba de inmunofluorescencia indirecta

Esta técnica tiene un mayor grado de detección de animales infectados, comparado con la observación microscópica de frotis de capa blanca, así lo demostraron Díaz *et al.* (2003), quienes obtuvieron una prevalencia de *A. marginale* detectada por inmunofluorescencia indirecta (IFI) de 95.4%, mientras que a través de observación de frotis de capa blanca fue de 56.9%. Las desventajas de esta técnica son el limitado número de pruebas que puede realizar al día un operador y los problemas de fluorescencia inespecífica (OIE, 2004).

Prueba de ELISA

A pesar de que se han desarrollado métodos diagnósticos moleculares para la identificación de anaplasmosis, según Kocan *et al.* (2010) las pruebas serológicas basadas en las MSPs, continúan siendo la forma más práctica para evaluar números grandes de muestras ya que se pueden examinar alrededor de 90 muestras por microplaca al mismo tiempo, el tiempo del procedimiento es corto, los resultados se leen mediante un lector de ELISA y los valores cuantitativos se obtienen rápidamente (Ekici & Sevinc, 2011). Una desventaja de esta

prueba es que puede carecer de sensibilidad adecuada para detectar la infección en animales que tienen un nivel de bacteriemia muy bajo (Bilgic *et al.*, 2013).

En los últimos años, la prueba ELISA rMSP-5 indirecto, que utiliza como antígeno a la proteína principal de superficie 5 recombinante (Barros *et al.*, 2005), la cual es una proteína conservada dentro de *Anaplasma spp.* (Hamou *et al.*, 2012) ha demostrado tener alta especificidad y de acuerdo a Knowles *et al.* (1996) se la podría utilizar a escala mundial, ya que puede detectar anticuerpos anti-*Anaplasma spp.* en el curso temprano de la infección aguda así como en el estado de portador.

En la investigación realizada por Barros *et al.* (2005), se emplearon tanto las pruebas de ELISA rMSP-5 indirecto y ELISA competitivo, demostrando que ambas técnicas son útiles para estudios seroepidemiológicos y como herramientas de evaluación para decidir las medidas preventivas que deben utilizarse. Por otro lado, las pruebas de ELISA basadas en las MSP1 y MSP2 recombinantes (sensibilidad 99% y especificidad 100%) también han demostrado tener un buen rendimiento, por lo que son adecuadas para utilizarse en estudios epidemiológicos para la detección de anticuerpos contra *A. marginale* en bovinos (Araújo *et al.*, 2004).

DOT-ELISA

Montenegro, Guillén & Toro (1992), desarrollaron el DOT-ELISA utilizando cuerpos de inclusión purificados de *A. marginale* como antígeno “doteado” o colocado en forma de mancha en discos de nitrocelulosa, para la detección de anticuerpos de *A. marginale* e indican que posee una alta sensibilidad (93%) y especificidad (96%) con un valor predictivo promedio de 95% para la identificación de anaplasmosis. Esta técnica presenta múltiples ventajas ya que se pueden procesar al mismo tiempo varios sueros, los resultados se obtienen en menos de 3

horas, la interpretación es de manera visual, no se requieren equipos especializados y por su formato en microplaca, se economizan los reactivos (Montenegro *et al.*, 1992).

Para los autores, el alto grado de especificidad se debe a que utilizaron un antígeno purificado, lo que redujó las reacciones indeseadas por la unión inespecífica de anticuerpos a la nitrocelulosa. Por otro lado, el aumento en la sensibilidad se debe al empleo de la proteína A en reemplazo de la enzima conjugada con IgG bovina, la que normalmente se emplea en ELISA (Montenegro *et al.*, 1992). El DOT-ELISA es más rápido, sencillo y objetivo para la interpretación de resultados que la prueba de IFI, por lo que puede reemplazar o complementar a esta técnica en el diagnóstico de anaplasmosis (Montenegro *et al.*, 1992).

Los mismos autores reportaron que no existieron reacciones cruzadas con sueros positivos a otras enfermedades hemoparasitarias, infecciones virales o bacterianas, por lo que recomiendan el empleo de DOT-ELISA para estudios epidemiológicos de anaplasmosis en los trópicos, debido a su sencillez, bajo costo, alta sensibilidad y especificidad (Montenegro *et al.*, 1992).

Pruebas moleculares

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se emplea para detectar bajos niveles de bacteriemia tanto en los animales reservorios como en las garrapatas (Kocan *et al.*, 2010). La técnica de PCR convencional ha sido utilizada con mayor frecuencia, por su bajo costo en comparación con la PCR a tiempo real, que posee una sensibilidad más alta y que también se puede emplear para estudios epidemiológicos de rumiantes silvestres, que presentan infecciones crónicas con bajos niveles de rickettsemia (Bacanelli *et al.*, 2014). Corona &

Martínez (2011) establecieron que el uso del gen *msp5* como diana de la PCR, resulta una técnica sensible y específica para la detección de *A. marginale*, sobre todo en los animales asintomáticos, por lo que recomiendan que se utilice para el comercio local e internacional de ganado.

Debido a que la PCR convencional se caracteriza por detectar una especie en particular y su procedimiento necesita mucho tiempo, aparte de que muchas de las muestras evaluadas pueden estar coinfectadas con otros patógenos (Bilgic *et al.*, 2013). Estos autores desarrollaron una PCR múltiple (mPCR) para la detección de *Theileria annulata*, *Babesia bovis* y *Anaplasma marginale*. Esta técnica se basa en la amplificación de dos o más loci diana de uno o más organismos utilizando una mezcla de pares de primers de locus específicos en una sola reacción (Markoulatos, Siafakas & Moncany, 2002). En este estudio, la PCR múltiple con muestras experimentales diluidas fue capaz de detectar con sensibilidad y especificidad infecciones por separado pero con muestras de campo presentó una menor sensibilidad comparado con el PCR individual (Bilgic *et al.*, 2013). Singh *et al.* (2012) reportaron que la técnica de PCR anidado es válida para la detección en condiciones de campo de bovinos portadores de *A. marginale* con niveles bajos de bacteriemia.

Cultivo

El cultivo de *A. marginale* se utiliza principalmente en la investigación y es considerado poco práctico para el diagnóstico rutinario de casos clínicos porque es difícil y requiere bastante tiempo, así como técnicas especializadas y los resultados se obtienen entre 2 a 6 semanas (CFSPH, 2013).

Luna *et al.* (2010) cultivaron *A. marginale in vitro* en células nucleadas utilizando estirpes de células endoteliales bovinas y de mono, expuestas a eritrocitos infectados con la

bacteria. Obtuvieron resultados negativos al tratar de comprobar la invasión en las células mediante técnicas de tinción, genómicas e inmunofluorescencia y tampoco observaron efectos citopatológicos. *A. marginale* se detectó por más tiempo en las células endoteliales cuando se realizó co-cultivo en las mismas comparado con cultivos de eritrocitos. Aparte lograron la seroconversión en bovinos al inocularlos con material biológico de los cultivos, a pesar de que los animales no presentaron signos clínicos de la enfermedad (Luna *et al.*, 2010). Estos avances ofrecen nuevas oportunidades en el estudio de la relación entre el hospedador vertebrado y el patógeno (Kocan *et al.*, 2010).

Estándar de oro o gold estándar

Consiste en la inoculación intravenosa de aproximadamente 500 ml de sangre del animal sospechoso en un ternero susceptible esplenectomizado (Corona *et al.*, 2014). Posteriormente, se realizan frotis sanguíneos cada 2 a 3 días, si el animal sospechoso es positivo a la enfermedad, los cuerpos de inclusión en los eritrocitos se observan a partir de la cuarta hasta octava semana (OIE, 2010). De acuerdo a la OIE (2010) este es un método costoso pero justificable para confirmar la infección en animales con infección latente.

Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial de *A. marginale* se debe realizar con enfermedades que produzcan signos clínicos similares a los que suceden en anaplasmosis (Bilgic *et al.*, 2013).

Las principales enfermedades que se deben descartar son: Antráx, Hemoglobinuria bacilar, intoxicación por roble, envenenamiento por la ingestión de especies de *Brassica*, linfosarcoma multicéntrico (Kocan *et al.*, 2010). En áreas tropicales, la anaplasmosis se puede

confundir especialmente con Leptospirosis, Babesiosis bovina, Theileriosis y Tripanosomiasis e incluso es común que el ganado esté infectado con dos o más enfermedades hemoparasitarias (Bilgic *et al.*, 2013; Kocan *et al.*, 2010; Kuttler & Todorovic, 1973). Se debe tener en cuenta que en anaplasmosis no se presenta hemoglobinuria ni hemoglobinemia, mientras que en la Babesiosis y Leptospirosis sí ocurren (OIE, 2004; Kuttler & Todorovic, 1973). El periodo de incubación de babesiosis es menor que el de anaplasmosis y la anemia no es tan severa en Tripanosomiasis y Theileriosis, comparada con Babesiosis y Anaplasmosis (Kuttler & Todorovic, 1973). Los animales jóvenes son más resistentes a la anaplasmosis, mientras que en babesiosis, la edad no es un factor determinante y en la leptospirosis los más afectados son los terneros (Kuttler & Todorovic, 1973). Además, se debe considerar que *Babesia bovis* también infecta exclusivamente los eritrocitos de los hospedadores vertebrados y que se transmite por garrapatas *Rhipicephalus* (Boophilus) (Suárez & Noh, 2011).

Tratamiento

El tratamiento antibiótico en la anaplasmosis es efectivo para disminuir la carga bacteriana y aminorar la enfermedad (Suárez & Noh, 2011). Actualmente, no existe ningún antibiótico aprobado para la eliminación de las infecciones persistentes (Mutshembele *et al.*, 2014; Kocan *et al.*, 2010; Coetzee, 2005), por lo que se debe restringir el movimiento de ganado de áreas endémicas como medida precautelara para evitar el ingreso de la enfermedad en áreas no endémicas (Kocan *et al.*, 2010). En el tratamiento de soporte se pueden incluir transfusiones de sangre y el animal debe ser manejado con calma (Rivera, 2012; Kuttler & Todorovic, 1973).

Por muchos años, el fármaco de elección para tratar la anaplasmosis aguda ha sido el imidocarb dipropionato, el cual se administra por vía subcutánea (SC) o intramuscular (IM) a una dosis de 2.1 mg/kg (Kocan *et al.*, 2010). Sin embargo, en algunos países el uso de este fármaco está prohibido, debido a la retención del producto en los tejidos consumibles de los animales de producción (Agencia Europea para la Evaluación de los Medicamentos [EMA], 1998).

Por su parte, Blouin *et al.* (2002) reportaron que la tetraciclina es eficaz para el control de la etapa aguda de la enfermedad, a una dosis entre 3 a 5 mg/kg, por vía intravenosa o intramuscular (Kuttler & Todorovic, 1973). Adicionalmente, Kocan *et al.* (2010) recomiendan la clortetraciclina y oxitetraciclina para el tratamiento de anaplasmosis aguda. Las tetraciclinas son fármacos bacteriostáticos, que actúan al unirse a la subunidad 30S de los ribosomas y ácido ribonucleico mensajero (ARNm), inhibiendo la síntesis de proteínas (Scholar & Pratt, 2000).

A pesar de que en años anteriores se han reportado resultados exitosos al usar estos medicamentos en infecciones persistentes de *A. marginale*, Kocan *et al.* (2010) consideran probable que sean hallazgos sesgados debido a que la mayoría de investigaciones utilizaron la prueba de fijación de complemento para evaluar sus resultados y esta prueba tiene una sensibilidad del 20%.

En el año 2005, Coetzee reportó que la administración de oxitetraciclina a una dosis de 30 mg/kg, vía intramuscular (IM), una o dos veces al día cada 5 días, no fue efectiva para la eliminación de infecciones persistentes. Igualmente, el tratamiento recomendado por la OIE de 5 inyecciones de oxitetraciclina al día, a una dosis de 22 mg/kg, vía intravenosa (IV) resultó inefectivo para eliminar infecciones persistentes del aislado de Oklahoma de *A. marginale*

(Coetzee, 2005). Por otro lado, en el 2010, Reinbold *et al.* demostraron que el uso oral de clortetraciclina en dosis entre 4.4 a 22 mg/kg por día por 80 días, elimina la infección persistente de *A. marginale* y lo comprobaron mediante PCR en tiempo real y por la inoculación de la sangre de los animales tratados en terneros esplenectomizados. Sin embargo, los bovinos que se recuperan del estado de portador, quedan susceptibles de reinfectarse (Felsheim *et al.*, 2010; Reinbold, 2010). Además, cada vez los tratamientos largos con antibióticos son menos aceptados debido al aumento de resistencia tanto en los patógenos humanos como de animales (Suárez & Noh, 2011).

La enrofloxacin es considerada como un candidato para el tratamiento de anaplasmosis, su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la replicación de ADN de *A. marginale* (Kocan *et al.*, 2010). Coetzee (2005) indicó que la administración de enrofloxacin a 12.5 mg/kg dos veces al día, cada 48 horas, atenúa pero no elimina la infección en terneros esplenectomizados y recomienda la ejecución de más investigaciones con este fármaco. Pues es probable que existan diferencias en la susceptibilidad a los antibióticos entre las diferentes cepas de *A. marginale* (Kocan *et al.*, 2010), tomando como fundamento la identificación de dos bombas de resistencia a múltiples fármacos en el genoma, aunque todavía no se ha descubierto la importancia clínica de las mismas (Brayton *et al.*, 2005).

Control y prevención

Las herramientas disponibles para controlar la anaplasmosis varían según el área geográfica y se basan en el uso de vacunas vivas, tratamiento antibiótico, control de los vectores y en el mantenimiento de la estabilidad enzoótica dentro de un rebaño (Vasanthachar *et al.*, 2014; Aubry & Geale, 2011; Suárez & Noh, 2011; Kocan *et al.*, 2010). Vasanthachar *et*

al. (2014), dividen los métodos para el control de las garrapatas en métodos químicos basados en el uso de acaricidas y no químicos entre los que se encuentran la limpieza de los animales, manejo de pasturas, enfoque endosimbiótico, control biológico, manipulación genética, uso de biopesticidas, acaricidas herbales y vacunación con antígenos de las garrapatas (Vasanthachar *et al.*, 2014).

Métodos químicos

Uso de acaricidas

El método químico más utilizado para programas de control son los acaricidas (amidinas, fenil ureas bencilo, hexacloruro de benceno/ciclodienos, carbamatos, lactonas macrocíclicas, organofosforados y piretroides) (Vasanthachar *et al.*, 2014). Comúnmente se pueden aplicar mediante inmersión, pulverización, inyecciones, tratamientos orales o vertidos a lo largo de la línea dorsal desde la cruz hasta la base de la cola (Vasanthachar *et al.*, 2014). Es importante que la aplicación de acaricidas sea sistemática para que sea altamente efectiva contra las garrapatas sin afectar al hospedador (Vasanthachar *et al.*, 2014).

Actualmente se conoce que un control parasitario basado solamente en el empleo de métodos químicos es una suposición falsa, ya que su uso indiscriminado puede traer consecuencias a largo plazo como el desarrollo de resistencia, por lo que no son una solución sustentable para el control futuro de vectores (Vasanthachar *et al.*, 2014; CFSPH, 2013; Henrioud, 2011). Adicionalmente, otros inconvenientes del uso de acaricidas son los residuos químicos en los productos de origen animal (carne, leche, cuero, piel), efectos indeseables en la salud animal y ecosistema y su costo de implementación (Vasanthachar *et al.*, 2014).

Para contrarrestar la resistencia a los acaricidas, se están empleando combinaciones de estos productos pero varias garrapatas ya han desarrollado una resistencia a múltiples acaricidas como a los piretroides y amitraz (Singh *et al.*, 2014). En la actualidad, las lactonas macrocíclicas (avermectinas) son efectivas contra las garrapatas pero debido a que su periodo de retiro en leche dura entre 30-40 días, no se recomienda su uso en ganadería de leche (Vasanthachar *et al.*, 2014).

Uso de repelentes

Para prevenir la transmisión mecánica por moscas y tábanos, se han desarrollado cebos impregnados con insecticida que atrapan y matan a las moscas adultas, demostrando ser una opción aceptable para el control de estas poblaciones (Baldacchino *et al.*, 2014). El insecticida recomendado es la permetrina al 1% ya que ha demostrado producir una mortalidad de 55% por un periodo mayor a 2 semanas (Baldacchino *et al.*, 2014).

Otro método para controlar la transmisión mecánica son los cebos o atrayentes que se fundamentan en el hecho de que las hembras de tábano usan el estímulo olfatorio para la localización de los hospedadores (Baldacchino *et al.*, 2014). Tanto el dióxido de carbono solo o junto a una mezcla de fenol/octenol han demostrado ser efectivos para atraer a los tábanos hacia los cebos (Cilek & Olson, 2008).

Antibioticoterapia profiláctica

Tiene un costo económico elevado por lo que no es aplicable en todos los sistemas de producción, a parte que existe el riesgo de potenciar el apareamiento de cepas resistentes de *A. marginale* (Kocan *et al.*, 2010).

Métodos no químicos

Descanso y rotación de potreros

Esta práctica consiste en dejar los pastizales sin ganado por un tiempo para romper el ciclo de vida de las garrapatas y de esta manera obtener pasturas con bajos niveles de contaminación parasitaria (FAO, 2003). Las ventajas de estas prácticas es su factibilidad de implementación y disminución en la cantidad de acaricida que se utiliza mientras que las desventajas son que los potreros se deben dejar libres por más tiempo del habitual, lo que disminuye la calidad del forraje y su grado de efectividad depende del clima, estaciones del año, suelos, topografía (FAO, 2003).

Control biológico

El control biológico forma parte del sistema de manejo integral de plagas (MIP), el cual se basa en la integración de varios componentes (métodos y prácticas) que en conjunto tienen el potencial de disminuir las poblaciones de organismos genéticamente resistentes a lo largo de generaciones sucesivas reduciendo la necesidad de aplicaciones regulares de pesticidas (Henrioud, 2011; Ojeda *et al.*, 2011). Una desventaja de este sistema es que se deben tolerar ciertos niveles de bacteriemia y pérdidas en la producción (Henrioud, 2011).

En sí el control biológico consiste en introducir un microorganismo en el ambiente de otro para controlar al parásito diana, reduciendo su población por debajo del umbral, por encima del cual provoca enfermedades clínicas y pérdidas económicas (Vasanthachar *et al.*,

2014). Los antagonistas o enemigos naturales de las garrapatas pueden ser aves, roedores, musarañas, hormigas, arañas, hongos y plantas (Vasanthachar *et al.*, 2014).

Antes de realizar una multiplicación masiva y posterior liberación de los enemigos naturales, es importante estudiar su biología e impacto ecológico (FAO, 2003). En general, los métodos biológicos son más seguros para el operador, animales y ambiente pero todavía no se han implementado exitosamente por su inestabilidad ambiental y selectividad reducida por la especie diana (Vasanthachar *et al.*, 2014).

Uso de biopesticidas

Dentro de los biopesticidas, se ha identificado recientemente un acaricida herbal que posee una actividad acaricida elevada contra las larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, tiene como componente nanopartículas de dióxido de titanio sintetizadas biológicamente a partir del extracto de la flor *Calotropis gigantea (C. gigantea)*, por lo que constituye un método eco-amigable y económico para el control de este vector (Marimuthu *et al.*, 2013).

Otra opción dentro de los biopesticidas son los que se formulan a partir de hongos entomopatógenos (Vasanthachar *et al.*, 2014). Samish, Ginsberg & Glazer (2004) establecen que virtualmente todos los ectoparásitos son susceptibles a las enfermedades fúngicas y aproximadamente de las 700 especies de hongos entomopatógenos, solamente el 10% se usan para el control de insectos.

Ojeda *et al.* (2011) establecen que el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* es un candidato para el MIP ya que ha demostrado resultados eficaces en el control de las fases parasítica y no parasítica de *R. microplus* en condiciones de laboratorio y campo. Sin

embargo, aún se requieren estudios para conocer el momento adecuado de su aplicación y frecuencia de tratamiento, aparte su producción y formulación se ven influenciadas por la sobrevivencia, virulencia y eficacia en el campo (Ojeda *et al.*, 2011).

Suplementación dietética

El mejoramiento de la dieta mediante la suplementación con proteínas de alto valor energético puede ayudar a aumentar la resistencia o tolerancia del bovino contra las infecciones parasitarias al favorecer la respuesta inmune en estas fases (FAO, 2003). Es importante tomar en cuenta esta medida de prevención porque de acuerdo a la FAO (1984) las garrapatas afectan a los animales que presentan un estado de subnutrición, lo que afecta su resistencia natural contra las infecciones transmitidas por estos vectores. Posiblemente, la mayor desventaja es el costo de su implementación (FAO, 2003).

Selección de ganado resistente a la infestación por garrapatas

La idea de desarrollar razas resistentes a las garrapatas resulta compleja en la naturaleza, ya que esta resistencia varía entre las razas y dentro de una misma raza (Vasanthachar *et al.*, 2014) y está determinada genéticamente (Henrioud, 2011). Shyma, Prakash & Singh (2013) establecieron que la heredabilidad de la resistencia a garrapatas es de aproximadamente 0.30, cantidad suficiente para obtener resultados exitosos en los programas de mejoramiento de ganado. Se debe tener en cuenta que la expresión de la resistencia depende de la estimulación de la respuesta inmune por la alimentación de las garrapatas (Henrioud, 2011).

Las ventajas de esta medida de control son el aumento de la resistencia promedio del ganado dentro de un rebaño, al mismo tiempo que disminuye las poblaciones de garrapatas y por ende la contaminación de los pastos y uso de tratamientos acaricidas (Henrioud, 2011; FAO, 2003). En general, la selección de ganado resistente es una opción para el control y prevención de anaplasmosis a largo plazo, es sostenible y puede tener un desarrollo rápido una vez que en el futuro se generen marcadores genéticos (Henrioud, 2011).

Premunización

Rivera (2012) menciona que en los países donde no existen alternativas comerciales para el control de anaplasmosis, se emplea comúnmente la premunización. Esta práctica consiste en el uso de sangre infectada de animales portadores o con infección aguda, con el fin de inducir la infección en animales sanos para que desarrollen inmunidad a pesar de que quedan como portadores. Los riesgos que implica este método son que la sangre de un caso agudo puede provocar una infección severa que no se pueda controlar en los animales inoculados y además es una vía de transmisión de otros agentes patógenos de importancia sanitaria y económica (Rivera, 2012).

Vacunación anti-garrapatas

La inmunización contra las garrapatas es una medida práctica y sostenible ya que ayuda a disminuir la contaminación ambiental y previene el desarrollo de resistencia en garrapatas por el uso repetido de acaricidas (Vasanthachar *et al.*, 2014). La vacunación con un antígeno oculto del intestino de las hembras *R. microplus* conocido como Bm86 ha

demostrado brindar una protección de más del 80% contra las infestaciones por garrapatas en los bovinos (Vasanthachar *et al.*, 2014), mediante los anticuerpos anti-Bm86 que generan la lisis de las células del intestino en las garrapatas provocando que el contenido intestinal pase a la hemolinfa (FAO, 2003). Sin embargo, la vacuna basada en el antígeno Bm86 desarrollada en Australia y Cuba, no cumple con las expectativas de efectividad en algunas áreas geográficas de América Latina (Henrioud, 2011).

El mejoramiento de las vacunas contra garrapatas contribuirá al control de las infestaciones en el ganado (de la Fuente & Kocan, 2006). Vasanthachar *et al.* (2014) comentan que para el desarrollo de una vacuna universal se deberían utilizar proteínas de las garrapatas altamente conservadas que posean variaciones antigénicas limitadas y manejables, que sean capaces de inducir una inmunidad cruzada contra diferentes especies de garrapatas. Para esto se deben descubrir y adicionar nuevos antígenos protectivos de garrapatas a las formulaciones de vacunas y desarrollar sistemas de producción que reduzcan el costo mientras aumentan la inmunogenicidad de los antígenos recombinantes (Almazán *et al.*, 2012).

Vacunación contra *A. marginale*

La vacunación ha sido una forma económica y efectiva de controlar parcialmente la anaplasmosis bovina mundialmente y existen dos tipos de vacunas: vivas y muertas o inactivas (Rivera 2012; Kocan *et al.*, 2010). Ambos tipos utilizan como antígeno los eritrocitos bovinos infectados con anaplasmosis e inducen una inmunidad protectora que previene o atenúa la enfermedad clínica pero ninguno previene que el ganado se infecte de manera persistente (Kocan *et al.*, 2010).

Probablemente las cepas de *A. marginale* puede que no generen protección cruzada, ya sea mediante vacunas vivas o antígenos en vacunas inactivas (Kocan *et al.*, 2010). Ahora se conoce por estudios filogenéticos que en la naturaleza existen más genotipos de *A. marginale* y esto posiblemente se debe al comercio internacional de ganado (de la Fuente *et al.*, 2007a). Esto sugiere que el desarrollo de vacunas atenuadas que puedan generar protección cruzada contra diversas cepas de *A. marginale* puede que no sea factible (Kocan *et al.*, 2010).

El éxito del desarrollo de nuevas vacunas usando tecnologías moleculares depende de su habilidad para inducir inmunidad cruzada entre genotipos, promover la respuesta del hospedador como sucede en las infecciones naturales o bloquear la infección en las células del hospedador (Kocan *et al.*, 2010).

Vacunas vivas

Las vacunas vivas consisten en la exposición del ganado mediante inoculación a eritrocitos infectados con *A. centrale*, cepas atenuadas de *A. marginale* o un método de infección y tratamiento (Kocan *et al.*, 2003).

Para la recolección de sangre infectiva, se utilizan terneros esplenectomizados, los cuales son mantenidos en cuarentena e inoculados experimentalmente con cepas seleccionadas (Kocan *et al.*, 2010). Se debe considerar que siempre existe el riesgo de que los donadores tengan una enfermedad hemoparasitaria asintomática que puede transmitirse a los animales vacunados (Kocan *et al.*, 2010).

La vacunación con *A. centrale* es el método con mayor aceptación (OIE, 2004) y ha sido utilizado en África, Australia, Israel y Latinoamérica (Kocan *et al.*, 2010; OIE, 2004). Esta bacteria es menos patógena e induce una inmunidad parcial cruzada contra *A. marginale*

(Kocan *et al.*, 2010; Kuttler & Todorovic, 1973). La infección por *A. centrale* es benigna en animales menores de 9 meses debido a la inmunidad inespecífica y en adultos se han reportado reacciones graves después de la vacunación (OIE, 2004). El desarrollo de la inmunidad tarda entre 6 a 8 semanas y persiste por varios años (OIE, 2004).

Kuttler & Todorovic (1973) establecen que el ganado inmunizado con este agente está protegido ante el desafío con un aislado virulento de *A. marginale* de un origen común. Sin embargo, Kocan *et al.* (2010) indican que los resultados con esta vacuna pueden variar dependiendo del genotipo de *A. marginale* al que están expuestos los animales e incluso se han reportado brotes en poblaciones inmunizadas (Turton *et al.*, 1998). Comúnmente se recomienda la vacuna de *A. centrale* congelada porque permite el control de calidad de cada lote, aunque es más costosa de producir y su transporte es más complicado en comparación con la vacuna refrigerada (OIE, 2004).

La atenuación de las cepas de *A. marginale* se produce mediante irradiación o por el paso del organismo a través de hospedadores atípicos como oveja o venado (Kocan *et al.*, 2003; Kuttler & Zaugg, 1988). La protección producida por las vacunas atenuadas generalmente no es efectiva (Kocan *et al.*, 2010).

El método de infección y tratamiento radica en infectar a terneros con *A. marginale* y después tratarlos con tetraciclina cuando presenten fiebre o se detecte la bacteriemia (Kocan *et al.*, 2010). Entre las limitaciones de este método se encuentran el requerimiento de monitoreo constante por lo que no es aplicable en hatos grandes (Kocan *et al.*, 2010) y puede que la cantidad de eritrocitos infectados sea insuficiente para inducir la respuesta inmune (Rivera, 2012). Kuttler & Todorovic (1973) determinaron que incluso con un tratamiento de tetraciclina a tiempo, se presentaba la enfermedad aguda en los animales infectados.

Vacunas muertas o inactivadas

La primera vacuna atenuada comercial utilizaba un antígeno liofilizado de *A. marginale* recuperada de eritrocitos hemolizados que se combinaba con un adyuvante oleoso al momento de la aplicación (Kuttler & Todorovic, 1973). Esta vacuna disminuyó la severidad de la anaplasmosis y la tasa de mortalidad (Kuttler & Todorovic, 1973) pero presentaba un alto grado de contaminación con estroma de eritrocitos, lo que promovía el desarrollo de isoanticuerpos eritrocíticos en los animales vacunados y anemia hemolítica en los terneros, por lo que se recomendó no vacunar a las vacas en las fases finales de la gestación (Kocan *et al.*, 2010). Una vacuna atenuada que logró la producción a gran escala del antígeno de *A. marginale* se utilizó con efectividad hasta que salió del mercado en el año 1999 (Kocan *et al.*, 2010) y hasta el momento no existe una vacuna inactivada efectiva para la prevención de la anaplasmosis bovina (Ocampo *et al.*, 2008). En el 2012, Rivera reportó que la inoculación de cuerpos iniciales de *A. marginale* inactivados y purificados mezclados con un adyuvante comercial inducen una protección específica contra anaplasmosis bovina.

Las ventajas que tienen en comparación a las vacunas vivas son que tienen un menor riesgo de contaminación con otros agentes infecciosos, se pueden almacenar a bajo costo y causan reacciones postvacunales leves (Kocan *et al.*, 2010). Las desventajas son que necesitan un refuerzo anual, el proceso de purificación de *A. marginale* a partir de los eritrocitos es muy costoso, no generan inmunidad cruzada entre aislados de áreas geográficas distantes y la inmunidad protectora que estimulan es usualmente menor a la de las vacunas vivas (Kocan *et al.*, 2010).

No se conoce la variabilidad de las proteínas de la membrana exterior entre las poblaciones de *A. marginale* de diversas regiones geográficas (Suárez & Noh, 2011) pero se

han identificado cinco proteínas de la membrana exterior, Omeps 7-9, Am779 y Am854 que no varían (Noh *et al.*, 2008) y que se podrían utilizar para el desarrollo futuro de vacunas (Suárez & Noh, 2011).

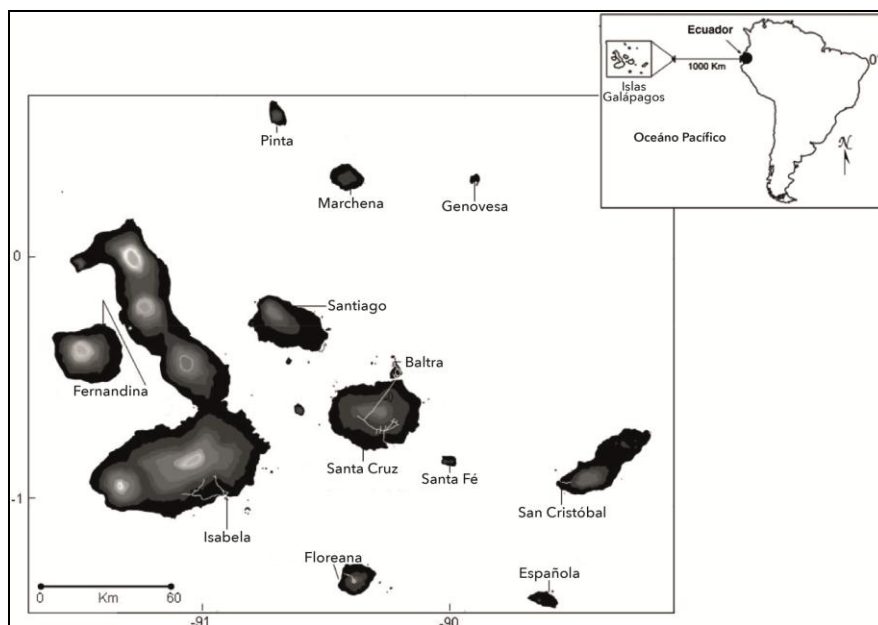
La vacuna ideal contra la anaplasmosis sería la que logre inducir inmunidad protectora y prevenir la infección del ganado y garrapatas, al mismo tiempo que afecte la capacidad vectorial de las garrapatas (Kocan *et al.*, 2010; Kocan *et al.*, 2003). Para esto se requiere una mejor comprensión de los procesos de inmunidad de *A. marginale* con la finalidad de desarrollar técnicas *in vitro* donde se puedan evaluar distintas formulaciones de vacunas y también se deben identificar genes específicos involucrados en la colonización y transmisión en las garrapatas (Suárez & Noh, 2011).

METODOLOGÍA

Área de estudio

Se realizó un estudio serológico transversal en las Islas Galápagos ($01^{\circ}40'N$ $01^{\circ}36'S$ y $089^{\circ}16'$ y $092^{\circ}01'$ W) ubicadas a 972 km al oeste de la costa ecuatoriana (Instituto Oceanográfico [INOCAR], 2011) (Mapa 1) específicamente en las zonas altas (> 200 metros sobre el nivel del mar [msnm]) de las islas Isabela, Santa Cruz y San Cristóbal, durante la temporada seca, en los meses de julio y agosto del año 2014.

Como referencia en el año 2013, según el Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI) (2014) la precipitación acumulada en la región Insular fue de 362.5 milímetros (mm) y su precipitación máxima en 24 horas fue en el mes de marzo. La temperatura media anual fue de $24.1^{\circ}C$, con temperaturas medias máxima y mínima de $29.1^{\circ}C$ y $18.3^{\circ}C$, respectivamente (INAMHI, 2014).



Mapa 1. Islas Galápagos. A partir de Alava *et al.*, (2011).

Estrategia de muestreo

En total se recolectaron 184 muestras sanguíneas de bovinos aparentemente sanos de diferentes razas, géneros y edades (Isabela (46), Santa Cruz (92), San Cristóbal (46)). Los bovinos fueron seleccionados al azar. La selección de predios ganaderos se efectuó mediante la base de datos de la ABG. En la isla Isabela se muestrearon 8 predios, en Santa Cruz 17 y en San Cristóbal 8, dando un total de 33 predios ganaderos.

Al llegar a cada predio, el personal de la ABG se encargó de lacear e inmovilizar a los bovinos por medio de sogas debido a que en la mayoría de lugares no existían mangas de manejo (Ilustración 5). La recopilación de información se realizó mediante un formulario de colección de muestras (Anexo 1). La toma de muestras sanguíneas estuvo a cargo del veterinario de la ABG. Debido a que *A. marginale* no se acumula en los capilares (OIE, 2004), las muestras se recolectaron, mediante el uso de agujas vacutainer, a partir de la vena yugular en animales jóvenes (< 2 años) (Ilustración 6) y de la vena coccígea en animales adultos (> 2 años) (Ilustración 7). Aproximadamente se recolectaron 5 ml de sangre en tubos sin anticoagulante identificados con el código del animal, predio e isla.

Posteriormente, las muestras sanguíneas se depositaron en un cooler con geles refrigerantes a una temperatura de 4 – 5 °C hasta llegar a las oficinas de la ABG donde fueron centrifugadas a 1500 revoluciones por minuto (rpm) por 10 minutos (el mismo día que fueron obtenidas) para extraer el suero. Estas muestras se colocaron en tubos Eppendorf y se almacenaron en un congelador a -20 °C hasta su traslado al laboratorio de Entomología Médica y Medicina Tropical de la USFQ, en el cual también permanecieron en un congelador a -20 °C hasta su evaluación mediante la prueba de ELISA. Durante el muestreo se comprobó la presencia de vectores y se consultó la medida de control utilizada contra estos.



Ilustración 5. Personal de la ABG durante el manejo de un bovino para la toma de muestras.
Fotografía: Omar Almeida.



Ilustración 6. Recolección de muestras sanguíneas de la vena yugular.
Fotografía: Omar Almeida.



**Ilustración 7. Recolección de muestras sanguíneas a partir de la vena coccígea.
Fotografía: Omar Almeida.**

Protocolo del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas indirecto (ELISA)

La presencia de anticuerpos contra *A. marginale* se detectó mediante la prueba de ELISA indirecta basada en la MSP5 recombinante (SVANOVIR® *A. marginale*-Ab, Svanova Biotech BA, Uppsala, Suecia). El procedimiento completo se realizó acorde al protocolo descrito por el fabricante. Todos los reactivos fueron equilibrados a temperatura ambiente (18-25 °C) antes de ser utilizados. Se realizó la pre dilución de los controles y muestras en una proporción 1/40 con el tampón fosfato salino y tween (PBS-tween, por sus siglas en inglés) (ejemplo: 10 µl de muestra en 390 µl de solución PBS-tween). Se colocaron 100 µl de controles negativos y positivos duplicados y de las muestras pre diluidas en los pocillos de las microplacas recubiertos con antígeno inactivo no infeccioso de *A. marginale*, los cuales se sellaron e incubaron a 37 °C por 30 minutos. Después se lavaron las microplacas 4 veces con

la solución PBS-tween y se adicionaron 100 µl del conjugado liofilizado (peroxidasa de rábano conjugado con anticuerpos monoclonales IgG anti-rumiantes) diluido a cada pocillo, luego se sellaron las microplacas y se incubaron a 37 °C por 30 minutos. Se volvieron a lavar 4 veces las microplacas con la solución PBS-tween y se adicionaron 100 µl de la solución sustrato a cada pocillo y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C). Para interrumpir la reacción se añadieron 100 µl de solución frenadora a cada pocillo y se procedió a mezclar bien. Después de 15 minutos de haber añadido la solución frenadora, la densidad óptica (DO) de las muestras y controles se midió a 450 nanómetros (nm) con un fotómetro para microplacas (MRX Microplate Reader, DYNEX Technologies, Inc.). La interpretación de las muestras y criterios de validez de la prueba se realizaron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante del kit.

Análisis estadístico

Los datos fueron ingresados, editados y calculados en Microsoft® Office Excel® 2007. La prueba chi-cuadrado se utilizó para establecer la diferencia estadística por medio de la significación al 95% de confianza entre las prevalencias de *A. marginale* por isla. Los valores de P para significancia fueron de $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

La seroprevalencia general de *A. marginale* de las tres principales islas del Archipiélago de Galápagos fue de 64.1% (118/184). La prevalencia más alta de anticuerpos contra *A. marginale* se registró en la isla Isabela (67.4%; 31/46), seguida por Santa Cruz (64.1%; 59/92) y San Cristóbal (60.9%; 28/46) (Gráfico 1). La prevalencia de anaplasmosis no difiere según la isla ($P > 0.05$).

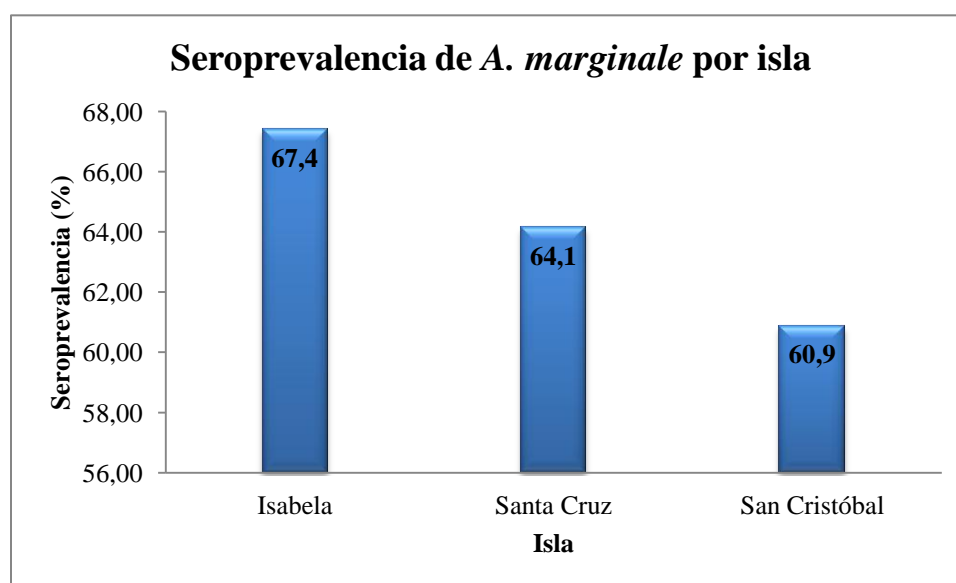


Gráfico 1. Seroprevalencia de *A. marginale* en bovinos de las islas Galápagos.

Durante la recolección de muestras se verificó una infestación moderada de garrapatas en los animales evaluados en el estudio, a pesar de que en la mayoría de predios se utilizaba un acaricida comercial cuyo principio activo pertenecía al grupo piretrinas que se deriva de las flores secas del piretro *Chrysanthemum cinerariaefolium* como principal y única medida de control contra los vectores. Para confirmar la información de la presencia de ectoparásitos, algunos especímenes fueron recolectados y transportados al laboratorio para su identificación.

La población más representativa de garrapatas estuvo constituida por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

DISCUSIÓN

La seroprevalencia total de *A. marginale* en bovinos en el archipiélago de las Islas Galápagos fue de 64.1% y por islas fue de 67.4, 64.1 y 60.9% en Isabela, Santa Cruz y San Cristóbal, respectivamente, por lo que serían menores a las seroprevalencias reportadas en la provincia de Chimborazo-Ecuador (98.0%) (Yáñez, 2013), en la empresa Empresa Metropolitana de Rastro de Quito (EMRQ) (91,2%) (Soto, 2010), Brasil (89.9%) (Trindade *et al.*, 2011), Costa Rica (87.5%) (Shebish, Vemulapalli & Oseto, 2012), Mozambique (89.1%) (Tembue *et al.*, 2011), Brasil (97.0%) (Barros *et al.*, 2005) y Kenia (89.0%) (Maloo *et al.*, 2001). Sin embargo, serían mayores a las obtenidas en Tanzania (20.0% y 37.0%) (Swai *et al.*, 2005), Puerto Rico (27.4%) (Urdaz-Rodríguez *et al.*, 2009), Costa Rica (37.2%) (Oliveira *et al.*, 2011), Bolivia (19.0-32.0%) (Carrique *et al.*, 2000), Pakistán (31.0%) (Atif *et al.*, 2013a) y Marruecos (16.5%) (Hamou *et al.*, 2012).

En general, la variación en las seroprevalencias puede correlacionarse a las prácticas de manejo, a las razas criadas en cada región, fármacos y acaricidas empleados para el control de garrapatas en las diferentes regiones geográficas (Ashuma *et al.*, 2013), así como a la sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas usadas en cada estudio (Oliveira *et al.*, 2011) y estas variaciones en las seroprevalencias de *A. marginale* entre países, promueven el desarrollo de regiones geográficas con diferentes grados de estabilidad enzoótica (Silva & Fonseca, 2013; Kocan *et al.*, 2010). Es así, que incluso dentro de un área considerada endémicamente estable, los hatos evaluados pueden tener una condición de inestabilidad, por lo que es recomendable que en estudios epidemiológicos, se considere a cada predio como una “unidad epidemiológica” en donde diferentes factores de riesgo tanto ambientales como

inmunológicos influyen en el estado de endemicidad de *A. marginale* (Barbosa *et al.*, 2014; Silva & Fonseca, 2014).

Tomando como referencia lo mencionado por Díaz *et al.* (2003) acerca de las condiciones epidemiológicas de la anaplasmosis, en el caso de los predios estudiados en el archipiélago de Galápagos debido a que su seroprevalencia fue menor del 75% es probable que exista una condición de inestabilidad enzoótica, donde entre el 10 al 75% de la población bovina llega a los 9 meses de edad sin enfrentarse a la infección de *A. marginale*, por lo que no se da la seroconversión y se produce un aumento significativo del riesgo de la enfermedad en los animales adultos (Díaz *et al.*, 2003). De acuerdo a Goodger *et al.* (1979) los brotes de anaplasmosis ocurren con un intervalo de tiempo entre 5 a 7 años debido al incremento de animales susceptibles en una región.

Dentro de una condición de inestabilidad enzoótica, Atif *et al.* (2013b) encontraron una asociación significativa ($P < 0.001$) entre diferentes grupos de edades con la anaplasmosis. A pesar de que el presente estudio no tenía como objetivo la relación entre la prevalencia de la enfermedad y las edades de los animales muestreados, se observó una mayor seroprevalencia en bovinos menores a 2 años de edad. Por su parte, Atif *et al.* (2013a) identificaron una seroprevalencia más alta de *A. marginale* en animales mayores a los 4 años de edad en comparación con bovinos menores a 1 año y entre 1 a 4 años. En contraste, Ashuma *et al.* (2013) reportaron niveles más elevados de infecciones clínicas y subclínicas en animales jóvenes en comparación con bovinos adultos y determinaron que la presencia de garrapatas en un individuo representa un papel significativo en la transmisión de la enfermedad en animales menores a un año. En el estudio realizado por Ashuma *et al.* (2013), no existió una resistencia de acuerdo a la edad de los terneros por lo que se considera que estos animales actúan como

portadores persistentes y fuentes de infección para otros bovinos en el rebaño. Por otro lado, Hamou *et al.* (2012), Trindade *et al.* (2011) y Díaz *et al.* (2003) reportaron la ausencia de diferencia significativa entre la edad y la presencia de anaplasmosis.

Estudios previos han demostrado que la edad es un factor determinante en la inmunidad de los animales contra *A. marginale*, debido a que los jóvenes son más resistentes a la infección primaria por la presencia de los anticuerpos maternos (Kocan *et al.*, 2003). Es probable que los animales jóvenes se infecten tempranamente (15-60 días de edad), por lo que se vuelven resistentes a la enfermedad cuando son adultos. Sin embargo, a lo largo del tiempo, la falta de exposición a los vectores impide la reinfección del ganado adulto, haciéndolos más susceptibles a la manifestación de la enfermedad clínica (Barbosa *et al.*, 2014). Según Hamou *et al.* (2012) describen que el ganado de todas las edades es susceptible a la anaplasmosis pero la severidad de la infección se relaciona directamente con la edad, por lo que en animales mayores la enfermedad clínica es más severa. Kiara *et al.* (2014) y Silva *et al.* (2006) indican que la cantidad de anticuerpos maternos contra *A. marginale* disminuye desde el nacimiento hasta la semana 16 de vida y después la proporción de animales seropositivos aumenta probablemente por la generación de anticuerpos endógenos tras la exposición al agente causal. Por lo que se sugiere que se deben implementar medidas preventivas en las granjas ya que los terneros se pueden infectar desde las primeras semanas de vida por contacto con las garrapatas de su madre o insectos hematófagos (Kiara *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2006).

Hamou *et al.* (2012) identificaron una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en la seroprevalencia de anaplasmosis según el clima. Sin embargo, en el presente estudio no existió una diferencia significativa ($P > 0.05$) entre las seroprevalencias de las tres islas evaluadas durante la temporada seca. De acuerdo a Simuunza *et al.* (2011) lo recomendable es

realizar el muestreo en las diferentes temporadas climáticas, ya que durante la época húmeda puede haber un incremento de los casos detectados debido a la mayor actividad de los vectores mientras que en la temporada seca existe menos actividad de las garrapatas y los terneros nacidos en esta época no se enfrentan a la enfermedad hasta la temporada de lluvia donde existe el pico de abundancia de los vectores (Simuunza *et al.*, 2011).

Con respecto al sexo, Atif *et al.* (2013b) reportaron que aunque existió una seroprevalencia más alta en hembras no se demostró una diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) comparada con la de los machos, lo que concuerda con los resultados de Hamou *et al.* (2012) y Díaz *et al.* (2003). Barbosa *et al.* (2014) establecieron que las hembras de búfalo gestantes tienen mayor probabilidad de exhibir anticuerpos contra *A. marginale* en comparación con las hembras no gestantes debido a la inmunosupresión inespecífica que sucede durante la preñez. Paralelamente, Silva & Fonseca (2013) reportaron que las vacas primíparas tuvieron 88% más riesgo de ser seropositivas en comparación con las hembras multíparas (Silva & Fonseca, 2013).

Por otra parte, bajos títulos de anticuerpos contra *A. marginale* en el periparto indican que es un periodo propicio para el desarrollo de anaplasmosis clínica y transmisión transplacentaria (Barbosa & da Fonseca, 2013) por lo que las vacas en este periodo deben ser consideradas como un grupo en riesgo (Silva & Fonseca, 2014; Silva & Fonseca, 2013). Además, estos autores determinaron que aparte de la gestación, la lactancia influye significativamente ($P < 0.05$) en la seropositividad de los animales ya que las vacas con una alta producción de leche fueron 63% más seropositivas que aquellas con baja producción, lo que genéticamente se puede asociar a una baja cantidad de anticuerpos contra *A. marginale* (Silva & Fonseca, 2013).

La infestación por garrapatas también es otro factor de riesgo para la presencia de anaplasmosis en un área (Barbosa *et al.*, 2014; Silva & Fonseca, 2013; Hornok *et al.*, 2012) y principalmente para el establecimiento de condiciones de estabilidad o inestabilidad enzoótica. En los predios analizados del archipiélago de Galápagos se comprobó que la población de garrapatas está principalmente constituida por la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, lo que concuerda con lo establecido por Yáñez (2013) en la provincia de Chimborazo. Adicionalmente, este hallazgo indica que las condiciones climáticas del archipiélago son favorables para el ciclo de vida de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Otros factores asociados significativamente ($P < 0.05$) con la prevalencia de *A. marginale* son la estabulación, frecuencia moderada de aplicación de acaricidas, uso de ivermectina y material quirúrgico o de muestreo no estéril (Ashuma *et al.*, 2013; Atif *et al.*, 2013a). Por su parte, Hornok *et al.* (2012) y Swai *et al.* (2005) mencionan que existe una mayor prevalencia de *A. marginale* en el ganado que pastorea en comparación con el que está estabulado y tanto Ashuma *et al.* (2013) como Silva & Fonseca, (2013) indican que el hacinamiento promueve la infección debido a la rápida diseminación mediante factores directos e indirectos relacionados a los mecanismo de transmisión de anaplasmosis. En cuanto a la ivermectina, Atif *et al.* (2013a) reportaron que su uso indiscriminado y fácil disponibilidad en tiendas agropecuarias pueden ser las posibles razones para el desarrollo de resistencia por parte de las garrapatas y mayores niveles de prevalencia de anaplasmosis en el hato. Oliveira *et al.* (2011) encontraron que las probabilidades de seropositividad de anaplasmosis aumentan con la presencia de tábanos, moscas del establo (*Stomoxys calcitrans*), uso combinado de repelentes en presentaciones en spray y pour-on a intervalos de más de 60 días y control de garrapatas mediante pulverización a intervalos de 22 y 45 días.

En los predios evaluados, la principal y en la mayoría única medida de control contra las garrapatas consistía en el empleo del acaricida del grupo piretrina que se deriva de las flores secas del piretro *Chrysanthemum cinerariaefolium* en presentación spray, con una frecuencia de aplicación basada en el criterio del personal de cada predio sin supervisión de un veterinario. Este empleo empírico de acaricidas constituye un factor de riesgo importante para la presencia de anaplasmosis, ya que se conoce que la infestación por garrapatas se correlaciona con la presencia de anticuerpos contra *A. marginale* (Barbosa *et al.*, 2014; Silva & Fonseca, 2013). Por lo que los métodos de control de las garrapatas deben proveer un nivel moderado de vectores, suficiente para permitir la infección temprana de los terneros y estimular la inmunidad humoral sin que presenten signos aparentes de anaplasmosis y de esta forma mantener el estado inmunitario en la adultez por medio de reinfecciones que no son clínicamente aparentes (Barbosa *et al.*, 2014; Corona & Martínez, 2011).

Es probable que en Galápagos exista una transmisión infrecuente de *A. marginale* debido a una baja exposición a los vectores (Guglielmone, 1995), lo que provoca un desbalance en la relación entre el parásito y el hospedador, lo que origina una condición de inestabilidad enzoótica artificial, en la cual los casos clínicos ocurren estacionalmente y coinciden con el periodo de actividad máxima de los vectores (Pérez, Leroy & Carrillo, 1980). A pesar de que en la mayoría de predios evaluados se indicó que no han existido casos compatibles con anaplasmosis, es muy probable que los signos clínicos sean confundidos con otras enfermedades y subdiagnosticados debido al bajo grado de asistencia veterinaria y desconocimiento de la enfermedad por parte de los propietarios.

Adicionalmente, es posible que la asociación entre la seroprevalencia y las medidas de control se deba a que los vectores de *A. marginale* han desarrollado resistencia a los pesticidas

(Oliveira *et al.*, 2011). Esto se puede dar por el uso inadecuado del equipo, dilución incorrecta del producto, insuficiente tiempo de contacto del producto con el animal y una cobertura incompleta del cuerpo del bovino (Swai *et al.*, 2005). Por otro lado, puede que la frecuencia de aplicación de garrapaticidas interrumpa el ciclo de transmisión de *A. marginale* como lo mencionan Ríos *et al.* (2010) en el caso de *Babesia spp.*, donde valores de seroprevalencia menores del 75% se relacionan con la administración de garrapaticidas con una frecuencia menor a 90 días. Por lo que recomiendan en base a un análisis de regresión logística, la aplicación de un tratamiento garrapaticida cada 90 días ya que está asociado a valores de seroprevalencia indicativos de una zona endémicamente estable (Ríos *et al.*, 2010).

Por otro lado, el tipo de producción (carne, leche, mixta), el tamaño de la ganadería, fuente de los animales (importados vs. razas locales) e instrumentos comunes (narigueras, alicates para areteo, descornadores) no representan elementos significativos para la presencia de la anaplasmosis ($P > 0.05$) (Atif *et al.*, 2013a). Gralén (2009) también reporta que el tamaño del rebaño no influye significativamente ($P > 0.05$) en la seropositividad de *A. marginale*, mientras que un manejo inadecuado y la falta de medidas de control contra las garrapatas se asocian con un mayor nivel de anaplasmosis.

La prueba ELISA indirecto MSP-5 recombinante, empleada en este estudio, fue desarrollada por Morzaria *et al.* (1999) y tiene una sensibilidad de 96.9% y especificidad del 100% (Araújo *et al.*, 2004). Knowles *et al.* (1996) indican que bajo condiciones naturales, el número de rickettsias inoculado por vectores biológicos o mecánicos puede ser significativamente mayor que 10^3 , cantidad suficiente para promover el desarrollo de niveles de anticuerpos contra MSP5 detectables en el punto de corte.

Por su parte, Kocan *et al.* (2010) mencionan que no se ha determinado la reactividad cruzada de la prueba ELISA indirecto MSP-5 recombinante con otras especies de *Anaplasma*, tomando como base el alto grado de conservación de la secuencia de MSP5 entre las diferentes cepas de *A. marginale*, como también entre *A. marginale*, *A. centrale* y *A. phagocytophilum*. Se debe considerar que las pruebas serológicas son una alternativa menos costosa para el diagnóstico de infecciones crónicas de *A. marginale* pero no son capaces de revelar el perfil exacto de la prevalencia de la infección en un punto determinado, ya que el nivel de anticuerpos detectables puede permanecer en el animal por un periodo largo de tiempo, incluso después de la eliminación del agente infeccioso (Shebish *et al.*, 2012).

Por otro lado, las técnicas moleculares detectan al agente causal pero no a los subproductos de la infección (Shebish *et al.*, 2012). Al respecto, Corona & Martínez (2011) detectaron niveles de bacteriemia tan bajos de hasta 0.000025% de *A. marginale* en animales sin signos clínicos mediante la amplificación por PCR del gen *msp5*. Por lo que se debe tomar en cuenta que la prevalencia puede variar dependiendo de la técnica diagnóstica empleada. Por ejemplo, Shebish *et al.* (2012) reportaron tasas de prevalencia de *A. marginale* diferentes mediante ELISA (87.7%) y PCR tiempo real (56.9%), al igual que Barbosa *et al.* (2014) que encontraron una prevalencia de *A. marginale* de 43.4% mediante ELISA y de 5.4% por PCR. No obstante, Hamou *et al.* (2012) encontraron una prevalencia total de *A. marginale* de 21.9% mediante PCR anidado y 16.5% por ELISA competitivo (cELISA) y sugieren que ambas técnicas son excelentes herramientas para estudios epidemiológicos y programas de control. La técnica de PCR es recomendada como el método diagnóstico ideal por Soto (2010), debido a su capacidad de detectar desde 0,00001051 ng/ μ L de ADN genómico de *A. marginale* y la

técnica de cELISA como prueba de screening para trabajos epidemiológicos por sus niveles altos de sensibilidad y especificidad, menor costo y fácil implementación.

Para la creación de estrategias de control de la anaplasmosis en los trópicos se deben tomar en cuenta factores de riesgo como la raza, producción lechera, densidad del hato e infestaciones por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Barbosa & da Fonseca, 2013). El control de garrapatas mediante acaricidas y algunas vacunas contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, se deben emplear principalmente para la protección del ganado lechero susceptible *Bos taurus* en sistemas de producción extensivos y no es justificable su aplicación en otros casos ya que esto incrementa el nivel de inestabilidad enzoótica (Carrique *et al.*, 2000). La vacunación contra patógenos transmitidos por garrapatas tiene el potencial en el futuro de crear un estado de estabilidad enzoótica artificial en el ganado cuyo rendimiento comercial permitiría una relación costo-beneficio favorable (Carrique *et al.*, 2000). De acuerdo a la FAO (2003), se recomienda a los propietarios el uso de acaricidas para reducir la población de garrapatas junto con la vacunación para disminuir la tasa de retorno. Sin embargo, en Ecuador no existen vacunas comerciales registradas para el control de la anaplasmosis bovina y las características de bioseguridad en el archipiélago conjuntamente con las leyes locales no permitirían su utilización.

Por el momento, la forma más real para el control sustentable de vectores tanto a mediano y largo plazo es la combinación de Buenas Prácticas Ganaderas (BPG) junto con los principios del Manejo Integral de Plagas (MIP) y un uso racional de pesticidas, para esto se debe considerar el manejo operativo de la producción, los resultados del diagnóstico de resistencia parasitaria y la aplicabilidad de las opciones de control no químicas disponibles (Henrioud, 2011; Vasanthachar *et al.*, 2014). Además, es importante considerar que para

comprender la epidemiología de la anaplasmosis se deben analizar en conjunto los factores ambientales como: tipo de pasto, densidad animal, densidad de los vectores y medidas de control para clasificar el riesgo de la presencia de la enfermedad en áreas endémicas (Silva & Fonseca, 2013).

CONCLUSIONES

Este estudio confirma la presencia de un nivel de seroprevalencia moderado de *A. marginale* en bovinos de las islas Santa Cruz, Isabela y San Cristóbal del archipiélago de Galápagos mediante la prueba ELISA indirecto MSP-5 recombinante. Por lo que es probable que exista una condición de inestabilidad enzoótica por deficiencias en el control de los vectores, principalmente por el uso inapropiado de los acaricidas, lo que ocasiona una transmisión irregular de *A. marginale* provocando que los animales adultos sean más susceptibles al desarrollo de la enfermedad debido a que posiblemente presentan niveles de anticuerpos más bajos en comparación con los bovinos jóvenes.

A pesar de que no existió diferencia entre las seroprevalencias de las islas, se debería realizar otro estudio en la temporada caliente para establecer la seroprevalencia de anaplasmosis en esa época y compararla con la obtenida en este trabajo, para determinar si el clima es un factor de riesgo en ese ecosistema.

La prueba ELISA indirecto MSP-5 recombinante logró identificar los anticuerpos contra *A. marginale* con un grado mínimo de dificultad en su elaboración y en poco tiempo. Por lo que se sugiere que se la puede emplear en otros estudios epidemiológicos en combinación con métodos moleculares para obtener un alto grado de precisión en la identificación de *A. marginale*.

Cada granja debe ser considerada como una “unidad epidemiológica” donde distintas combinaciones de resistencia contra acaricidas y factores de riesgo de la enfermedad pueden estar presentes.

RECOMENDACIONES

La información de seroprevalencia señalada en este estudio debe utilizarse para evitar brotes de anaplasmosis por la introducción de animales foráneos en esta región o por el traslado de bovinos de las islas evaluadas a zonas en las cuales el estado epidemiológico de la enfermedad es desconocido. Sin embargo, debido al tamaño de la muestra y posibles reacciones cruzadas en los resultados del kit de ELISA, se sugiere realizar un estudio más amplio para validar la prueba y emplear técnicas moleculares para ratificar los hallazgos de este estudio.

Informar y capacitar a los ganaderos y servicios veterinarios acerca de la anaplasmosis así como de los beneficios, limitaciones y potenciales desventajas del MIP y uso racional de acaricidas que se pueden emplear para la prevención y control de ectoparásitos, especialmente de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* junto con el empleo de BPG para construir zonas endémicamente estables.

También se deben realizar investigaciones utilizando la prueba de inmersión de garrapatas adultas de *R. (Boophilus) microplus* u otras técnicas de diagnóstico y metodologías de muestreo apropiadas para conocer si existe resistencia contra los principales productos químicos utilizados para el control de esta garrapata.

Debido a que en este estudio no se consideraron las razas ni edades específicas ni se realizaron exámenes clínicos a los animales muestreados, se recomienda elaborar más investigaciones para determinar los factores de riesgo asociados a la anaplasmosis y otras enfermedades hemoparasitarias, entender su epidemiología y prevalencia en más predios del archipiélago ya que son importantes para el diseño e implementación de estrategias de

prevención y control costo-efectivas, para lo cual se requiere la integración entre investigadores, agencias de salud pública, gobierno y sociedad.

Se deben implementar o mejorar los sistemas de monitoreo en los camales debido al incorrecto uso de acaricidas para proteger la seguridad de los alimentos y competitividad de los productos de origen animal en mercados locales e internacionales mediante la implementación de sistemas de trazabilidad.

Se debe utilizar una prueba diagnóstica sensible, específica, reproducible, económica y confiable para la identificación de animales portadores de *A. marginale* para lo cual se requiere la asistencia financiera por parte del gobierno para conseguir las pruebas de diagnóstico rutinario así como promover la formación de alianzas con laboratorios centrales de investigación o universidades.

Adicionalmente, se deben realizar estudios para establecer la eficacia de las vacunas comerciales empleadas en otros países e iniciar con análisis genéticos a nivel nacional para determinar la transmisibilidad de *A. marginale* por garrapatas y establecer una base de datos que se pueda utilizar para el diseño de antígenos vacunales y vacunas específicas para cada región del país.

REFERENCIAS

- Abbott, J., Palmer, G., Kegerreis, K., Hetrick, P., Howard, C., Hope J. & Brown, W. (2005). Rapid And Long-term Disappearance of CD4⁺ T Lymphocyte Responses Specific for *Anaplasma marginale* Major Surface Protein-2 (MSP2) in MSP2 Vaccinates following Challenge with Live *A. marginale*. *The Journal of Immunology*, 174 (11), 6702-6715. doi: 10.4049/jimmunol.174.11.6702
- Alava, J., Ross, P., Ikonomou, M., Cruz, M., Jimenez, G., Dubetz, C., Salazar, S., Costa, D., Villegas, S., Howorth, P. & Gobas, F. (2011). DDT in endangered Galapagos sea lions (*Zalophus wollebaeki*). *Marine Pollution Bulletin*, 62 (4), 660-671. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.01.032
- Alleman, A. & Barbet, A. (1996). Evaluation of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 3 (MSP3) as a Diagnostic Test Antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (2), 270-276.
- Almazán, C., Moreno, O., Moreno, J., Galindo, R., Canales, M., Villar, M. & de la Fuente, J. (2012). Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. *Vaccine*, 30 (2), 265-272. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.10.102
- Ameen, K., Abdullah, B. & Abdul-Razaq, R. (2012). Seroprevalence of *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* in domestic animals in Erbil, Iraq. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 26 (3), 109-114.
- Araujo, F., Madruga, C., Leal, C., Schenk, M., Kessler, R., Marques, A. & Lemaire, D. (1998). Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody and rapid agglutination test in detecting antibodies against *Babesia bovis*. *Veterinary Parasitology*, 74 (2), 101-108.
- Araújo, F.R., Melo, V.S.P., Ramos, C.A., Madruga, C.R., Soares, C.O., Kessler, R.H., Almeida, N.F., Araújo, G.S., Alves, L.C., Torres, R.A., Fragoso, S.P., Arauco, P.R., Bacanelli, G., Oliveira, M.B. & Santos, L.R. (2004). Desenvolvimento de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Baseados em MSP1a e MSP2 Recombinantes de Isolado Brasileiro de *Anaplasma marginale*. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa*, 17 (1), 7-24.
- Ashuma, A., Das Singla, L., Kaur, P., Singh, M., Kaur, B. & Dutt, 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.
- Atif, F., Khan, M., Muhammad, F. & Ahmad, B. (2013a). Sero-epidemiological study of *Anaplasma marginale* among cattle. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 23 (3), 740-744.
- Atif, F., Khan, M., Roheen, T., Muhammad, F., Younus, M., Avais, M. & Ullah, S. (2013b). Seroprevalence of *Anaplasma marginale* infection among cattle from three districts of the northern Punjab, Pakistan. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 23 (4), 995-998.

- Aubry, P. & Geale, D. (2011). A review of bovine anaplasmosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58 (1), 1-30. doi: 10.1111/j.1865-1682.2010.01173
- Bacanelli, G., Ramos, C. & Araújo, F. (2014). Molecular diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle: quantitative evaluation of a real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) based on *msp5* gene. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34 (1), 29-33.
- Baldacchino, F., Muenworn, V., Desquesnes, M., Desoli, F., Charoenviriyaphap, T. & Duvallet, G. (2013). Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. *Parasite*, 20 (1), 1-13. doi: 10.1051/parasite/2013026
- Baldacchino, F., Desquesnes, M., Mihok, S., Foil, L., Duvallet, G. & Jittapalapong, S. (2014). Tabanids: Neglected subjects of research, but important vectors of disease agents! *Infection, Genetics and Evolution*, 28 (1):596-615.
- Barbosa, J. & Fonseca, A. (2013). Risk factors for anaplasmosis in dairy cows during the peripartum. *Tropical Animal Health Production*, 45 (8), 1-5.
- Barbosa, J., Sousa, W., Chaves, C., André, M., Zacarias, R., Fonseca, A. & Barbosa, J. (2014). Molecular and serological prevalence of *Anaplasma marginale* in water buffaloes in northern Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 5 (2), 100-104.
- Barros, S., Madruga, C., Araújo, F., Menk, C., Almeida, M., Melo, E. & 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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100 (6), 513-517.
- Bautista, C. (1996). La respuesta inmune celular en anaplasmosis bovina. *Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias*, 7 (1), 315-329.
- Bilgiç, H., Karagenç, T., Simuunza, M., Shiels, B., Tait, A., Eren, H. & Weir, W. (2013). Development of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Theileria annulata*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle. *Experimental Parasitology*, 133 (2), 222-229.
- Blouin, E., Kocan, K., de la Fuente, J. & Saliki, J. (2002). Effect of tetracycline on development of *Anaplasma marginale* in cultured *Ixodes scapularis* cells. *Veterinary Parasitology*, 10 (1-2), 115-126.
- Bradway, D., Torioni, S., Knowles, D., Hennager, S. & McElwain, T. (2001). Sensitivity and specificity of the complement fixation test for detection of cattle persistently infected with *Anaplasma marginale*. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, 13 (1), 79-81.
- Brayton, K., Kappmeyer, L., Herndon, D., Dark, M., Tibbals, D., Palmer, G., McGuire, T. & Knowles, D. (2005). Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the

surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (3), 844-849.

- Brayton, K., Dark, M. & Palmer, G. (2009). Anaplasma. En Nene, V. & Kole, C. (Eds.), *Genome Mapping and Genomics in Animal-associated* (pp. 85–116). Berlin: Springer-Verlag.
- Carrique, J., Widdowson, M., Cuéllar, A., Ribera, H. & Walker, A. (2000). Risk of babesiosis and anaplasmosis in different ecological zones of Santa Cruz Department, Bolivia. *Veterinary Parasitology*, 93 (1), 29-38.
- Center for Food Security & Public Health. (2008). *Babesiosis bovina*. Recuperado de http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/babesiosis_bovina.pdf
- Center for Food Security & Public Health (CFSPH). (2013). *Erlichiosis and Anaplasmosis: Zoonotic Species*. Recuperado de <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/ehrlichiosis.pdf>
- Chiriboga, R., Maigan, S. & Fonseca, B. (2006). Proyecto ECU/00/G31: Especies invasoras de las Galápagos, desarrollo de políticas y estrategias de manejo del sector Agropecuario y su relación con las especies introducidas en la Provincia de Galápagos. *Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (UNDP)*, 1-101.
- Coetzee, J. (2005). Antimicrobial therapy of persistent *Anaplasma marginale* infections. *Retrospective Theses and Dissertations*. Iowa State University. Paper 1856.
- Coetzee, J., Schmidt, P., Apley, M., Reinbold, J. & Kocan, K. (2007). Comparison of the complement fixation test and competitive ELISA for serodiagnosis of *Anaplasma marginale* infection in experimentally infected steers. *American Journal of Veterinary Research*, 68 (8): 872-878.
- Corona, B., Camacho, M., González, M. & Martínez, S. (2001). Clonaje del gen *msp1b* de *Anaplasma marginale* en un vector de expresión eucariota. *Revista de Salud Animal*, 23 (1), 69-72.
- Corona, B., Machado, H., Rodríguez, M. & Martínez, S. (2009). Characterization of recombinant MSP5 *Anaplasma marginale* Havana isolate. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 972-979.
- Corona, B. & Martínez, S. (2011). Detección de *Anaplasma marginale* en bovinos, mediante la amplificación por PCR del gen *msp5*. *Revista de Salud Animal*, 33 (1): 24-31.
- Corona, B., Obregón, D., Alemán, Y., Alfonso, P., Vega, E., Díaz, A. & Martínez, S. (2014). Tendencias en el diagnóstico de la anaplasmosis bovina. *Revista de Salud Animal*, 36 (2), 73-79.
- De la Fuente, J. & Kocan, K. (2006). Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunology*, 28 (7), 275-283. doi: 10.1111/j.1365-3024.2006.00828.x

- De la Fuente, J., Blouin, E., Manzano, R., Naranjo, V., Almazán, C., Pérez, J., Zivkovic, Z., Jongejan, F. & Kocan, K. (2007a). Functional genomic studies of tick cells in response to infection with the cattle pathogen, *Anaplasma marginale*. *Genomics*, 90 (6), 712-722. doi: 10.1016/j.ygeno.2007.08.009
- De la Fuente, J., Ruybal, P., Mtshali, M., Naranjo, V., Shuqing, L., Mangold, A., Rodríguez, S., Jiménez, R., Vicente, J., Moretta, R., Torina, A., Almazán, C., Mbat, P., Torioni, S., Farber, M., Rosario, R., Gortazar, C. & Kocan, K. (2007b). Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. *Veterinary Microbiology*, 199 (2-4), 382-390
- Díaz, D., Valera, Z., Andrade, E., 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 FCV-LUZ*, 8 (3), 193-198.
- Doudier, B., Olano, J., Parola, P. & Brouqui, P. (2010). Factors contributing to emergence of *Ehrlichia* and *Anaplasma spp.* as human pathogens. *Veterinary Parasitology*, 167 (2-4), 149-154.
- Dumler, J., Barbet, A., Bekker, C., Dasch, G., Palmer, G., Ray, S., Rikihisa, Y. & Rurangirwa, F. (2001). Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51 (6), 2145-2165.
- European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). (1998). *Committee for Veterinary Medicinal Products. Imidocarb. Summary Report (1)*. Recuperado de: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014473.pdf
- Felsheim, R., Oliva, A., Palmer, G., Crosby, L., Barbet, A., Kurtti, T. & Munderloh, U. (2010). Transformation of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, 167 (2-4), 167-174.
- Florio, L., Tamasaukas, R. & Rivera, S. (2012). Diagnóstico participativo de hemotrópicos en bovinos a nivel de pequeños productores y productoras de ganadería doble propósito en el sur del Estado Aragua en la República Bolivariana de Venezuela. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, 2 (163), 163-170.
- Foil, D. & Gorham, R. (2000). Mechanical Transmission of Disease Agents by Arthropods. En Eldridge, B. & Edman, J. (Eds.), *Medical Entomology* (pp. 461-514). Dordrecht: Kluwer Academic.

- Ghafar, M. & Amer, S. (2012). Prevalence and first molecular characterization of *Anaplasma phagocytophilum*, the agent of human granulocytic anaplasmosis, in *Rhipicephalus sanguineus* ticks attached to dogs from Egypt. *Journal of Advanced Research*, 3 (2), 189-194.
- Goodger, W., Carpenter, T. & Riemann, H. (1979). Estimation of economic loss associated with anaplasmosis in California beef cattle. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*, 174 (12), 1333–1336.
- Gralén, B. (2009). *Tick-borne diseases in Tajikistan: anaplasmosis, babesiosis and theileriosis*. (Tesis de pregrado, Universidad Sueca de Agricultura). Recuperado de http://epsilon.slu.se:8080/archive/00003432/01/Gral%C3%A9n_B_091103.pdf
- Guglielmone, A. (1995). Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary Parasitology*, 57 (1-3), 109–119.
- Hamou, S., Rahali, T., Sahibi, H., Belghyti, D., Losson, B., Goff, W. & Rhalem, A. (2012). Molecular and serological prevalence of *Anaplasma marginale* in cattle of North Central Morocco. *Research in Veterinary Science*, 93 (3), 1318-1323.
- Henrioud, A. (2011). Towards sustainable parasite control practices in livestock production with emphasis in Latin America. *Veterinary Parasitology*, 180 (1-2), 2-11.
- Holler, J., Röser, D., Nielsen, H., Eickhardt, S., Chen, M., Lester, A., Bang, D., Frandsen, C. & David, K. (2013). A case of human babesiosis in Denmark. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 11 (5), 324-328.
- Hornok, S., Micsutka, A., Fernández, I., Meli, M., Gönczi, E., Tánčzos, B., Mangold, A., Farkas, R., Lutz, H., Hofmann, R. & de la Fuente, J. (2012). Fatal anaplasmosis in a herd with new genotypes of *Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis* and concurrent haemoplasmosis. *Research in Veterinary Science*, 92 (1), 30-35.
- Ibelli, A., Ribeiro, A., Giglioti, R., Regitano, L., Alencar, M., Chagas, A., Paco, A., Oliveira, H., Duarte, J. & Oliveira, M. (2012). Resistance of cattle of various genetic groups to the tick *Rhipicephalus microplus* and the relationship with coat traits. *Veterinary Parasitology*, 186 (3-4), 425-430.
- Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI). (2014). *Boletín Climatológico Anual 2013*. Recuperado de http://186.42.174.231/meteorologia/boletines/bol_anu.pdf
- Instituto Oceanográfico (INOCAR). (2011). *Islas Galápagos*. Recuperado de http://www.inocar.mil.ec/docs/derrotero/derrotero_cap_VI.pdf
- Kaaya, G. & Hassan, S. (2000). Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Experimental and Applied Acarology*, 24 (12), 913-926.

- Kashif, M., Saleem, M., Ullah, G., Fareedand, I. & Tawab, S. (2014). Seroprevalence of *Anaplasma* sp. in sheep (*Ovis aries*) by ELISA in Peshawar, Pakistan. *International Journal of Current Research*, 6 (1), 4702-4704.
- Kiara, H., Jennings, A., Bronsvort, B., Handel, I., Mwangi, S., Mbole-Kariuki, M., Conradie, V., Wyk, I., Poole, E., Hanotte, O., Coetzer, J., Woolhouse, M. & Toye, P. (2014). A longitudinal assessment of the serological response to *Theileria parva* and other tick-borne parasites from birth to one year in a cohort of indigenous calves in western Kenya. *Parasitology*, 141 (10), 1289-1298. doi: 10.1017/S003118201400050X
- Kilpatrick, A. & Randolph, S. (2012). Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *Lancet*, 380 (9857), 1946-1955.
- Knowles, D., Torioni, S., Palmer, G., McGuire, T., Stiller, D. & McElwain, T. (1996). Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 Epitope Common to Tick and Erythrocyte Stages Identifies Persistently Infected Cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (9), 2225-2230.
- Kocan, K., de la Fuente, J., Guglielmono, A. & Meléndez, R. (2003). Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clinical Microbiology Reviews*, 16 (4), 698-712.
- Kocan, K., de la Fuente, J., Blouin, E. & García, J. (2004). *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*, 129 (7), S285-S300. doi: 10.1017/S0031182003004700
- Kocan, K., de la Fuente, J., Blouin, E., Coetzee, J. & Ewing, S. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, 167 (2-4), 95-107.
- Kuttler, K. & Todorovic, D. (1973). Arthropod Borne Protozoan Infections (Affecting Domesticated, Food-Producing Animals). *Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional*. Recuperado de http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/pnaaa678.pdf
- Kuttler, K. (1984). Anaplasma infections in wild and domestic ruminants: a review. *Journal of Wildlife Diseases*, 20 (1), 12-20.
- Luna, G., Rodríguez, S., Ramírez, P., Preciado, J., Rojas, E., Mosqueda, J., García, M. & Vega, C. (2010). Cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale* en líneas celulares endoteliales. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 1 (4), 373-390.
- Maloo, S., Thorpe, W., Kioo, G., Ngumi, P., Rowlands, G. & Perry, B. (2001). Seroprevalences of vector-transmitted infections of small-holder dairy cattle in coastal Kenya. *Preventive Veterinary Medicine*, 52 (1), 1-16.
- Marimuthu, S., Rahuman, A., Jayaseelan, C., Vishnu, A., Santhoshkumar, T., Velayutham, K., Bagavan, A., Kamaraj, C., Elango, G., Iyappan, M., Siva, C., Karthik, L. & Bhaskara, K. (2013). Acaricidal activity of synthesized titanium dioxide nanoparticles using *Calotropis*

gigantea against *Rhipicephalus microplus* and *Haemaphysalis bispinosa*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6 (9), 682-688.

- Markoulatos, P., Siafakas, N. & Mocany, M. (2002). Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16 (1), 47-51.
- McGarey, D. & Allred, D. (1994). Characterization of Hemagglutinating Components on the *Anaplasma marginale* Initial Body Surface and Identification of Possible Adhesins. *Infection and Immunity*, 62 (10), 4587-4593.
- McGuire, T., Davis, W., Brassfield, A., McElwain, T. & Palmer, G. (1991). Identification of *Anaplasma marginale* Long-Term Carrier Cattle by Detection of Serum Antibody to Isolated MSP-3. *Journal of Clinical Microbiology*, 29 (4), 788-793.
- McGuire, T. (2005). Reasons to Avoid the CF Test for Detecting Antibodies in Cattle, Sheep, Goat and Horse Sera. *Veterinary Medical Research & Development*. Recuperado de <https://www.vmr.com/technical-library/detail/reasons-to-avoid-the-cf-test-for-detecting-antibodies-in-cattle-sheep-goat-and-horse-sera>
- Meeus, P., Brayton, K., Palmer, G. & Barbet, A. (2003). Conservation of a gene conversion mechanism in two distantly related paralogues of *Anaplasma marginale*. *Molecular Microbiology*, 47 (3), 633-643.
- Montenegro, S., Guillén, T. & Toro, M. (1992). DOT ELISA para el diagnóstico serológico de la anaplasmosis y babesiosis bovina. *Revista Científica, FCV de LUZ*, II (2), 23-29.
- Morzaria, S., Katende, J., Musoke, A., Nene, V., Skilton, R. & Bishop, R. (1999). Development of sero-diagnostic and molecular tools for the control of important tick-borne pathogens of cattle in Africa. *Parassitologia*, 41 (1), 73-80.
- Muñoz, M. & Serrano, E. (2007). Infestación por *Haematobia irritans* en el toro de lidia: “Mosca de los cuernos”. *Revista Complutense de Ciencia Veterinarias*, 1 (2), 347-351.
- Mutshembele, A., Cabezas, A., Mtshali, M., Thekiso, O., Galindo, R. & de la Fuente, J. (2014). Epidemiology and evolution of the genetic variability of *Anaplasma marginale* in South Africa. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 5 (6), 624-631.
- Noh, S., Brayton, K., Brown, W., Norimine, J., Munske, G., Davitt, C. & Palmer, G. (2008). Composition of the Surface Proteome of *Anaplasma marginale* and Its Role in Protective Immunity Induced by Outer Membrane Immunization. *Infection and Immunity*, 76 (5), 2219-2226. doi: 10.1128/IAI.00008-08
- Ocampo, R., Rodríguez, S., Cruz, R., Orozco, L., de la Fuente, J. (2008). *Anaplasma marginale*: análisis de las secuencias del fragmento variable del gen *msp1α* y del gen *msp4* de cuatro nuevas cepas mexicanas. *Técnica Pecuaria en México*, 46 (1), 69-78.

- Ojeda, M., Rodríguez, R., Galindo, E., Lezama, R. & Cruz, C. (2011). Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 2 (2), 177-192.
- Oliveira, J., Montoya, J., Romero, J., Soto-Barrientos, N., Melo, E., Ramos, C. & Araújo, F. (2011). Epidemiology of bovine anaplasmosis in dairy herds from Costa Rica. *Veterinary Parasitology*, 177 (3-4), 359-365.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (1984). *Ticks and Tick-Borne disease control. A practical field manual*. Roma: FAO.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2003). *Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina*. Roma: FAO.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2004). Anaplasmosis bovina. En Comisión de Estándares Biológicos de la OIE (Ed.), *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres* (pp. 534-547). París: OIE.
- Pérez, E., Leroy, E. & Carrillo, J. (1980). Anaplasmosis y piroplasmosis: estudio epidemiológico en la Estación Experimental “Los Diamantes”. *Ciencias Veterinarias*, 2 (1), 7-20.
- Reinbold, J., Coetzee, J., Hollis, L., Nickell, J., Riegel, C., Olson, K. & Ganta, R. (2010). The efficacy of three chlortetracycline regimens in the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infection. *Veterinary Microbiology*, 145 (1-2), 69-75.
- Ríos, L., Zapata, R., Reyer, J., Mejía, J. & Baena, A. (2010). Estabilidad enzoótica de babesiosis bovina en la región de Puerto Berrío, Colombia. *Revista Científica, FCV-LUZ*, XX (5), 485-492.
- Rivera, V. (2012). *Evaluación de una vacuna experimental inactivada contra la anaplasmosis bovina preparada con dos cepas nativas de Anaplasma marginale, en cinco ranchos del Estado de Veracruz*. (Tesis de pregrado, Universidad Veracruzana). Recuperado de <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/30293/1/RiveraHdz.pdf>
- Rodríguez, S., García, M., Torres, A. & Alarcón, R. (2003). Inmunología e inmunoprofilaxis de la anaplasmosis bovina. *Ciencia Veterinaria*, 9 (4), 123-164.
- Rodríguez, R., Rosado, A., Basto, G., García, Z., Rosario, R. & Frago, H. (2006). Manual técnico para el control de garrapatas en el ganado bovino. *Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria*, 4 (1), 7-29.
- Sackett, D. & Holmes, P. (2006). Assessing the economic cost of endemic disease on the profitability of Australian beef cattle and sheep producers. *Meat & Livestock Australia Limited*, 1 (1), 1-119.

- Samish, M., Ginsberg, H. & Glazer, I. (2004). Biological control of ticks. *Parasitology*, 129 (1), S389-S403.
- Scholar, E & Pratt, W. (2000). Bacteriostatic inhibitors of protein synthesis: tetracyclines. En Scholar, E. & Pratt, W. (Eds.), *The Antimicrobial Drugs* (pp. 184–199). New York: Oxford University Press.
- Scoles, G., Miller, J. & Foil, L. (2008). Comparison of the Efficiency of Biological Transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: Ixodidae) with Mechanical Transmission by the Horse Fly, *Tabanus fuscicostatus* Hine (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, 45 (1), 109-114.
- Shebish, E., Vemulapalli, R. & Oseto, C. (2012). Prevalence and molecular detection of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* un cattle from Puntarenas Province, Costa Rica. *Veterinary Parasitology*, 188 (1-2), 164-167.
- Shyma, K., Prakash, J. & Singh, V. (2013). Breeding strategies for tick resistance in tropical cattle: a sustainable approach for tick control. *Journal of Parasitic Disease*, 39 (1), 1-6.
- Silva, V., Araújo, F., Madruga, C., Soares, C., Kessler, R., Almeida, M., Fragoso, S., Santos, L., Ramos, C., Bacanelli, G. & Torres, R. (2006). Comparison between indirect enzyme-linked immunosorbent assays for *Anaplasma marginale* antibodies with recombinant major surface protein 5 and initial body antigens. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101 (5), 511-516.
- Silva, J. & Fonseca, A. (2013). Analysis of the risk factors related to the immune humoral anti-*Anaplasma marginale* in dairy cattle. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 34 (2), 777-784.
- Silva, J., Santana, G. & Fonseca, A. (2014). Longitudinal study of risk factors for anaplasmosis and transplacental transmission in herd cattle. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 35 (4), 2491-2500.
- Simuunza, M., Weir, W., Courcier, E., Tait, A. & Shiels, B. (2011). Epidemiological analysis of tick-borne diseases in Zambia. *Veterinary Parasitology*, 175 (3-4), 331-342.
- Singh, H., Jyoti, Manjurul, H., Singh, N. & Rath, S. (2012). Molecular detection of *Anaplasma marginale* infection in carrier cattle. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 3 (1), 55-58.
- Singh, N., Nandi, A., Jyoti, Rath, S. (2014). Detection of Amitraz Resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from SBS Nagar, Punjab, India. *The Scientific World Journal*, 2014 (1), 1-4. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/594398>
- Soto, K. (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 sanguíneos, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ensayo inmunoenzimático competitivo (cELISA)*. (Tesis de pregrado, Universidad Escuela

Politécnica del Ejército ESPE). Recuperado de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2846/1/T-ESPE-030491.pdf>

- Suarez, C. & Noh, S. (2011). Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary Parasitology*, 180 (1-2), 109-125.
- Swai, E., Karimuribo, E., Ogden, N., French, N., Fitzpatrick, J. & Bryanto, M. (2005). Seroprevalence estimation and risk factors for *Anaplasma marginale* on small holder dairy farmers in Tanzania. *Tropical Animal Health and Production*, 37 (8), 599-610.
- Tembue, A., Silva, J., Silva, F., Pires, M., Baldani, C., Soares, C., Massard, C. & Fonseca, A. (2011). Seroprevalence of IgG antibodies against *Anaplasma marginale* in cattle from south Mozambique. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 20 (4), 318-324.
- Terkawi, M., Alhasan, H., Huyen, N., Sabagh, A., Awier, K., Cao, S., Goo, Y., Aboge, G., Yokoyama, N., Nishikawa, Y., Karim, A., Tabbaa, D., Igarashi, I. & Xuan, X. (2012). Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from central region of Syria. *Veterinary Parasitology*, 187 (1-2), 307-311.
- Trindade, H., Almeida, K., Sousa, M., Teixeira, M., Machado, R., Batista, M. & Batista, E. (2011). Frecuencia de *Anaplasma marginale* em bovinos da região de Araguaína, Estado do Tocantins, Brasil. *Ciencia Animal*, 21 (2), 119-125.
- Turton, J., Katsande, T., Matingo, M., Jorgensen, W., Ushewokunze-Obatolu, U. & Dalgliesh, R. (1998). Observations on the use of *Anaplasma centrale* for immunization of cattle against anaplasmosis in Zimbabwe. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 65 (2), 81-86.
- Ueti, M., Reagan, J., Knowles, D., Scoles, G., Shkap, V. & Palmer, G. (2007). Identification of Midgut and Salivary Glands as Specific and Distinct Barriers to Efficient Tick-Borne Transmission of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, 75 (6), 2959-2964. doi: 10.1128/IAI.00284-07
- Urdaz-Rodriguez, J., Fosgate, G., Alleman, A., Rae, D., Donovan, G. & Melendez, P. (2009). Seroprevalence estimation and management factors associated with high herd seropositivity for *Anaplasma marginale* in commercial dairy farms of Puerto Rico. *Tropical Animal Health and Production*, 41 (7), 1439-1448.
- Vasanthachar, H., Chandrasekaran, B., Kesavan, M., Karthik, K., Rathod, P., Gopi, M., Tamilmahan, P., & Lingaraju, B. (2014). Economic importance of ticks and their effective control strategies. *Asian Pacific Journal Tropical Disease*, 4 (2), S770-S779.
- Vidotto, O. & Marangoni, M. (2001). Diagnóstico em anaplasmosse bovina. *Ciencia Rural, Santa Maria*, 31 (2), 361-368.
- Vidotto, M., Kano, S., Gregori, F., Headley, S. & Vidotto, O. (2006). Phylogenetic analysis of *Anaplasma marginale* strains from Paraná State, Brazil, using the *msp1a* and *msp4* genes.

Journal of Veterinary Medicine B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health, 53 (9), 404-411.

- Vinueza, R. (2013). Propuesta de cooperación técnica para la investigación en salud y sanidad animal en especies domésticas en las Islas Galápagos, primer borrador para revisión. *Centro de transferencia y desarrollo de tecnologías*, 1 (1), 1-10.
- Yabsley, M., & Shock, B. (2013). Natural history of Zoonotic *Babesia*: Role of wildlife reservoirs. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2 (1-2), 18-31.
- Yáñez, C. (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*. (Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato). Recuperado de <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:9fdDoBaNsacJ:repo.uta.edu.ec/bitstream/handle/123456789/3793/Tesis02Vet..pdf%3Fsequence%3D1+&cd=2&hl=es-419&ct=clnk&gl=ec>
- Zhang, L., Cui, F., Wang, L., Zhang, L., Zhang, J., Wang, S. & Yang, S. (2011). Investigation of anaplasmosis in Yiyuan County, Shandong Province, China. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4 (7), 568-572.
- Zhang, Y., Wang, S., Shi, Y., Yu, H., Cao, M., Mei, L., Hua, G., Yao, L., Tian, L., Yu, Q. & Zhang, L. (2012). Anaplasmosis in farmers and domestic animals in Anhui province, China. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2 (1), 27-30.
- Zaugg, J.L., Goff, W.L., Foreyt, W. & Hunter, D.L. (1996). Susceptibility of elk (*Cervus elaphus*) to experimental infection with *Anaplasma marginale* and *A. ovis*. *Journal Wildlife Disease*, 32 (1), 63-66.

ANEXOS

Anexo 1: Formulario de colección de garrapatas utilizado durante el muestreo serológico.

FORMULARIO DE TOMA DE MUESTRAS

A. LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA

PROPIETARIO

NOMBRE PREDIO/GRANJA

DIRECCIÓN

UBICACIÓN GEOGRÁFICA

X:

Y:

TELEF:

CEL:

B. DATOS DE LA MUESTRA

TIPO DE EXPLOTACIÓN

N ANIMALES ENFERMOS

N ANIMALES

N TOTAL DE ANIMALES

MUESTREADOS

VACUNA

APLICADA/

FECHA DE RECOLECTA

FECHA VACUNACIÓN

C. LISTA DE MUESTRA

COLESTADAS

NÚMERO	IDENTIFICACIÓN	CATEGORÍA	SINTOMAS
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			

D. DATOS ADICIONALES

(Historia, signos clínicos, hallazgos post mortem, comentarios, diagnóstico tentativo, vacunas, etc)

