



Determinación de la seropositividad y caracterización molecular de *Anaplasma marginale* en bovinos pertenecientes a un muestreo realizado en la zona de Chone, Manabí.

Cando Escobar, Kevin Joel

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Reyna Bello, Armando Ph.D.

22 de agosto del 2022

Reporte de verificación de contenido



Trabajo de titulación_.docx

Scanned on: 22:56 August 22, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	256
Words with Minor Changes	0
Paraphrased Words	0
Omitted Words	1444



Firmado electrónicamente por:

**ARMANDO
REYNA**

Reyna Bello, Armando PhD

DIRECTOR



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular, “**Determinación de la seropositividad y caracterización molecular de *Anaplasma marginale* en bovinos pertenecientes a un muestreo realizado en la zona de Chone, Manabí**” fue realizado por el señor **Cando Escobar Kevin Joel** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Santo Domingo, 22 de Agosto 2022



Firmado electrónicamente por:

**ARMANDO
REYNA**

Reyna Bello, Armando

C. C 1758891830



Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Cando Escobar Kevin Joel**, con cédula/cédulas de ciudadanía n° 1725904740, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **"Determinación de la seropositividad y caracterización molecular de *Anaplasma marginale* en bovinos pertenecientes a un muestreo realizado en la zona de Chone, Manabí"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo, 22 de Agosto de 2022

Cando Escobar Kevin Joel

C.C.: 1725904740



Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Cando Escobar Kevin Joel**, con cédula/cédulas de ciudadanía n° 1725904740, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Determinación de la seropositividad y caracterización molecular de *Anaplasma marginale* en bovinos pertenecientes a un muestreo realizado en la zona de Chone, Manabí”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Santo Domingo, 22 de Agosto de 2022

Cando Escobar Kevin Joel

C.C.: 1725904740

Dedicatoria

A todo aquel que de alguna manera ha
aportado en mi vida académica con
su apoyo, ayuda, tutorías, convivencias,
risas, trasnoches, consejos.

Para mi familia y amigos

Agradecimientos

Agradezco a mi familia: mi madre, mi padre, mis hermanos y sobrinos por el apoyo y cariño brindado, por ser el motor que ayudó a culminar con mi carrera universitaria

Al Dr. Armando Reyna por sus enseñanzas, charlas y brindarme su conocimiento, que me ha ayudado a crecer académicamente y empaparme del amor por la ciencia.

A Vanessa Armijos por su ayuda y apoyo en el laboratorio.

A Pedro Puente, Natasha Baer, Paola Proaño y Pablo Álvarez por ser excelentes catedráticos y por sus clases impartidas.

A Boris, Italo, Jordan, Jairo, Joel, Génesis, Jessica, Angela, Brandon, Harry, Hugo y Mateo por su amistad, compañía, ayuda en el laboratorio y momentos en común durante estos años universitarios.

A Lissette por su cariño, comprensión, apoyo y el tiempo en común.

A todas y cada una de las personas que he conocido en esta etapa universitaria, ya que no puedo escribir el nombre de todos aquellos que me han aportado con su presencia en mi vida, pero mi alma les queda agradecida por haber compartido de su tiempo conmigo.

Kevin Cando

Índice de contenido

Caratula.....	1
Reporte de verificación de contenido.....	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Listado de figuras.....	11
Listado de tablas.....	12
Lista de abreviatura	13
Resumen.....	14
Abstract	15
Capítulo I: Introducción.....	16
1.1. Formulación del problema	16
1.2. Justificación.....	17
1.3. Objetivos del proyecto.....	18
1.3.1 Objetivo general.....	18
1.3.2 Objetivo específico.....	18
Capítulo II: Marco teórico.....	19
2.1. Historia	19

2.2.	Descripción de la anaplasmosis bovina	19
2.3.	<i>Anaplasma marginale</i>	20
2.4.	Taxonomía.....	21
2.5.	Transmisión y vectores	22
2.5.1.	Transmisión biológica.....	22
2.5.2.	Transmisión mecánica	23
2.5.3.	Transmisión iatrogénica	23
2.5.4.	Transmisión transplacentaria.....	24
2.6.	Signos clínicos y patogénesis.....	25
2.7.	Respuesta inmunitaria	26
2.8.	Genoma y genes de Principales Proteínas de Superficie (MSP's)	27
2.8.1	MSP1 α y MSP1 β	28
2.8.2	MSP2.....	28
2.8.3	MSP3.....	28
2.8.4	MSP4.....	29
2.8.5	MSP5	29
Capítulo III:	Materiales y Métodos	29
3.1.	Obtención de muestras	29
3.2.	Cálculo de la prevalencia.....	30
3.3.	Estandarización de PCR del gen de MSP5 para el diagnóstico de <i>A. marginale</i>	30
3.4.	Estandarización de PCR del gen <i>msp1α</i>	32

	10
3.5. Estandarización de PCR del gen <i>msh4</i>	33
3.6. Secuenciación	34
3.7. Alineamiento, blast y secuencia consenso.....	35
3.8. Filogenia	35
Capítulo IV: Resultados y Discusión	35
4.1. Diagnóstico de <i>A. marginale</i>	35
4.2. Secuenciación	38
4.3. Filogenia.....	39
Capítulo V: Conclusiones	43
Capítulo VI: Recomendaciones	43
Capítulo VII: Bibliografía	44

Listado de figuras

Figura 1. Prevalencia de <i>Anaplasma marginale</i> en el mundo	20
Figura 2. Frotis de <i>Anaplasma marginale</i>	21
Figura 3. Taxonomía de <i>Anaplasma marginale</i>	22
Figura 4. Ciclo de vida del parásito <i>Anaplasma marginale</i>	24
Figura 5. Ciclo de parasitemia de <i>Anaplasma marginale</i>	26
Figura 6. Electroforesis en gel de PCR para <i>msp5</i>	35
Figura 7. Representación gráfica de los resultados por cada finca del diagnóstico de <i>A.</i> <i>marginale</i>	38
Figura 8. Árbol filogenético de <i>msp1</i> α	39
Figura 9. Árbol filogenético de <i>msp4</i>	41
Figura 10. Árbol filogenético de <i>msp5</i>	42

Listado de tablas

Tabla 1. Ubicación de las fincas dónde se obtuvieron las muestras	30
Tabla 2. Cebadores para la amplificación de del gen msp5	30
Tabla 3. Concentración de reactivos para la PCR del gen msp5	31
Tabla 4. Condiciones para la PCR del gen msp5	31
Tabla 5. Cebadores para la amplificación del gen msp1 α	32
Tabla 6. Concentración de reactivos para la PCR del gen msp1 α	32
Tabla 7. Condiciones para la PCR del gen msp1 α	33
Tabla 8. <i>Cebadores para la amplificación del gen msp4</i>	33
Tabla 9. <i>Concentración de reactivos para la PCR del gen msp4</i>	34
Tabla 10. Condiciones para la PCR del gen msp4.....	34
Tabla 11. Tabla de resumen de resultados obtenidos en el diagnostico de A. marginale	37

Lista de abreviatura

MPS1α	Proteína principal de superficie 1-alfa (por sus siglas en inglés)
MSP1β	Proteína principal de superficie 1-beta (por sus siglas en inglés)
MSP2	Proteína principal de superficie 2 (por sus siglas en inglés)
MSP3	Proteína principal de superficie 3 (por sus siglas en inglés)
MSP4	Proteína principal de superficie 3 (por sus siglas en inglés)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
μL	Microlitro
μm	Micromolar
mM	Milimolar
pb	Pares de base
U/μL	Unidades por microlitro
ng/UI	Nanogramos por microlitro
UPA	Unidad de producción animal

Resumen

La anaplasmosis bovina es una enfermedad causada por el hemotrópico *A. marginale*, bacteria perteneciente al orden de las Rickettsias, que afecta las ganaderías de gran parte del mundo, principalmente en las zonas tropicales y subtropicales. Esta bacteria causa una enfermedad infecciosa no contagiosa por lo que sus fuentes de transmisión son las garrapatas, dípteros hematófagos, fomites contaminados y por transmisión transplacentaria. Los animales menores a 6 meses de edad no presentan un cuadro clínico de la enfermedad, mientras que con el aumento de la edad el riesgo de un cuadro clínico y la muerte aumenta. Los adultos que superan la fase aguda de la enfermedad sirven como reservorios de la bacteria, ya que, aunque no presentan síntomas el microorganismo se mantiene mediante rickettsemias cíclicas. *A. marginale* presenta 5 principales proteínas en su superficie llamadas MSP1 α , MSP1 β , MSP2, MSP3, MSP4 y MSP5, son de gran utilidad en el análisis filogenético MSP1 y MSP4, y en el diagnóstico de la enfermedad con MSP5. En este estudio se analizaron por la técnica de PCR y usando la MSP5 como diana, 193 muestras provenientes de 7 fincas del cantón Chone, Manabí. En este trabajo se encontraron 157 caso positivos, correspondiente al 81,77%. Se pudo evidenciar el caso de un becerro con clínica de *A. marginale*, por lo que, al ser un caso singular, el estudio de la cepa cobra relevancia. Es por ello, se amplificó por PCR los genes de las proteínas *msp1 α* y *msp4*, de las muestras 499, 543, 545 y 573, distribuidas en fincas distantes del muestreo y fueron secuenciadas para su caracterización molecular. Con estas secuencias se realizó el árbol filogenético y se estableció la diversidad genética de las cepas de *A. marginale* en el país. El estudio es de importancia debido a la endemicidad de la bacteria en el país y su afectación al sector ganadero.

Palabras clave: *A. marginale*, rickettsemia cíclica, principales proteínas de superficie, diversidad génica

Abstract

Bovine anaplasmosis is a disease caused by the hemotropic *A. marginale*, a bacterium belonging to the order of Rickettsiae, which affects cattle in most of the world, mainly in tropical and subtropical areas. This bacterium causes a non-contagious infectious disease, and its sources of transmission are ticks, hematophagous diptera, contaminated fomites and transplacental transmission. Animals younger than 6 months of age do not present a clinical picture of the disease, while with increasing age the risk of a clinical picture and death increases. Adults that overcome the acute phase of the disease serve as reservoirs of the bacterium, since, although they do not present symptoms, the microorganism is maintained by cyclic rickettsemias. *A. marginale* presents 5 main proteins on its surface called MSP1 α , MSP1 β , MSP2, MSP3, MSP4 and MSP5, they are of great utility in the phylogenetic analysis MSP1 and MSP4, and in the diagnosis of the disease with MSP5. In this study, 193 samples from 7 farms in Chone canton, Manabí, were analyzed by PCR technique and using MSP5 as a target, 157 positive cases were found. In this work, 157 positive cases were found, corresponding to 81.77%. The case of a calf with clinical signs of *A. marginale* was evidenced, so being a singular case, the study of the strain is relevant. Thus, the genes of the msp1 α and msp4 proteins were amplified by PCR from samples 499, 543, 545 and 573, distributed in farms distant from the sampling and were sequenced for their molecular characterization. With these sequences, the phylogenetic tree was made and the genetic diversity of *A. marginale* strains in the country was established. The study is of importance due to the endemicity of the bacterium in the country and its affectation to the livestock sector.

Key words: *A. marginale*, cyclic rickettsemia, main surface proteins, gene diversity

Capítulo I: Introducción

1.1. Formulación del problema

La anaplasmosis bovina es una enfermedad causada por la Rickettsia *Anaplasma marginale* (Garry, 2008), la cual es uno de los agentes hemotrópicos bovinos con mayor relevancia en el ámbito ganadero, junto a *Trypanosoma vivax*, *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* (Reyna-Bello A. , 2014). Aunque se han reportado infecciones en el ganado vacuno de otras especies del género *Anaplasma* como: *A. centrale*, *A. phagocytophilum* y *A. bovis*, se sabe que solo *A. marginale* produce cuadros clínicos severos (OIE, 2015).

Esta bacteria causa una enfermedad infecciosa no contagiosa, al ser transmitida por vectores mecanismos, de manera transplacentaria e iatrogénicamente (Aubry & Geale, 2010). En el hemisferio norte, los vectores con mayor importancia son las garrapatas, encontrándose 19 tipos de garrapatas capaces de transmitir *A. marginale*, de las cuales las más comunes son las especies de *Rhipicephalus* en Australia, África y *Dermacentor* en Norte América (OIE, 2015). No obstante, en Sur América cabe mencionar que *R. microplus* es una garrapata de un solo huésped, y por tanto, su capacidad vectorial es muy controversial, por lo que hay que tener en cuenta la importancia de otros vectores como los tábanos y *Stomoxys calcitrans* para la transmisión de la anaplasmosis bovina en Sur América (Reyna, 2014).

Una vez infectado el bovino, la bacteria ingresará al sistema circulatorio y atacará los eritrocitos del animal, lo que puede desencadenar en: anemia hemolítica progresiva, aborto, pérdida de condición, baja producción de leche y la muerte (Quiroz-Castañeda, 2016), lo cual a su vez afecta directamente a la economía al significar pérdidas en la industria de carne y leche. El ganado mayor a 2 años corre mucho más riesgo de presentar una infección grave con una tasa de mortalidad alta, mientras que el ganado menor a 1 año suele resistente, ya que este no presenta sintomatología y si la presenta, los síntomas son muy leves, el ganado que ha

sobrevivido a la infección aguda de la enfermedad pasa al estado crónico y se convierte en un reservorio asintomático de anaplasmosis (Garry, 2008).

Al tener en cuenta la epidemiología de la anaplasmosis bovina se apunta hacia la necesidad del control de la enfermedad a fin de evitar su etapa aguda, por esta razón es importante un estudio de la prevalencia y caracterización de la infección por *A. marginale*, a fin de aportar al desarrollo ganadero y sanitario, con metodologías correctas de manejo, cuidado, tratamiento, traslado y diagnóstico, que se puedan deducir a través de los resultados de esta investigación, especialmente en las zonas en donde se recolectaron las muestras.

1.2. Justificación

El Ecuador al tener áreas con climas tropicales y subtropicales, la anaplasmosis es una enfermedad endémica, los vectores pueden desarrollarse con facilidad y *A. marginale* al ser específico de rumiantes, resulta claro que es un obstáculo en la producción ganadera de estas zonas (Kocan et. al, 2010). A pesar de que se conoce la presencia e incidencia de la rickettsemia en el país, no existe un documento gubernamental que describa la enfermedad en las zonas, ni mucho menos reporte la seropositividad de la infección a nivel internacional.

No obstante, en estos últimos años, sí se han desarrollado estudios por parte de diferentes autores en rebaños de las diferentes regiones geográficas del país, confirmando una prevalencia elevada de anaplasmosis en el ganado bovino (Tana-Hernández et. al, 2017; Gioia et.al, 2018; Guarnizo et.al, 2020). Demostrando además que el hemotrópico está presente en todas las zonas ganaderas del país, lo cual a su vez remarca la importancia de su estudio y control, para beneficio de las producciones lecheras y de carne de res. Sin embargo, en el país hace falta más investigación en cuanto a las cepas circundantes en las zonas ganaderas.

Al ser la anaplasmosis una enfermedad de gran relevancia a nivel económico y ganadero, es importante realizar estudios de la seroprevalencia de esta, con la finalidad de evitar el traslado de animales infectados y a su vez prevenir la diseminación de la bacteria en rebaños sanos. Además, también es importante el conocimiento de las cepas de *A. marginale* en el país, ya que permite deducir la diversidad poblacional de la bacteria y tomar las medidas adecuadas para controlar la enfermedad y reducir el impacto que la misma puede causar.

Cabe recalcar que es de gran relevancia para las ganaderías conocer la distribución, los mecanismos de transmisión, métodos de detección, tratamientos y control de la anaplasmosis bovina. Por lo tanto, este estudio se basa en la importancia que tiene la investigación, diagnóstico, tratamiento y reporte de la anaplasmosis en el Ecuador, el cual pretende ayudar a tener un panorama más amplio de la seropositividad y diversidad genética del hemotrópico en las diferentes zonas del Ecuador.

1.3. Objetivos del proyecto

1.3.1 Objetivo general

Determinar la seropositividad y caracterizar molecularmente la bacteria *Anaplasma marginale* en muestreos realizados en la zona de Chone, Manabí.

1.3.2 Objetivo específico

Realizar muestreos en zonas con historial clínico de *A. marginale*.

Realizar la prueba de PCR a la población muestreada y determinar la seropositividad.

Caracterizar molecularmente el agente patógeno empleando genes de las proteínas de superficie.

Capítulo II: Marco teórico

2.1. Historia

En 1893, Smith y Kilborne observaron por primera vez la bacteria de *Anaplasma marginale*, en la zona marginal de eritrocitos como cuerpos de inclusión, pero la erróneamente afirmaron que se trataba de una fase del ciclo de vida de la *Babesia bigemina* (Kocan et. al, 2010). Fue hasta el año de 1910 que Theiler descubre que se trata de otro microorganismo y lo denomina *Anaplasma marginale* y a partir de entonces se clasificó como un protozooario hemático (Reyna-Bello A. , 2014). Ya para la década de los 70 se describió que *A. marginale* se encuentra próximo con las Rickettsias (Kuttler & Todorovic, 1973), y no fue sino hasta en 1984 que fue introducida en el manual de Bergey's y reconocida como bacteria (Reyna-Bello A. , 2014).

2.2. Descripción de la anaplasmosis bovina

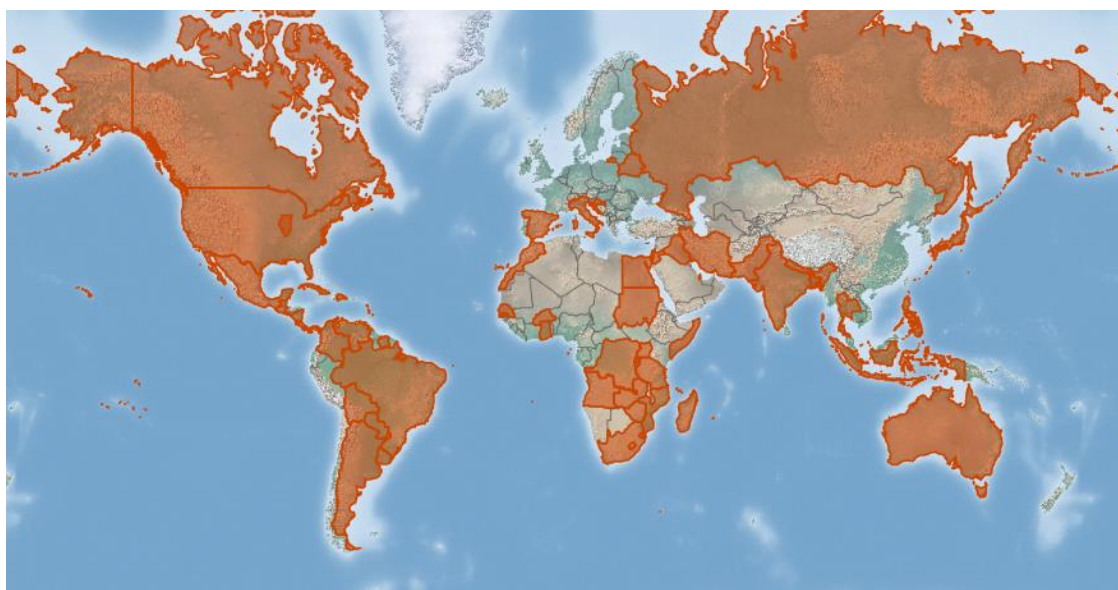
La anaplasmosis bovina es una enfermedad infecciosa no contagiosa, del ganado y rumiantes silvestres generada por el hemotrópico rickettsial *A. marginale* (Kocan, et. al, 2000). La anaplasmosis en su etapa aguda se caracteriza por la presencia de anemia hemolítica progresiva, fiebre, palidez de las mucosas, debilidad muscular, depresión, deshidratación, anorexia, ictericia, aumento del ritmo cardiaco, dificultad respiratoria, abortos, pérdida de condición, baja producción de leche y la muerte (Richey, 1991), mientras que en su etapa crónica los animales no presentan sintomatología, pero sirven de reservorio para la bacteria, preservando el agente etiológico (Corona et. al, 2005).

Anaplasmosis es transmitida por garrapatas, insectos hematófagos y por contaminación de instrumentos veterinarios, los cuales son los principales causantes que *A. marginale* ingrese al torrente sanguíneo y comience la infección de los glóbulos rojos (Garry, 2008). Debido a que la anaplasmosis tiene una distribución mundial, con especial importancia en regiones tropicales y subtropicales, aunque también se encuentran en zonas secas y de gran altitud (Rodriguez et.

al, 2009), es un factor de riesgo económico por los problemas que puede representar en los rebaños.

Figura 1

Prevalencia de Anaplasma marginale en el mundo



Nota. Adaptado de CABI, 2022. *Anaplasma marginale*. In: Invasive Species Compendium. Wallingford, UK: CAB International. <https://www.cabi.org/isc>

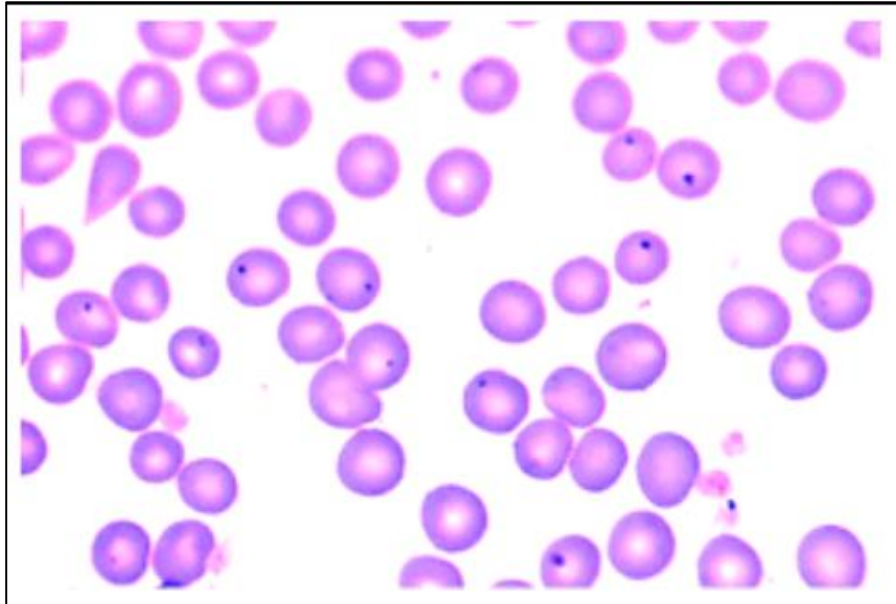
2.3. *Anaplasma marginale*

Anaplasma. marginale es una rickettsia intraeritrocítica gran-negativa, del ganado y otros rumiantes con distribución en todo el mundo (Eriks et. al, 1993). Cada célula de *A. marginale* poseen una forma coccoides y miden de entre 0.55 – 0.85 μm aproximadamente; cuando infectan a los glóbulos rojos formarán vacuolas, ya sea individualmente o inclusiones compactadas, que se localizarán en la parte periférica o marginal de la célula, ahí los microorganismos se multiplicarán por fisión binaria (Corona et. al, 2005), de igual manera se replican en el interior de los tejidos de garrapatas, principalmente de los géneros *Dermacentor*,

Rhipicephalus e *Ixodes* por medio de las cuales son transmitidas en la saliva (Battilani et. al, 2017).

Figura 2

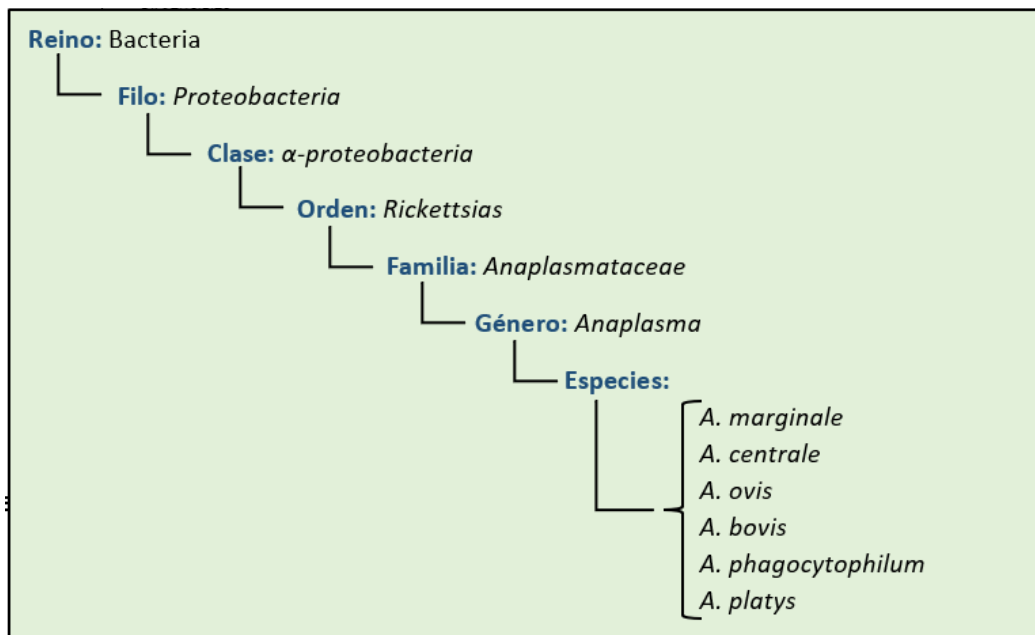
Frotis de *Anaplasma marginale*



Nota. Adaptado de “Prevalencia de *Anaplasma marginale* en bovinos de la provincia Zamora Chinchipe, Ecuador” (p.3), por Muñoz-Guarnizo et al., 2018, Revista de Salud Animal, 39 (68-74).

2.4. Taxonomía

La bacteria hemotrópica *Anaplasma marginale* fue mal clasificada como protozooario desde su descubrimiento por Theiler, denominación que mantuvo hasta ya entrada la década de 1980 (Reyna-Bello A. , 2014). Actualmente se conoce que este microorganismo no es un protozooario y que pertenece al, filo *Proteobacteria*, clase α -*proteobacteria*, Orden de las *Rickettsias*, familia *Anaplasmataceae*, género *Anaplasma*, especie *A. marginale* (Dumler, et al., 2001), figura 3.

Figura 3Taxonomía de *Anaplasma marginale*

Nota. Se tomó como referencia la taxonomía descrita por Dumler, et. al., (2001) y Kocan, et. al, (2004).

2.5. Transmisión y vectores

La anaplasmosis al ser una enfermedad no contagiosa, puede ser propagada por medio de diferentes fuentes de transmisión, que son: biológica, mecánica, iatrogénica y transplacentario (Battilani et. al, 2017).

2.5.1. Transmisión biológica

La transmisión biológica de *A. marginale* se produce por medio de vectores que son algunas garrapatas, una vez que la rickettsia se ha multiplicado extensamente en diversos tejidos de la garrapata incluidas las glándulas (Kocan et. al, 2000), infectan a los animales por medio de la mordedura. Se han reportado de entre 19 y 20 especies

principalmente de los géneros *Ixodes*, *Dermacentor* y *Rhipicephalus*, que son capaces de portar la bacteria e infectar a los rumiantes (OIE, 2015; Kocan et. al, 2004).

La transmisión de garrapatas por *Dermacentor*, puede ocurrir en una etapa transestadial o intraestadial, mientras que no se ha demostrado que exista una transmisión transovárica de una generación de garrapatas a otra (Kocan et. al, 2010).

2.5.2. Transmisión mecánica

La transmisión de la anaplasmosis por medio de las garrapatas ha sido catalogada como la principal causa de transferencia de la enfermedad de un animal a otro, sin embargo, en zonas en las cuales las garrapatas no se desarrollan o en donde la garrapata *R. microplus* es el denominado vector predominante, esto carece de sentido, debido a que es una garrapata de un solo huésped y al no mudarse a otro hospedador no podría transmitir la enfermedad (Coronado, 2001; Reyna-Bello A. , 2014).

En consecuencia, de ello, se produce la transmisión mecánica de la enfermedad que también se da en lugares donde las garrapatas están ausentes, esta ocurre por medio de artrópodos hematófagos (Battilani et. al, 2017). De los principales transmisores de manera mecánica se encuentran los dípteros de los géneros *Tabanus* y *Stomoxys* (Kocan et. al, 2003).

2.5.3. Transmisión iatrogénica

Este tipo de transmisión se produce por medio de instrumentos que han sido contaminados con *A. marginale*, como agujas para vacunas, aplicadores de crotales y equipos de castración y descoronado (Kocan et. al, 2015). La transmisión iatrogénica, se produce en cuestión de minutos debido a que el microorganismo se intercambia rápidamente de un animal a otro en los procedimientos que se llevan a cabo con este

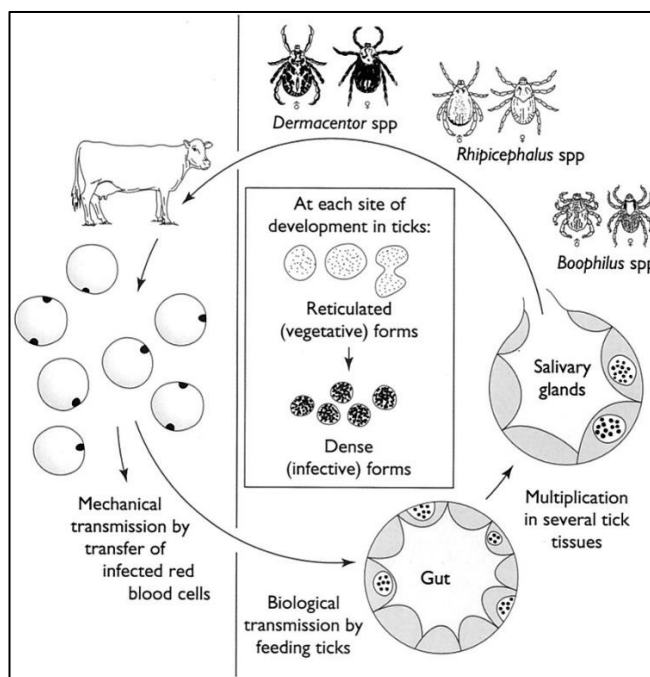
tipo de instrumentos, en estos casos suele aparecer un gran número de animales del rabaño iinfectados y con sintomatología sin haber reportado casos anteriores (Richey, 1991).

2.5.4 Transmisión transplacentaria

La transmisión transplacentaria de *A. marginale*, ocurre cuando una vaca infectada pare, por lo que el ternero presentará la enfermedad, este por lo general no presentará la clínica de la enfermedad, pero se encuentra persistentemente infectado, representado un reservorio de la Rickettsia (Kocan et. al, 2015). Este tipo de transmisión vertical se produce cuando la madre padece de la enfermedad en fase aguda, aquí *A. marginale* atraviesa la barrera placentaria e infecta al feto (Corona et. al, 2005).

Figura 4

Ciclo de vida del parasito *Anaplasma marginale*



Nota. Adaptado de “Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle” (p.3), por Kocan et al., 2003, Revista de Salud Animal, (698-712).

2.6. Signos clínicos y patogénesis

Los bovinos de todas las edades pueden infectarse de anaplasmosis bovina, no obstante la aspereza de la enfermedad y el riesgo de muerte aumenta con la edad, puesto que los animales menores a seis meses pueden estar infectados sin presentar ningún síntoma, mientras que al avanzar la edad (6 meses a 2 años) son más propensos a enfermarse y en animales mayores a los 2 años del 30 a 50% mueren al presentar anaplasmosis clínica (Richey, 1991).

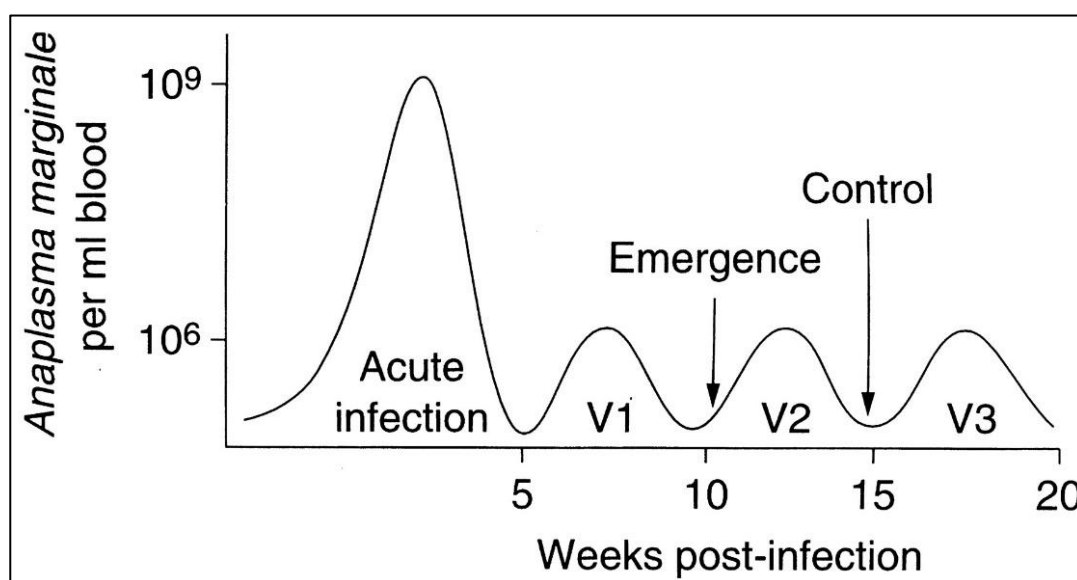
Anaplasma marginale es un un parásito intracelular que infecta los glóbulos rojos de bovinos (Kieser et. al, 1989), ingresa a las células de por medio de una invaginación evitando que la célula se destruya, al incorporarse en los eritrocitos se forman cuerpos de inclusión, en dónde se dividirá por fisión binaria, cada cuerpo de inclusión puede llegar a tener de cuatro a ocho rickettsias, llegando a infectar más del 70% de los eritrocitos durante la infección aguda (Kocan et. al, 2003).

La anaplasmosis puede dividirse en 4 etapas: incubación, fase aguda, convalecencia y fase crónica. La incubación comienza cuando el animal es infectado puede transcurrir en una lapso de 7 a 60 días con un promedio de 28 días, esto dependiendo de la dosis infectica de los organismos en la transmisión, al concluir la fase de incubación se presenta la primera subida de temperatura en el cuerpo, cuando ya pueden detectarse la infección eritrocítica. De manera que la fase aguda, comienza cuando el número de eritrocitos parasitados aumenta geométricamente y dura de 4 a 9 días, estos eritrocitos serán fagocitados por células retículoendoteliales bovinas, dando lugar al desarrollo de anemia e ictericia sin hemoglobinuria ni hemoglobinemia, lo cual a su vez causa palidez en las mucosas, estos síntomas son seguidos de pérdida de peso, letargo y depresión. El final de la etapa aguda ocurre al pico de la parasitemia y luego, se produce una gran pérdida de peso, abortos y en algunos casos la muerte. La fase de convalecencia se produce con el apareamiento de reticulocitos y hasta que se alcanzan valores normales en células sanguíneas, pudiendo extenderse unos cuantos días

o semanas. Las muertes se producen por lo general en la etapa tardía de la fase aguda o la etapa temprana de la fase de convalecencia. Si el animal sobrevivió, al terminar la fase de convalecencia, entra en la fase crónica de la enfermedad, en la que pasa a ser portador y posee inmunidad de por vida, al ser portadores son reservorios de *A. marginale* con niveles en ciclo de aumento y disminución de los niveles de rickettsemia, manteniéndose siempre una parasitemia no detectable (Corona et. el, 2005; Kieser et. al, 1989; Kocan et. al, 2003; Kocan et. al, 2010; Richey, 1991).

Figura 5

Ciclo de parasitemia de *Anaplasma marginale*



Nota. Adaptado de “Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle” (p.2), por Kocan et al., 2003, Revista de Salud Animal, (698-712).

2.7. Respuesta inmunitaria

A. marginale forma cuerpos iniciales al infectar los glóbulos rojos, esta célula al no contar con núcleo ni de receptores del complejo mayor de histocompatibilidad (C), son inmunes en primera instancia a los linfocitos citotóxicos del CMH I y II, y el reconocimiento por parte de CMH no es posible inmediatamente ya que la enfermedad no se reconoce hasta que un buen porcentaje de eritrocitos sea infectado (Rodríguez et. al, 2003).

En respuesta a la anaplasmosis se activan los mecanismos de defensa de inmunidad humoral y celular, además que de que se presenta una respuesta autoinmune al ser los eritrocitos fagocitados por células reticuloendoteliales, esta fagocitosis se produce sin distinción de eritrocitos por lo que afecta tanto a glóbulos infectados y sanos (Vidotto & Marangoni, 2003).

Después de que el eritrocito ha sido fagocitado, se produce la digestión de las proteínas de la rickettsia en péptidos más cortos, de manera que ahora estos péptidos pueden ser reconocidos por el CMH II, para la posterior activación de células T cooperadoras CD4+ (Th CD4+), la cual iniciará la producción de interleucina 2 (IL2) y la expresión de sus receptores en la superficie del Th CD4+. Al liberarse las IL2 actuará como factor para la proliferación de Th CD4+ activas. De igual manera la interacción entre el macrófago y Th CD4+, estimula la secreción de IL1 que estimula la expresión de proteínas del CMH II. En la respuesta inmune también actúan las células T cooperadoras Th1 y Th2, las células Th1 producen IL2 e interferón gamma, el cual estimula la síntesis de IgG2, IgM y activa a los macrófagos. Mientras que la Th2 produce IL4, IL6 e IL10, que estimularán la producción de IgG1 (Bautista et. al, 2000; Gale et. al, 1996; Rodríguez et. al, 2003).

2.8. Genoma y genes de Principales Proteínas de Superficie (MSP's)

El genoma de *A. marginale* es circular con un tamaño de 1,5 Mb aproximadamente, en el estudio de esta rickettsia se ha dado especial importancia a identificación de las principales proteínas de superficie (MSP, por sus siglas en inglés). De esta manera se han identificado 6 proteínas: msp1 α , msp1 β , msp2, msp3, msp4 y msp5. De estas proteínas msp1 α , msp4 y msp5, son codificadas por un solo gen y no varían antigénicamente, entre tanto, msp1 β , msp2 y msp3, son codificadas por familias multigénicas y varían en los ciclos rickettsémicos, otorgándole a la bacteria la capacidad de variar antigénicamente y así escapar del sistema inmune (Kocan et. al, 2003).

2.8.1 MSP1 α y MSP1 β

Msp1 es un hetero dímero compuesto por las proteínas msp1 α y msp1 β , que no están relacionadas estructuralmente ni conectadas covalentemente. Se encuentran expuestas en la superficie de *A. marginale*.

El gen de la *msp1 α* es polimórfico de una sola copia compuesto por un dominio C-terminal conservado y un dominio N-terminal variable en la secuencia y número de unidades repetidas en tándem de 86 a 89 pb, razón por la que puede ser utilizado para la caracterización de las diferentes cepas de *A. marginale* (Hove et. al, 2018).

El gen de msp1 β se codifica por una familia multigénica de dos genes completos: *msp1 β 1* y *msp1 β 2*; y dos genes parciales *msp1 β 1pg*, *msp1 β 2pg* y *msp1 β 3pg*, que se recombinan para ampliar la diversidad genética y antigénica. Msp1 α actúa como adhesina hacia los eritrocito y células del intestino de garrapatas, a diferencias de *msp1 β* que solo cumple esta función con los eritrocitos (Kocan et. al, 2003; Rodriguez et. al 2009).

2.8.2 MSP2

Msp2 es una proteína altamente inmunodominante, con una región central hipervariable, codificada por una familia polimórfica multigénica conformada por un gen funcional y 5 pseudogenes. El gen funcional codifica los extremos amino y carboxilo, mientras que los 5 pseudogenes mediante conversión genética se recombinan en un solo sitio de expresión con el gen funcional, dando lugar a que se exprese una nueva región hipervariable con una secuencia y antigenicidad diferente en cada ciclo de la reckettsemia, estas proteínas al poseer epítomos de células B con gran inmunogenicidad, inducen a una nueva respuesta inmune en cada ciclo (Kocan et. al, 2003,).

2.8.3 MSP3

Msp3 es otra proteína de superficie altamente inmunodominante, que al igual que msp2, es codificada por una gran familia polimórfica multigénica posee una región central hipervariable codificada por psuedogenes que se recombinaran con los extremos conservados. Por lo tanto, msp3 y msp2 recurren a la presentación de antígenos polimórficos para provocar los ciclos de rickettsemia (Battilani et. al, 2017; Brayton et. al, 2005),

2.8.4 MSP4

Msp4, es una proteína de membrana expuesta a la superficie codificada por un solo gen (*msp4*), que muestra un índice de variación muy bajo por lo que de la misma manera que msp1 α es utilizada para estudios filogenéticos, en los cuales se ha demostrado que existen variaciones en 168 pb, de estos 39 pb son útiles para el análisis de parsimonia (Rodriguez et. al, 2009). Aunque se encuentra expuesta en la superficie de membrana es poco inmunogénica, a diferencia de msp2 y msp3, que también se encuentran expuestas (Brayton et. al, 2005).

2.8.5 MSP5

El gen de la de *msp5* es extremadamente conservado entre las diferentes cepas de *A. marginale*, razón por la cual no es informativa filogenéticamente, no obstante, esta característica la hace ideal para el diagnóstico molecular. Además, la expresión recombinante de esta proteína es usada en diagnóstico serológico por su alta inmunogenicidad (Brayton et. al, 2005).

Capítulo III: Materiales y Métodos

3.1. Obtención de muestras

Las muestras se obtuvieron gracias al proyecto Brutryp, la cuales previamente fueron recolectadas y procesadas para la extracción del ADN. Por lo tanto, se contó con 193 muestras

de 8 diferentes fincas del cantón Chone, provincia de Manabí. Las muestras contaban con un etiquetado que iba del número 400 al 592, Tabla 1, figura

Tabla 1

Ubicación de las fincas dónde se obtuvieron las muestras

N°	Código de la finca	Ubicación	Muestras	N° de muestras
1	UPA1	0°24'35.7"S 80°02'10.6"W	400 – 430	31
2	UPA2	0°25'15.9"S 80°03'43.9"W	431 – 445	15
3	UPA3	0°22'55.5"S 80°02'29.2"W	446 – 497	52
4	UPA4	0°27'05.6"S 80°04'02.5"W	498 – 512	15
5	UPA5	0°27'05.2"S 80°04'02.1"W	513 – 532	20
6	UPA6	0°43'19.2"S 80°07'37.2"W	533 – 557	25
7	UPA7	0°22'45.4"S 80°03'33.7"W	558 – 571	14
8	UPA8	0°21'53.4"S 80°05'01.1"W	572 – 592	20

Nota: UPA: Unidad de producción Animal

3.2. Cálculo de la prevalencia

El cálculo de la prevalencia se realizó de acuerdo con lo descrito por Tapia (1995), utilizando la siguiente ecuación: *Prevalencia:* $\frac{\text{número de casos positivos}}{\text{número total de casos}} \times 100$

3.3. Estandarización de PCR del gen de MSP5 para el diagnóstico de *A. marginale*.

El diagnóstico de *A. marginale*, se realizó mediante la técnica de PCR, utilizando los primers descritos por Reyna-Bello et. al, (1998), para amplificar el gen de *msp5*.

Tabla 2

Cebadores para la amplificación de del gen msp5

Nombre de los Cebadores	Dirección	Secuencias	(pb)
19A	Forward	GTGTTCCCTGGGGTACTCCTA	806
19B	Reverse	TGATCTGGTCAGCCCCAGCT	

Nota. Reyna-Bello et al., (1998, p.259).

En la tabla 3 se describen las concentraciones de los reactivos por cada reacción de PCR, mientras que las condiciones de la PCR, se describen en la tabla 4, ambas modificadas y estandarizadas a partir del trabajo de Reyna-Bello et al., (1998).

Tabla 3

Concentración de reactivos para la PCR del gen msp5

Reactivos	Unidad	Concentración final	Volumen (μ L)
H_2O		-	-
Buffer+MgCl ₂	mM	1.00	2.50
Forward	μ M	1.00	2.50
Reverse	μ M	1.00	2.50
dNTP's	mM	0.20	0.50
Taq	U/ μ L	0.50	0.10
ADN	ng/uL	100	2
VOLUMEN FINAL			25.00

Nota. Modificado de Reyna-Bello et. al., (1998, p. 4).

Tabla 4

Condiciones para la PCR del gen msp5

	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	45 s	40
Hibridación	64	30 s	40
Extensión	72	1 min	40

	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Extensión final	72	10 min	1
Mantenimiento	10	-	-

Nota. Modificado de Reyna-Bello et al., (1998).

3.4. Estandarización de PCR del gen *msp1α*

Para la amplificación del gen *msp1α*, se tuvo que estandarizar el método en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, en la tabla 5 se detallan los cebadores para la amplificación del gen.

Tabla 5

*Cebadores para la amplificación del gen *msp1α**

Primers	Dirección	Secuencias	(pb)
420F	Forward	GTGCTGGTTGTGTGGTTGTG	420
420R	Reverse	CTTGCCGCCAATTAGCTCCT	

Las concentraciones de los reactivos para la PCR se describen en la tabla 6, mientras que las condiciones de amplificación se especifican en la tabla 7.

Tabla 6

*Concentración de reactivos para la PCR del gen *msp1α**

Reactivos	Unidad	Concentración final	Volumen (µL)
<i>H₂O</i>		-	-
Buffer+MgCl₂	mM	2.00	5.00
Forward	µM	0.50	1.25
Reverse	µM	0.50	1.25
dNTP's	mM	0.20	0.50
Taq	U/µL	1.00	0.20
ADN	ng/uL	100	1
VOLUMEN FINAL			25.00

Tabla 7*Condiciones para la PCR del gen msp1 α*

	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	94	30 s	35
Hibridación	62	30 s	35
Extensión	72	45 s	35
Extensión final	72	5 min	1
Mantenimiento	10	-	-

3.5. Estandarización de PCR del gen msp4

Para la amplificación del gen *msp1 α* , se tuvo que estandarizar el método en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, en la tabla 5 se detallan los cebadores para la amplificación del gen.

Tabla 8*Cebadores para la amplificación del gen msp4*

Nombre de los Cebadores	Dirección	Secuencias	(pb)
MSP45	Forward	CCGGATCCTTAGCTGAACAG	850
		GAATCTTGC	
MSP43	Reverse	GGGAGCTCCTATGAATTACA	850
		GAGAATTGTTTAC	

Las concentraciones de los reactivos para la PCR se describen en la tabla 8 , mientras que las condiciones de amplificación se especifican en la tabla 9.

Tabla 9*Concentración de reactivos para la PCR del gen msp4*

Reactivos	Unidad	Concentración final	Volumen (µL)
<i>H₂O</i>		-	-
Buffer+MgCl ₂	mM	1.50	3.75
Forward	µM	0.50	1.25
Reverse	µM	0.50	1.25
dNTP's	mM	0.20	0.50
Taq	U/µL	1.00	0.20
ADN	ng/uL	100	1
VOLUMEN FINAL			25.00

Tabla 10*Condiciones para la PCR del gen msp4*

	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	30 S	1
Desnaturalización	94	30 s	35
Hibridación	62	30 s	35
Extensión	72	1 min	35
Extensión final	72	5 min	1
Mantenimiento	10	-	-

3.6. Secuenciación

Se tomaron las muestras 499, 543, 545 y 573, debido que pertenecían a diferentes UPA's para su secuenciación. Para ello se prepararon 15µl de producto PCR de cada una de las muestras, con 5µl de cada cebador por cada muestra y se enviaron a la empresa Macrogen para su secuenciación.

3.7. Alineamiento, blast y secuencia consenso

Se limpió las secuencias con el programa Chromas, se buscó una secuencia consenso con el programa SeqMan, se buscaron las secuencias en la base de datos BLATS (National Center of Biotechnology, NCBI) y se las alineo en el programa MEGA 7.

3.8. Filogenia

Una vez realizado el alineamiento se realizó la filogenia a partir de las secuencias de las muestras 499, 543, 545 y 573, con el programa MEGA 7.

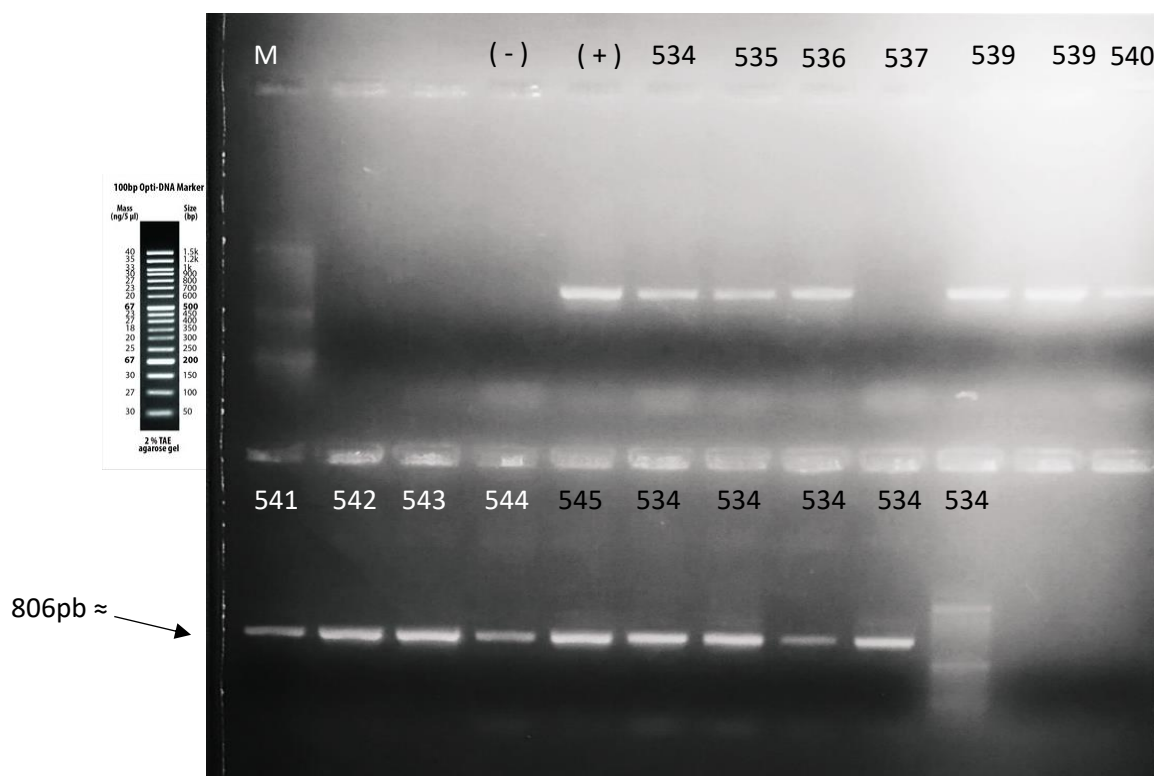
Capítulo IV: Resultados y Discusión

4.1. Diagnóstico de *A. marginale*

En cuanto al diagnóstico realizado mediante la técnica PCR, se encontraron 157 casos positivos de las 193 muestras procesadas, en la figura 13 se puede observar la electroforesis de producto PCR de *msp5*, donde se observan los fragmentos de 806pb que una muestra debía presentar para ser considerada positiva para *A. marginale* (Reyna-Bello et. al, 1998), estos fragmentos deben coincidir con el fragmento del positivo (+), se puede ver que la única muestra que no presenta el fragmento es la 537, por lo tanto, es negativa para *A. marginale*.

Figura 6

Electroforesis en gel de PCR para msp5



Nota. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, de muestras del producto PCR de *msp5* para diagnóstico de *A.marginale*. Muestras del 534-577, muestras positivas con 806 pb.

Es claramente notable que los casos positivos de anaplasmosis son muchos, encontrándose presentes en todas las UPA's de las que se obtuvieron las muestras. Se estableció una prevalencia del 81,77% de la enfermedad en los bovinos, mientras que por UPA muestreada se obtuvieron prevalencias que van del 60 al 90%, estos datos se encuentran recopilados en la tabla 10, este resultado de la prevalencia, aunque parezca enorme no difiere con otros estudios realizados como los de Tana et. al (2017) y Giona et. al (2018), estudios en los que se obtuvieron prevalencias del 86,1% y 90,3% respectivamente. Lo cual reafirma el hecho de que la anaplasmosis es endémica en el Ecuador y por lo tanto una enfermedad de importancia a nivel ganadero como económico. Es importante señalar la importancia de la prueba de diagnóstico utilizada para este tipo de estudios, ya que puede aportar para a un cálculo más exacto de la prevalencia de la enfermedad, como podemos ver el estudio realizado

por Muñoz et al. (2108) y en el que reportaron una prevalencia de 49,5% en la zona de Zamora Chinchipe, el método que utilizaron para la detección de la enfermedad fue la observación del parásito en el frotis sanguíneo, teniendo en cuenta que este método es más efectivo durante la clínica de la enfermedad (OIE, 2015) se puede deducir que la baja prevalencia allí reportada, se debe al método de diagnóstico utilizado.

Un punto importante sobre el cual hacer hincapié en esta etapa del estudio, es el reportar que entre uno de los casos positivos se encontró un becerro menor a 3 meses, correspondiente a la muestra 543, con clínica de *A. marginale*, lo cual es peculiar teniendo en cuenta la premisa de que en bovinos menores a 6 meses la rickettsia no afecta y estos son resistentes durante toda su vida (Aubry & Geale, 2010), por lo que esta muestra fue de interés para su secuenciación y caracterización de la cepa, ya que por su patogenia es de importancia conocer la diversidad genéticas de la cepa encontrada en este animal (de la Fuente et. al, 2001).

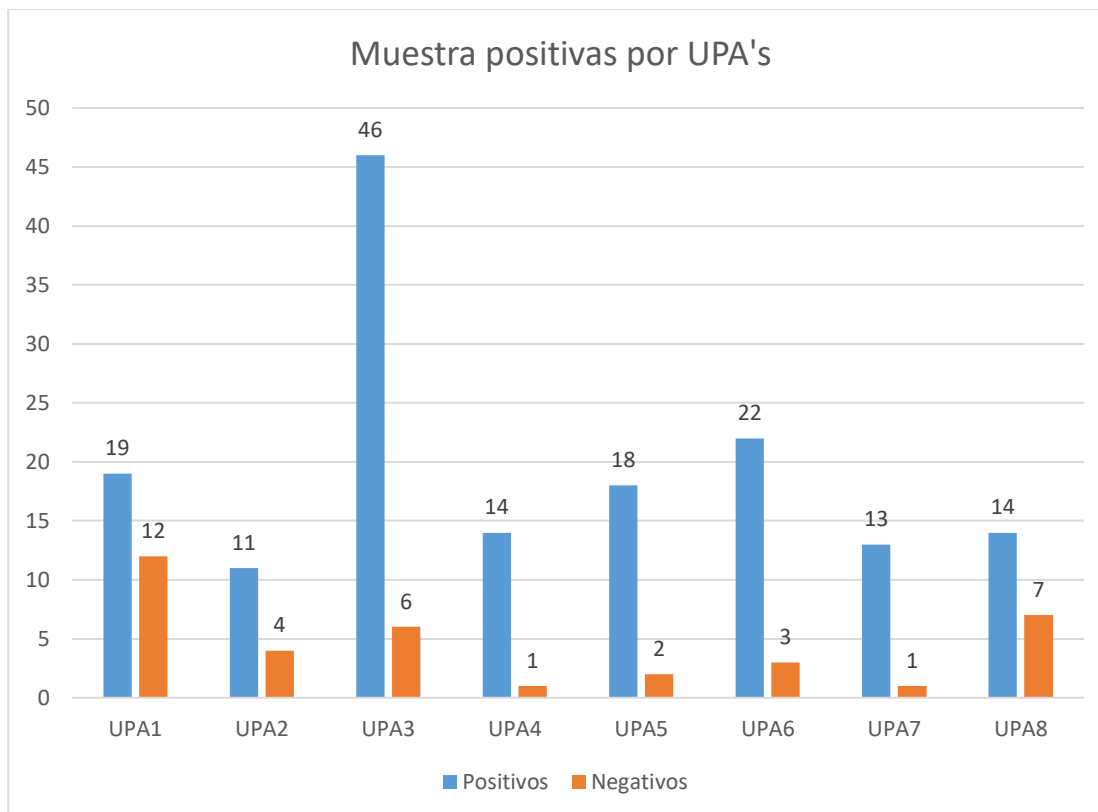
Tabla 11

Tabla de resumen de resultados obtenidos en el diagnóstico de A. marginale

UPA's	Muestras por UPA	Positivos	Negativos	Prevalencia (%)
UPA1	31	19	12	61,29
UPA2	15	11	4	73,33
UPA3	52	46	6	88,46
UPA4	15	14	1	93,33
UPA5	20	18	2	90,00
UPA6	25	22	3	88,00
UPA7	14	13	1	92,86
UPA8	20	14	7	70,00
Total	192	157	36	81,77

Figura 7

Representación gráfica de los resultados de diagnóstico por cada UPA



Nota: En la gráfica se puede observar los casos positivos y negativos que se encontraron en cada UPA.

4.2. Secuenciación

Se obtuvieron las secuencias de los genes *msp1 α* , *msp4* y *msp5*, de las muestras 499, 543, 545 y 573, sin embargo, la secuencia del gen *msp1 α* de la muestra 543 mostró picos desordenados después de las secuencias repetitivas. Por parte de Macrogen infirieron que el procesamiento de la polimerasa se vio interferido por la secuencia repetitiva o se forma la estructura secundaria, en consecuencia, el gen de *msp1 α* de la muestra 543 no se utilizó en el estudio.

4.3. Filogenia

A partir de los árboles filogenéticos obtenidos se puede observar que las cepas ecuatorianas se pueden diferenciar con respecto a las cepas de otros países, la diferenciación de cepas que se puede establecer gracias a la variabilidad genética del gen *msp1 α* (Hove et. al, 2018) figura 14, se puede observar como las muestras 499, 545 y 573, se diferencian de cepas de países como Brasil y Argentina, pero son cercanas a la de Cuba, esto se puede explicar a la presencia de un ancestro en común (de la Fuente et. al, 2007), entre las cepas cubanas y las ecuatorianas, mientras que las cepas de Brasil y Argentina tiene un ancestro en común entre ellas pero el ancestro que los une a las ecuatorianas se encuentra más alejado evolutivamente (Tamekuni, 2009). Esto no se puede apreciar de igual manera con la filogenia de *msp4* figura 15 y *msp5* que, aunque puede observarse su diferenciación de las otras cepas, esta no es tan marcada como sucede con *msp1 α* , por parte de *msp5* se explica ya que este gen es demasiado conservado como para observar una diferencia genética de otras muestras (Kocan et. al, 2003).

El análisis hecho con *msp1 α* , da a conocer la variabilidad génica de cepas que se pueden encontrar en el país, dado el peculiar caso de la muestra 543 evidencia la importancia de los estudios filogenéticos de las cepas de *A. marginale* en cada país a fin de entender los procesos epidemiológicos ya que como lo mencionan, de la Fuente et. al (2001) se requiere el estudio de las cepas en diferentes zonas para abordar un mejor control de la anaplasmosis. Lo cual es importante debido a constante presencia del parásito en los rebaños ecuatorianos.

Figura 8

Árbol filogenético de msp1 α

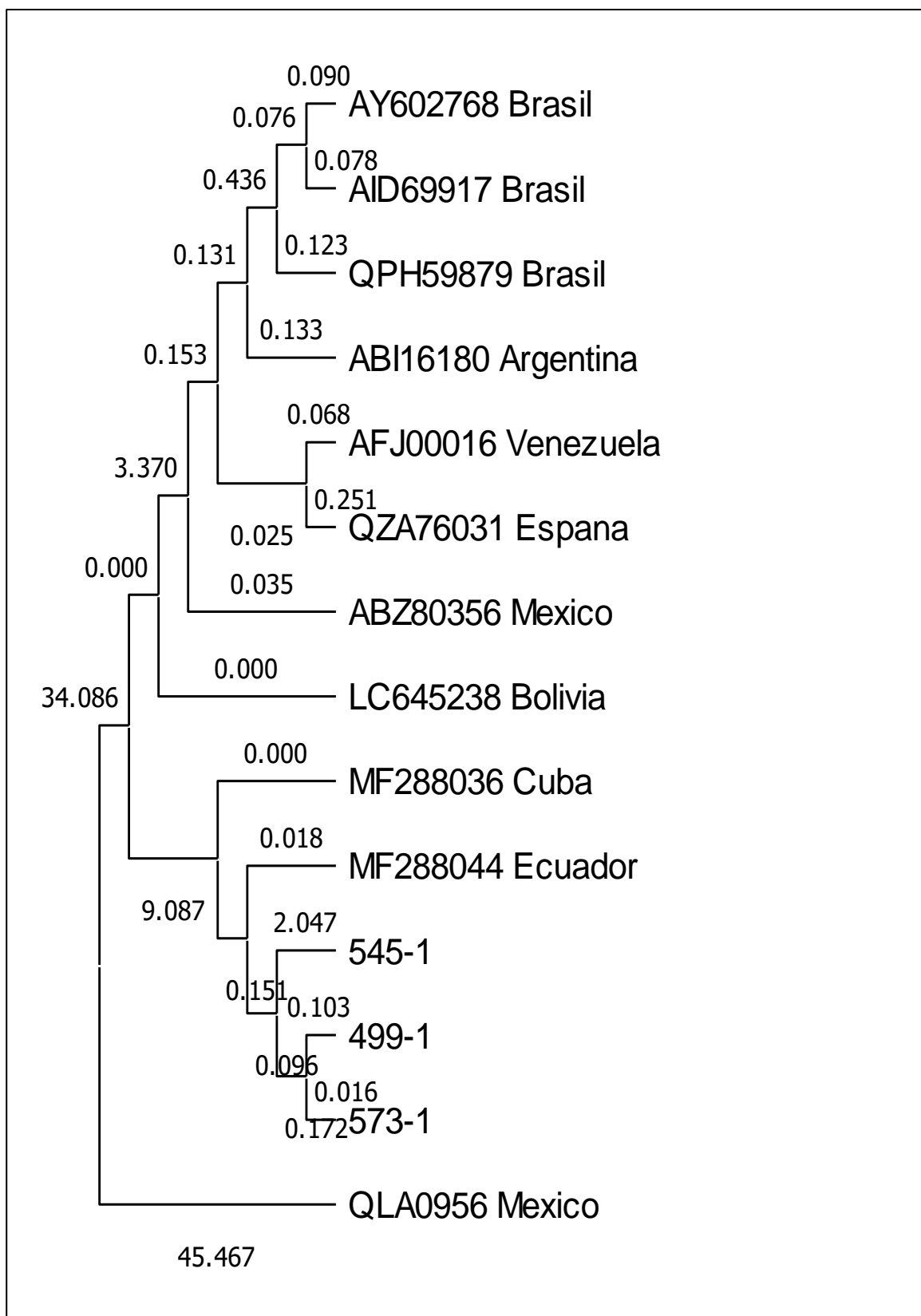


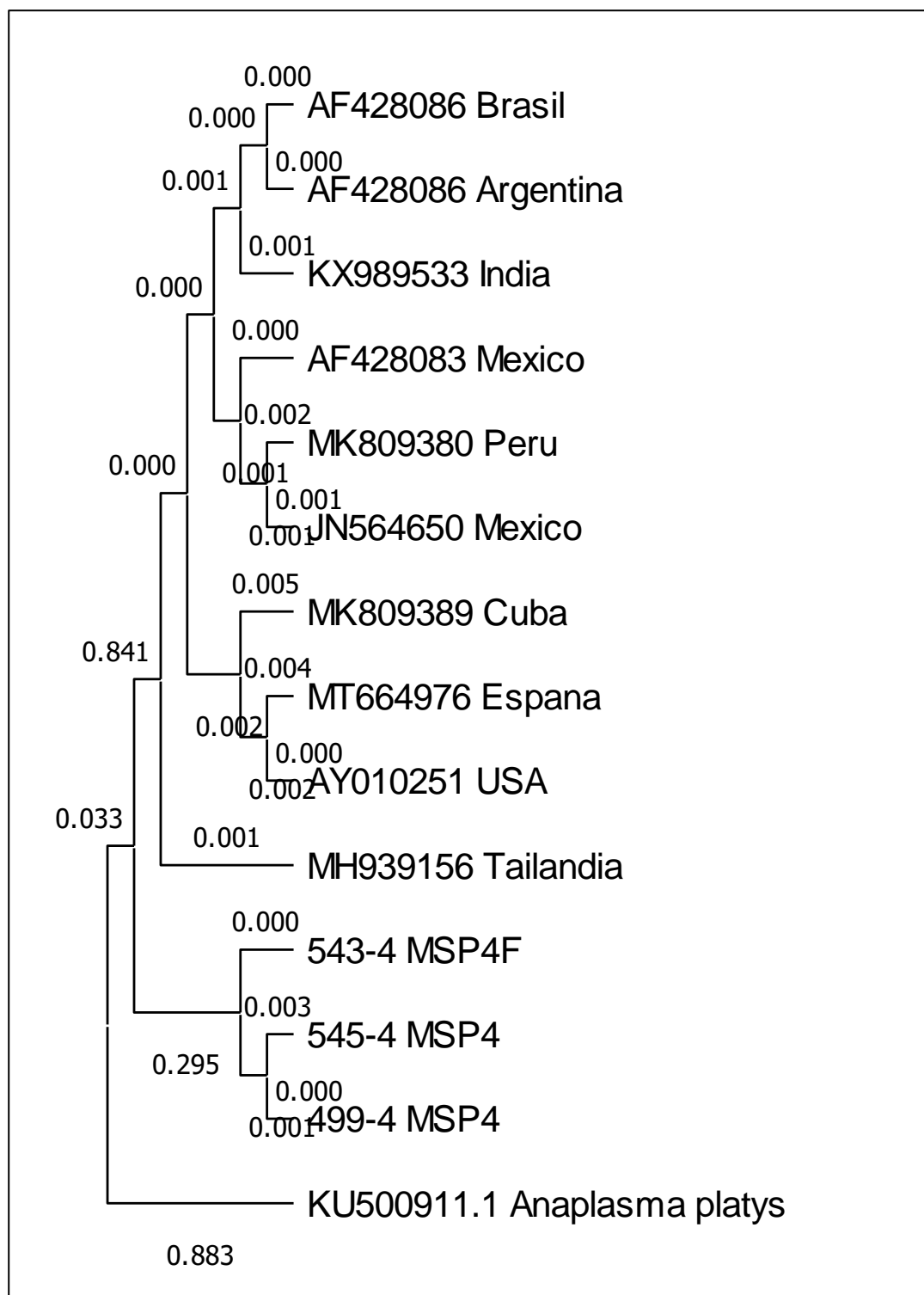
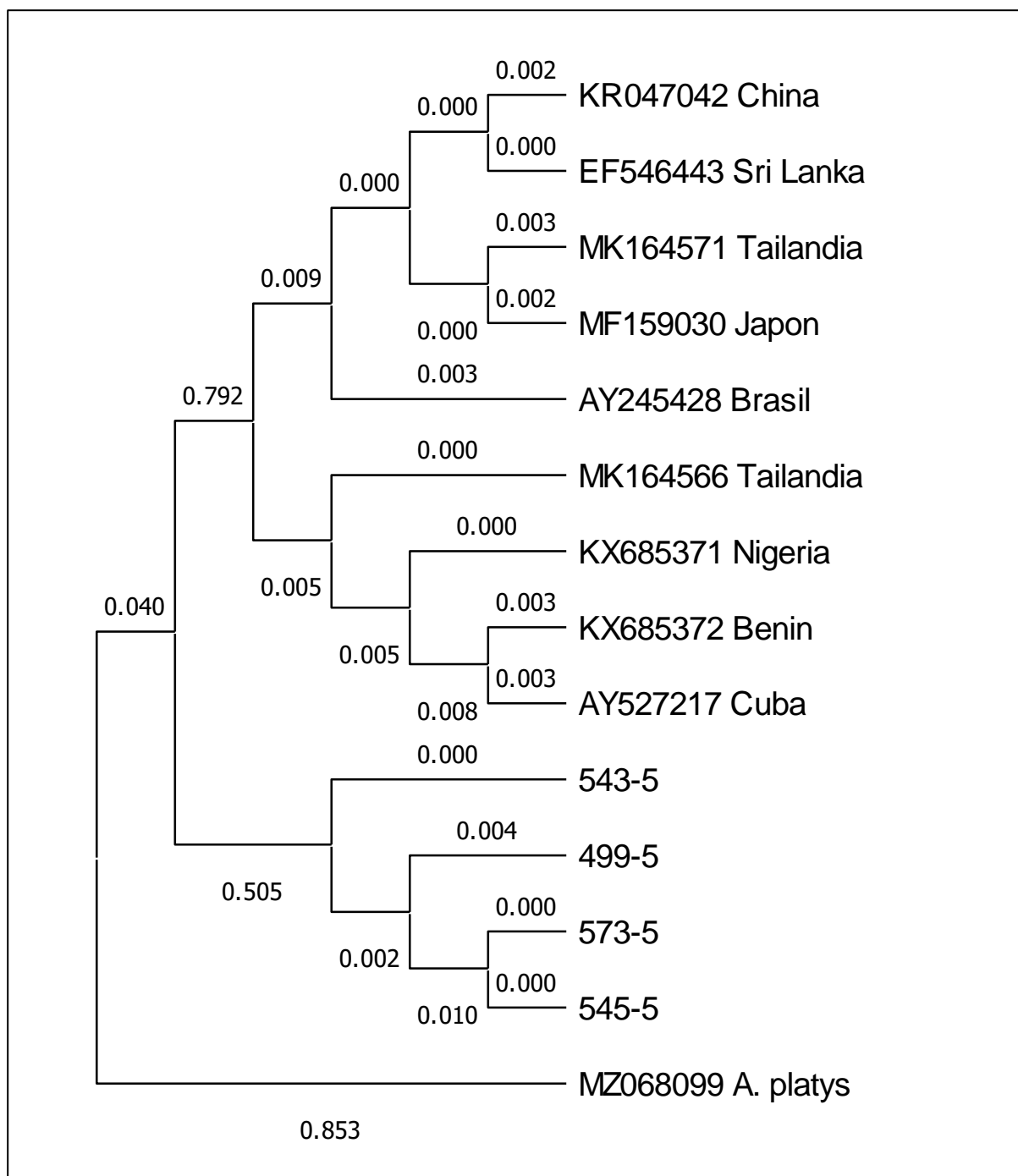
Figura 9*Árbol filogenético de msp4*

Figura 10

Árbol filogenético de *msp5*

Capítulo V: Conclusiones

El estudio actual se basó en el diagnóstico de *Anaplasma marginale* en bovinos provenientes de diferentes fincas del cantón Chone en la provincia de Manabí, mediante el uso de la técnica PCR para el gen *msp5*. El diagnóstico se realizó en un total de 193 muestras, mediante lo cual se logró establecer que la prevalencia de la enfermedad es del 81,77%. Con rangos en las POA muestreadas que van desde 61 hasta 92%. Además, que se realizó la secuenciación de las proteínas *msp1 α* , *msp4* y *msp5*, de 4 muestras (499, 543, 545, 573) para desarrollar la filogenética de *A. marginale*.

Dado que se logró establecer la prevalencia de *A. marginale* en las fincas, el cual coincide con resultados de otros autores, se demuestra el endemismo que tiene la bacteria en el ganado bovino ecuatoriano, así pues, se concluye que anaplasmosis bovina es una enfermedad presente en los rebaños del país a pesar de que los animales puedan parecer sanos, esta permanece en los animales formando ciclos de rickettsemia. Por lo que es importante diagnosticarla y evitar su propagación mediante el traslado de animales.

Al encontrarse un becerro menor a 6 meses con clínica de la enfermedad, se da a conocer un caso particular de anaplasmosis bovina, por lo que se concluye que los estudios de caracterización molecular son necesarios en el país a fin de obtener un panorama completo de la diversidad génica de las cepas circundantes en las zonas ganaderas, para poder afrontar la anaplasmosis de manera que se adapte a las cepas encontradas.

Capítulo VI: Recomendaciones

Con este trabajo se pudo evidenciar la gran prevalencia que tiene *Anaplasma marginale* en los rebaños de Chone en la provincia de Manabí, siendo esta del 81,77% de animales infectados de manera general en las diferentes fincas de las que provenían las muestras, es recomendable conocer este tipo de datos, para evitar la propagación de la bacteria a zonas con animales sanos.

Al presentarse problemas en la secuenciación de ciertos genes, entre ellos el gen *msp1α* de la muestra de interés 543, se recomienda la clonación del gen así como de otras muestras con problemas, en un vector de clonación con la finalidad de lograr una secuenciación con mayor exactitud del gen y poder realizar la caracterización molecular más detallada de las cepas de *A. marginale*.

De igual manera se recomienda este tipo de estudios en demás importantes zonas ganaderas del país a fin de discernir la variabilidad genética de las diferentes cepas de *A. marginale* con motivo de abordar mejor el control de la enfermedad.

Siendo una importante zona ganadera del país y la anaplasmosis una enfermedad que por su clínica afecta directamente a la producción de carne y leche, se recomienda el estudio y control de la enfermedad en los rebaños del país con el fin de mantener la sanidad animal del país, ya que, al encontrarse un becerro con clínica de la enfermedad, podría representar un factor de riesgo al diseminarse la cepa y afectar a otros bovinos en edades tempranas.

Capítulo VII: Bibliografía

- Aubry, P., & Geale, D. (2010). A Review of Bovine Anaplasmosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 1-30. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x>
- Battilani, M., De Arcangeli, S., Balboni, A., & Dondi, F. (2017). Genetic diversity and molecular epidemiology of Anaplasma. *Infection, Genetics and Evolution*, 195-211. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.01.021>
- Bautista, C., Angeles, L. G.-O., García-Tapia, D., Soto, C., & Montaña-Estrada, L. (2000). Variation of Peripheral Blood BoCD2+, BoCD4+, and BoCD8+ Lymphocytes, the BoCD4:BoCD8 index and IgG Antibodies in Bovines Infected and Rechallenged with Isolates of Anaplasma marginale of Mexican Origin. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 101-109.

- Brayton, K., Kappmeyer, L., Herndon, D., Dark, M., Tibbals, D., Palmer, G., . . . 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*, 844-849.
doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.0406656102>
- Corona, B., Rodriguez, M., & Martínez, S. (2005). Anaplasmosis bovina (bovine anaplasmosis). *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 1-27. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/636/63612647010.pdf>
- Coronado, A. (2001). Is *Boophilus microplus* the main vector of *Anaplasma marginale*? *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*. Obtenido de <https://link.gale.com/apps/doc/A498802717/IFME?u=anon~5d050c43&sid=googleScholar&xid=a35b4316>
- de la Fuente, J. R.-C. (2007). Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. *Veterinary Microbiology*, 382-390.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.09.015>
- de la Fuente, J., Van Den Bussche, R. A., & Kocan, K. M. (2001). De la Fuente, J., Van Den Bussche, R. A., & Kocan, K. M. (2001). Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). *Veterinary Parasitology*, 65-76. doi:[doi:10.1016/s0304-4017\(01\)00378-8](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00378-8)
- Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., . . . Rurangirwa, F. R. (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 combi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(6), 2145-2165. doi:10.1099/00207713-51-6-2145
- Eriks, I., Stiller, D., & Palmer, G. (1993). Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. *Journal of clinical microbiology*, 2091-2096.
- Gale, K., Gartside, M., Dimmock, C., Zakrzewski, H., & Leatch, G. (1996). Peripheral blood lymphocyte proliferative responses in cattle infected with or vaccinated against *Anaplasma marginale*. *Parasitology research*, 551-562.
- Garry, F. (2008). Miscellaneous Infectious Diseases. En *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle* (págs. 606-639). doi:doi:10.1016/b978-141603137-6.50018-1
- Gioia, G., Vinueza, R., Marsot, M., Devillers, E., Cruz, M., Petit, E., . . . Haddad, N. Z. (2018). Bovine anaplasmosis and tick-borne pathogens in cattle of the Galapagos Islands. *Transboundary and Emerging Diseases*, 1262-1271.
doi:<https://doi.org/10.1111/tbed.12866>
- Guarnizo, T., Alvarez, D. O., Díaz-Sánchez, A. A., Cabezas-Cruz, A., Gutiérrez, L. Z., Marrero, S. M., & Corona-González, B. (2020). Epidemiology and genetic diversity of *Anaplasma marginale* in Zamora-Chinchipec, Ecuador. *Ticks and tick-borne diseases*.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101380>
- Hove, P., Khumalo, Z., Chaisi, M., Oosthuizen, M. C., Brayton, K. A., & Collins, N. E. (2018). Detection and Characterisation of *Anaplasma marginale* and *A. centrale* in South Africa. *Veterinary sciences*, 26. doi:<https://doi.org/10.3390/vetsci5010026>
- Kieser, S., Eriks, I., & Palmer, G. (1989). Cyclic Rickettsemia during Persistent *Anaplasma marginale* Infection of Cattle. *Infection and Immunity*, 1117-1119.
doi:<https://doi.org/10.1128/iai.58.4.1117-1119.1990>

- Kocan, K., Blouin, E., & Barbet, A. (2000). Anaplasmosis Control: Past, Present and Future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 501-509.
doi:<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05329.x>
- Kocan, K., de la Fuente, J., & Cabezas-Cruz, A. (2015). The genus *Anaplasma*: new challenges after reclassification. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 577–586. doi:<https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2381>
- 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*, 285-300. doi:<https://doi.org/10.1017/s0031182003004700>
- Kocan, K., de la Fuente, J., Blouin, E., Coetzee, J., & Ewing, S. (2010). The Natural History of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, 95-107.
doi:[doi:10.1016/j.vetpar.2009.09.012](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.012)
- Kocan, K., de la Fuente, J., Guglielmone, A., & Meléndez, R. (2003). Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clinical microbiology reviews*, 698-712. doi:<https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.698-712.2003>
- Kuttler, K., & Todorovic, D. (1973). *Arthropod Borne Protozoan Infections (Affecting Domesticated)*. Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional.
Obtenido de https://pdf.usaid.gov/pdf_docs/pnaaa678.pdf
- Muñoz-Guarniz, T. R., Ayora-Fernández, P., Luzuriaga-Neira, A., Corona-González, B., & Martínez-Marrero, S. (2018). Prevalencia de *Anaplasma marginale* en bovinos de la provincia Zamora Chinchipe, Ecuador.
<http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RSA/article/view/892>. *Revista De Salud Animal*, 68–74. Obtenido de <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RSA/article/view/892>

- OIE, O. M. (2015). *Manual Terrestre de la OIE 2015*. Obtenido de http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.01_Anaplasmo
- Quiroz-Castañeda, R., Amaro-Estrada, I., & Rodríguez-Camarillo, S. (2016). Anaplasma marginale: Diversity, Virulence, and Vaccine Landscape through a Genomics Approach. *BioMed research international*. doi:<https://doi.org/10.1155/2016/9032085>
- Rar, V., Tkachev, S., & Tikunova, N. (2021). Genetic diversity of Anaplasma bacteria: Twenty years later. *Infection, Genetics and Evolution*, 91(2021), 104833. doi:10.1016/j.meegid.2021.104833
- Reyna-Bello, A. (2014). Anaplasmosis bovina: logros y retos inmediatos. En C. González-Stagnaro, N. Madrid Bury, & E. Soto Belloso, *Logros & Desafíos de la Ganadería Doble Propósito* (págs. 388-395). Maracaibo, Venezuela: Ediciones Astro Data S.A.
- Reyna-Bello, A., Cloeckert, A., Vizcaíno, N., Gonzatti, M., Aso, P., Dubray, G., & Zygmunt, M. (1998). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in Venezuela. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 259–262. doi:<https://doi.org/10.1128/CDLI.5.2.259-262.1998>
- Richey, E. (1991). Bovine anaplasmosis. *American Association of Bovine Practitioners Proceedings of the Annual Conference*, 3-11.
- Rodriguez, S., García, M., Jiménez, R., & Vega, C. (2009). Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in Mexico. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 1092-1101.
- Rodríguez, S., García, M., Torres, A., & Alarcón, R. (2003). Inmunología e inmunoprofilaxis de la anaplasmosis bovina . *Ciencia Veterinaria*,, 123-164.

- Tamekuni, K. K. (2009). Cloning, expression, and characterization of the MSP1a and MSP1b recombinant proteins from PR1 *Anaplasma marginale* strain. *Research in Veterinary Science*, 98–107. doi:doi:10.1016/j.rvsc.2008.05.016
- Tana-Hernández, L., Navarrete-Arroyo, K., Ron-Román, J., Reyna-Bello, A., & Chávez-Larrea, M. (2017). PCR-diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle populations of Ecuador and its molecular identification through sequencing of ribosomal 16S fragments. *BMC Veterinary Research*. doi:https://doi.org/10.1186/s12917-017-1311-1
- Tapia, J. (1995). Medidas de prevalencia y relación incidencia-prevalencia. *Medicina clínica*.
- Vidotto, O., & Marangoni, M. (2003). Diagnóstico em anaplasmosse bovina. *Ciencia Rural*, 361-368.