



**Evaluación de la transmisión transplacentaria de la anaplasmosis bovina, en predios  
ubicados en las áreas de influencia de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE**

Autor: Miguel Ángel Sánchez Falconí

Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Tutor: Reyna-Bello, Armando. PhD.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 01 de marzo de 2024

## Reporte de verificación de contenido



Sánchez\_Miguel\_Trabajo\_de\_Integraci...

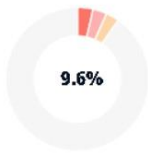
### Scan details

Scan time:  
March 1th, 2024 at 20:35 UTC

Total Pages:  
40

Total Words:  
9898

### Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
● Identical	2.8%	277
● Minor Changes	2.5%	250
● Paraphrased	2.4%	235
● Omitted Words	20.1%	1992

### AI Content Detection



Text coverage  
● AI text  
● Human text

### 🔍 Plagiarism Results: (24)

Firma:

---

Reyna Bello, Armando. PhD.

C.C: 1758891830

**Departamento de Ciencias de la Vida**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Certificación**

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Evaluación de la transmisión transplacentaria de la anaplasmosis bovina, en predios ubicados en las áreas de influencia de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE”** fue realizado por el señor **Sánchez Falconí, Miguel Ángel**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo, 01 de marzo de 2024

Firma:

---

**Reyna Bello, Armando. PhD.**

C.C: 1758891830

**Departamento de Ciencias de la Vida**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Responsabilidad de Autoría**

Yo, **Sánchez Falconí, Miguel Ángel**, con cédula de ciudadanía n° 1727446872, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Evaluación de la transmisión transplacentaria de la anaplasmosis bovina, en predios ubicados en las áreas de influencia de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE**, 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, 01 de marzo de 2024

Firma:



---

**Sánchez Falconí Miguel Ángel**

**C.C: 1727446872**

**Departamento de Ciencias de la Vida**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Autorización de Publicación**

Yo **Sánchez Falconí, Miguel Ángel**, con cédula de ciudadanía n° 1727446872, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Evaluación de la transmisión transplacentaria de la anaplasmosis bovina, en predios ubicados en las áreas de influencia de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.**

Santo Domingo, 01 de marzo de 2024

Firma:



---

**Sánchez Falconí Miguel Ángel**

**C.C: 1727446872**

## Índice

Dedicatoria .....	I
Agradecimiento .....	II
Resumen .....	1
Abstract .....	2
Introducción y estado del arte .....	3
Estado del arte .....	4
Objetivos.....	6
Marco teórico/Marco conceptual .....	7
Historia de la anaplasmosis .....	7
<i>Anaplasma marginale</i> en Ecuador.....	7
Taxonomía de <i>Anaplasma marginale</i> .....	8
Morfología de <i>Anaplasma marginale</i> .....	10
Sintomatología de la anaplasmosis .....	12
Respuesta inmune .....	14
Transmisión de la anaplasmosis .....	15
Transmisión transplacentaria de la anaplasmosis en bovinos.....	18
Diagnóstico de la anaplasmosis .....	19
Mayor Surface Proteins (MSP) de <i>Anaplasma marginale</i> .....	23
<i>Proteína principal de superficie 1 (MSP1)</i> .....	24
<i>Proteína principal de superficie 2 (MSP2)</i> .....	24
<i>Proteína principal de superficie 3 (MSP3)</i> .....	24

<i>Proteína principal de superficie 4 (MSP4)</i> .....	25
<i>Proteína principal de superficie 5 (MSP5)</i> .....	25
PCR para identificación de MSP5 .....	25
Metodología/Diseño .....	27
Metodología.....	27
<i>Toma de muestras</i> .....	27
<i>Extracción de ADN</i> .....	29
<i>Amplificación de MSP5 mediante PCR</i> .....	31
<i>Electroforesis en gel de agarosa</i> .....	32
Diseño .....	34
<i>Prevalencia de anaplasmosis</i> .....	34
Resultados .....	35
Extracción de ADN.....	35
Diagnóstico de anaplasmosis .....	36
Conclusiones y recomendaciones.....	42
Bibliografía .....	44

## Índice de Figuras

Figura 1. Eritrocitos bovinos infectados con <i>Anaplasma marginale</i> .....	10
Figura 2. Micrografía de un frotis de sangre teñido con Giemsa que muestra <i>A. marginale</i> .....	11
Figura 3. Niveles de rickettsemia aguda ( $>10^9$ ml <sup>-1</sup> ) en volúmenes de sangre bovina.....	14
Figura 4. Ciclo de vida de <i>A. marginale</i> en bovinos y garrapatas .....	17
Figura 5. Puntos de muestreo .....	28
Figura 6. Integridad del ADN genómico extraído de muestras de sangre bovinas.....	35
Figura 7. Electroforesis de los productos de PCR para el gen de la MSP5.....	36
Figura 8. Distribución de los casos positivos para anaplasmosis .....	40

## Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de la orden <i>Rickettsiales</i> .....	9
Tabla 2. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina y su propósito .....	21
Tabla 3. Ubicación geográfica de las fincas donde se efectuó el muestreo .....	27
Tabla 4. Número de muestras recolectadas .....	28
Tabla 5. Reactivos para la detección de MSP5 por PCR convencional.....	31
Tabla 6. Condiciones para los ciclos de la PCR para detección de MSP5.....	32
Tabla 7. Prevalencia de la anaplasmosis en las fincas muestreadas .....	37



## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo principalmente a mis padres, mis hermanos, primos, tios y abuelitos que siempre estuvieron ahí para apoyarme en mi carrera universitaria, que durante estos 5 años no tuvieron más que palabras de apoyo para cada ocasión en la que pudimos compartir tiempo y experiencias.

Enfatizo mi agradecimiento a mi madre, mi padre y mis hermanos que componen mi familia y lo más sagrado para mí, sin ustedes, nada de esto sería posible y doy gracias por pertenecer a sus vidas.

## **Agradecimiento**

Agradezco a mi madre Nelly Victoria Falconí Paéz y mi padre Leonardo Hernán Sánchez Torrez que financiaron toda mi carrera universitaria, haciendo esfuerzos increíbles y extraordinarios. De igual manera, a mis hermanos Leandro Ariel y Francisco Paul por ser mi motivación diaria para buscar brindarles un mejor futuro.

Agradezco de manera muy atenta a las 3 fincas las cuales permitieron que se realice el analisis del presente trabajo, a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE Sede Santo Domingo, el Rancho BJ y la Hacienda Voluntad de Dios que confiaron en mi para manejar sus animales y permitieron que este estudio fuera posible.

Al Dr. Armando Reyna, por permitirme realizar este trabajo bajo su tutela y brindarme grandes consejos sobre la investigación y ayudar a cultivar pasiones en mi sobre nuevas áreas de la ciencia.

Al Dr. William Castillo por la inmensa ayuda brindada a la consecución de este trabajo, que sin él, nada de esto hubiera sido posible, y constituye parte integral de todo este analisis.

Al Ing. Fausto Bedoya que dirigió mis esfuerzos por aprender en el laboratorio y estuvo al pendiente que toda la investigación estuviera a la altura de un laboratorio profesional.

Quiero agradecer a todas y cada una de las personas que llegaron a componer mi vida estudiantil en la universidad, que para bien o mal me enseñaron grandes lecciones sobre compañerismo, amistad, amor y vida. No me alcanzan las palabras para explicar todo lo que cada uno de mis compañeros significan pero solo tengo que decir gracias y espero tener mucho más tiempo para agradecerles.

## Resumen

La anaplasmosis bovina es una enfermedad relevante en la producción ganadera, causa fiebre, ictericia, anemia y, en casos extremos, la muerte. Se transmite principalmente por garrapatas, insectos hematófagos y jeringas contaminadas, también se ha llegado a reportar la transmisión transplacentaria, aunque su impacto en Ecuador es desconocido. El diagnóstico se realiza mediante tinciones en frotis sanguíneos, ELISA o PCR, siendo esta última más precisa. El objetivo del presente trabajo fue detectar la transmisión transplacentaria en bovinos mediante PCR y se amplificó una banda de 806 pb en el 89,47% de hembras en 38 muestras colectadas. De estas madres, se identificaron 2 becerros neonatos (con menos de 10 días de nacidos) positivos, por tanto, 5,26% de las muestras. En este trabajo se demostró la existencia de la transmisión transplacentaria con aislados de *A. marginale* del Ecuador, incrementando sensiblemente el conocimiento de la epidemiología de la enfermedad.

*Palabras clave:* *A. marginale*, transmisión transplacentaria, MSP5, PCR.

### Abstract

Bovine anaplasmosis is a relevant disease in livestock production, it causes fever, jaundice, anemia and, in extreme cases, death. It is transmitted mainly by ticks, blood-sucking insects and contaminated syringes. Transplacental transmission has also been reported, although its impact in Ecuador is unknown. The diagnosis is made by staining blood smears, ELISA or PCR, the latter being more precise. The objective of this work was to detect transplacental transmission in cattle by PCR and a band of 806 bp was amplified in 89.47% of females in 38 samples collected. From these mothers, 2 positive neonatal calves (less than 10 days old) were identified, therefore, 5.26% of the samples. In this work, the existence of transplacental transmission was demonstrated with isolates of *A. marginale* from Ecuador, significantly increasing knowledge of the epidemiology of the disease.

*Keywords:* *A. marginale*, transplacental transmission, MSP5, PCR.

## Introducción y estado del arte

El sector de la agricultura, ganadería, silvicultura y pesca representó para el Ecuador un valor de USD 16,075 Millones en ventas netas dentro del periodo enero-octubre del 2023, por lo que se convierte en el tercer sector con más importancia en el país (Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca, 2023). Específicamente el sector de cría de ganado, otros animales, productos y actividades de apoyo, registró \$515,82 MM de valor agregado bruto en 2020 (Corporación Financiera Nacional, 2021). En gran medida el sector ganadero del Ecuador es indispensable para la economía nacional, por lo que el control de las enfermedades que afectan las ganaderías, mejorará la productividad y rentabilidad de sus productos y derivados, ofreciendo al consumidor final, un producto de menor precio y mejor calidad.

Precisamente, la enfermedad causada por *Anaplasma marginale* (*A. marginale*) llamada anaplasmosis bovina, puede afectar directamente a la ganancia de peso o producción de leche en el ganado bovino (Reyna-Bello, 2014). La sintomatología clínica de la anaplasmosis es principalmente la fiebre y anemia acompañados de ictericia, deshidratación, decaimiento y pérdida de la producción, incluso en México es la causa de más del 26% del total de muertes por año, en caso que estos animales se recuperen e inicien la fase crónica de la enfermedad, se convierten en portadores persistentes de *A. marginale* de por vida (Rodríguez-Camarillo y otros, 1999; Reyna-Bello, 2014).

La rickettsia *A. marginale* se transmite por la picadura de garrapatas, tábanos u otros insectos hematófagos, jeringas contaminadas o incluso la transmisión vertical, es decir de forma transplacentaria (Kocan, de la Fuente, Guglielmone, & Meléndez, 2003).

Los animales jóvenes que adquieren la bacteria, no muestran la expresión clínica de la enfermedad y se convierten en animales persistentemente infectados, sirviendo como

reservorio de la enfermedad, presentando un estado agudo a lo largo de su vida al cuando se inmunosuprimen por falta de alimento, también por parir, deshidratación, entre otros (Kocan y otros, 2003, Reyna-Bello, 2014).

El proceso de evaluación de la transmisión transplacentaria de la anaplasmosis en bovinos presenta una complejidad inherente al momento de determinar con precisión la ruta de transmisión en en zonas endémicas, debido que la muestra en los neonatos, debe ser tomada lo más pronto posible, para evitar su infección.(Añez-Rojas y otros, 2010; Gonzalez Grau y otros, 2013).

Por lo tanto, en el presente estudio se evaluó la transmisión transplacentaria de la anaplasmosis en becerros bovinos mediante la amplificación del gen que codifica para la proteína MSP5 del genoma de *A. marginale* mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) punto final de muestras sanguíneas de madres y sus becerros en 3 fincas ubicadas en la región litoral del Ecuador.

### **Estado del arte**

En los años de 1983 y 1985, Norton y Zaugg, respectivamente, llevaron a cabo estudios y observaciones que permitieron inferir en la posible transmisión transplacentaria de la enfermedad, ya que pudieron observar *A. marginale* en los frotis de fetos y neonatos menores de 3 meses.

En Latinoamérica, se han realizado estudios que confirman la transmisión transplacentaria de la anaplasmosis bovina. En Brasil, Gonzalez et al. (2013) en un estudio usando muestras de sangre de 30 vacas en 3 periodos de tiempo: inseminación artificial, diagnostico gestacional y después del parto, y además muestras de sus correspondientes crías previas a la ingesta de calostro y un máximo de 3 días de vida se logra identificar la transmisión transplacentaria. Estas muestras de sangre se procesaron mediante IFAT (indirect fluorescent

antibody test, por sus siglas en inglés) y se detectó anticuerpos específicos para *A. marginale* en el 100% de las muestras, mientras que usando ELISA indirecto (enzyme-linked immunosorbent assay, por sus siglas en inglés) se determinó un 97%, por el contrario, empleando PCR (polymerase chain reaction) un 63,3% de las vacas eran portadoras de *A. marginale*;

Para el caso de los becerros con 3 días de edad, todos fueron seropositivos por IFAT, y un 6,7% (2/30) de los becerros dieron un resultado positivo por PCR, lo que representa una transmisión transplacentaria del 10,5%. En el estudio mencionado, se demostró que en un área donde la anaplasmosis no es endémica se puede dar la transmisión transplacentaria incluso en vacas con un cuadro crónico

En Venezuela, Añez-Rojas et al. (2010) tomaron sangre periférica de la vena yugular de 34 vacas lactantes (31 con buen estado físico corporal sin lesiones aparentes) y 35 becerros (un parto de gemelos) con una edad entre 1 y 330 días, para identificar por PCR el gen que codifica para la subunidad de MSP1 (Major Surface Protein) de 409 bp, primero se extrajo el ADN genómico de la muestra de sangre usando el método fenol-cloroformo. De las 31 vacas consideradas asintomáticas, se logró determinar una prevalencia de 70,9% (22/31) para anaplasmosis, y un 50% (10) de los becerros fueron positivos para la presencia del genoma de *A. marginale*, mencionando que 5 de estos tenían menos de 15 días y que los becerros gemelos (8 días de edad) exhibían un comportamiento similar (positivos) siendo altamente improbable que se hayan infectado por otra vía que no sea la transplacentaria.

En Argentina un estudio de 167 vacas gestantes donde analizó suero y sangre, se logró determinar la presencia de *Anaplasma spp.* por PCR/MSP5 en 2 lugares de recolección de muestra distintos: en la región "Espinal" se determinó que un 79,4% de las hembras gestantes y 5,3% de sus fetos eran positivos; en la región "Chaco húmedo" el 100% de las vacas y un 25% de sus terneros fueron positivas para PCR/MSP5+ (*Anaplasma spp.*)

Por PCR-MSP1a se detectó la presencia de *A. marginale* en el 1,5% y 15,6% de los becerros de Espinal y Chaco húmedo respectivamente, al secuenciar estas muestras se encontraron 9 genotipos y un ternero llevaba el mismo de su madre. Además este genotipo no se logró reproducir en infecciones experimentales definiendo la poca relevancia epidemiológica que tiene la transmisión transplacentaria (Sala, 2013).

## **Objetivos**

General:

Evaluar la transmisión transplacentaria de la anaplasmosis bovina, en predios ubicados en las áreas de influencia de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Específicos:

Realizar muestreos en vacas gestantes cercanas al momento del parto, para evaluar por PCR la presencia de la rickettsia.

Realizar muestreos a becerros neonatos para evaluar la presencia del hemotrópico por PCR.

Determinar la presencia de ADN del agente hemotrópico en neonatos y correlacionar estos resultados con las madres.



## Marco teórico/Marco conceptual

### Historia de la anaplasmosis

En el año de 1893 Theobald Smith y Frederick Kilborne llegan a identificar por primera vez la transmisión de enfermedades en bovinos por la garrapata *Rhipicephalus (boophilus) annulatus* y concluyen que los puntos marginales de 0,2 a 0,5  $\mu m$  de diámetro observados en los eritrocitos al microscopio, eran parte del ciclo de vida de piroplasma (ahora *Babesia bigemina*) (Smith & Kilborne, 1893).

Es hasta el año de 1910 que Arnol Theiler reporta que esos puntos marginales dentro de los eritrocitos son causantes de una enfermedad diferente y la denomina *Anaplasma marginale* (*A. marginale*) pero preserva la idea de que es un protozoario (Theiler, 1910). Luego se le reclasifica dentro del orden Rickettsiales basado en el análisis genético del rRNA 16S, groESL y genes que codifican para proteínas de superficie (Dumler, y otros, 2001).

### *Anaplasma marginale* en Ecuador

Se ha establecido que la anaplasmosis en bovinos es endémica en nuestro continente desde Centro América, Sudamérica y México con ciertas excepciones de los Andes y desiertos (Kocan, Fuente, Blouin, Coetzee, & Ewing, 2010)

En el territorio del Ecuador, el primer reporte por identificación molecular de *A. marginale* fue realizado por (Gioia, y otros, 2017) en donde se registró la prevalencia de anaplasmosis bovinas en garrapatas (*Rhipicephalus microplus*) recolectadas de las 3 principales islas del archipiélago de Galápagos (Santa Cruz, San Cristóbal e Isabela), revelando a la anaplasmosis como endémica en el archipiélago. En la zona continental del país usando PCR/MSP5 y secuenciación de fragmentos 16S ribosomal se estableció la presencia de *A. marginale* en el 86.1% de los animales muestreados en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas en el año de 2017 (Tana Hernández, Navarrete Arroyo, Ron Román, Reyna Bello,

& Chávez Larrea, 2017). En la provincia de Zamora Chinchipe se determinó una prevalencia global de 49.5% usando frotis sanguíneos de muestras de sangre teñidos con Giemsa, donde se obtienen valores distintos en base a criterios como edad (57,7% menores a 1 año, 47,6% 1-2 años, 41,7% 2-4 años y 47,1% mayores a 4 años) y sexo (46.5% machos y 50,3% hembras) (Muñoz Guanizo, Ayora Fenández, Luzuriaga Neira, Corona González, & Martínez Marrero, 2017).

Molina Chávez y otros (2022) en una revisión sobre la prevalencia de la anaplasmosis en la región amazónica del Ecuador revela que existen prevalencias de 65,51% en Pastaza. 49,50% en Zamora Chinchipe, 44,70% en Sucumbíos, 44,24% en Morona Santiago y 20% en Napo.

### **Taxonomía de *Anaplasma marginale***

Incluso después de haberse identificado como un organismo diferente a Babesia, *A. marginale* era considerado como un parásito protozooario endoglobular por la principal característica de presentar cuadros clínicos similares a la babesiosis (Theiler, 1910).

En base a las observaciones de la estructura interna de *A. marginale* Philip en 1957 divisó semejanzas con las rickettsias por lo que se creó la familia *Anaplasmataceae* y el género *Anaplasma* dentro del orden de las *Rickettsiales*.

Posteriormente gracias a la secuenciación de la región 16S del ARNr se cambió la clasificación y ubicaron *A. marginale* dentro del genogrupo II de las *Ehrlichias*, las cuales reflejan mejor su descripción al ser patógenos de animales y humanos que se transmiten por garrapatas (Biberstein, 1999).

El orden de las *Rickettsiales* ha sido establecido incluyendo la familia de *Anaplasmataceae* como se muestra a continuación según Kocan et al. (2004).

Tabla 1

Clasificación de la orden *Rickettsiales*

<b>Orden <i>Rickettsiales</i></b>
<p>Familia <i>Rickettsiaceae</i></p> <p style="padding-left: 40px;">Género <i>Rickettsia</i></p> <p style="padding-left: 40px;">Género <i>Orientia</i></p>
<p>Familia <i>Anaplasmataceae</i></p> <p style="padding-left: 40px;">Género <i>Anaplasma</i></p> <p style="padding-left: 80px;"><i>Anaplasma marginale</i></p> <p style="padding-left: 80px;"><i>Anaplasma centrale</i></p> <p style="padding-left: 80px;"><i>Anaplasma ovis</i></p> <p style="padding-left: 80px;"><i>Anaplasma bovis</i> (<i>Ehrlichia bovis</i>)</p> <p style="padding-left: 80px;"><i>Anaplasma phagocytophilum</i></p> <p style="padding-left: 80px;"><i>Anaplasma platys</i></p> <p style="padding-left: 80px;"><i>Aegyptianella</i></p> <p style="padding-left: 40px;">Género <i>Ehrlichia</i></p> <p style="padding-left: 80px;"><i>Ehrlichia chaffeensis</i></p> <p style="padding-left: 80px;"><i>Ehrlichia ruminantium</i></p> <p style="padding-left: 80px;"><i>Ehrlichia ewingii</i></p> <p style="padding-left: 80px;"><i>Ehrlichia ovis</i></p> <p style="padding-left: 80px;"><i>Ehrlichia canis</i></p> <p style="padding-left: 80px;"><i>Ehrlichia muris</i></p> <p style="padding-left: 40px;">Género <i>Neorickettsia</i></p> <p style="padding-left: 80px;"><i>Neorickettsia helminthoeca</i></p>

<b>Orden <i>Rickettsiales</i></b>
<i>Neorickettsia risticii</i>
<i>Neorickettsia sennetsu</i>
Género <i>Wolbachia</i>
<i>Wolbachia pipientis</i>

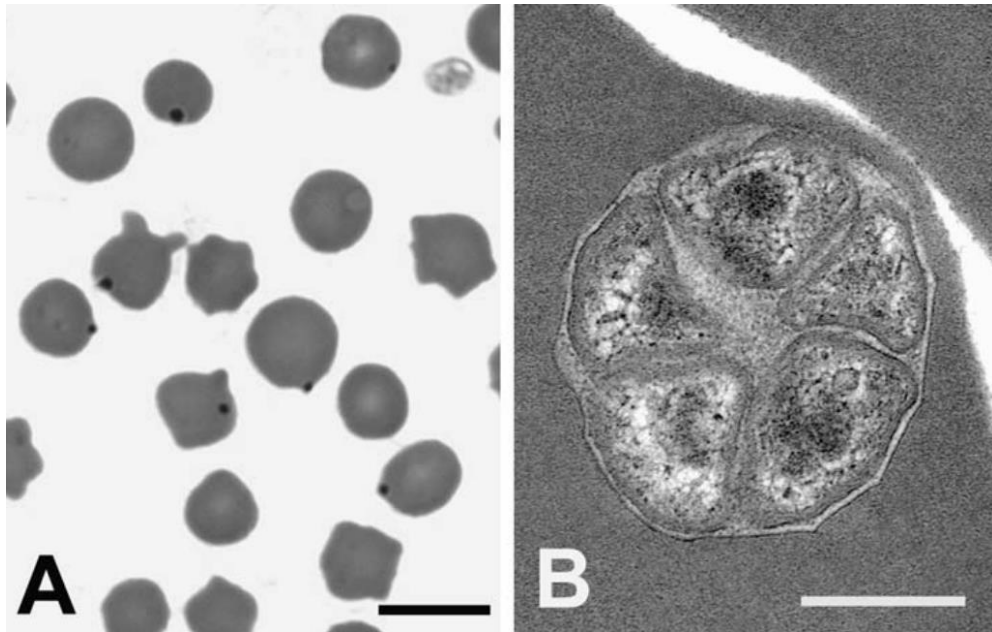
### **Morfología de *Anaplasma marginale***

El género *Anaplasma* está caracterizado por no poseer una cromátida organizada en un núcleo con membrana limitante, además de la falta de un retículo endoplásmico (Rodríguez Camarillo, García Ortiz, Aboytes Torres, Cantó Alarcón, & Barigye, 2003-2004).

Según Kocan et al. (2004) *A. marginale* se replica en bovinos dentro de sus eritrocitos, que al ser teñidos con Giemsa pueden ser observados bajo el microscopio óptico como una forma de uno o varios cuerpos redondeados de color púrpura rojizo con un tamaño aproximado entre 0,2 y 1,0  $\mu m$  de diámetro que se ubican en la periferia o margen de los eritrocitos (figura 1), siendo realmente raro que se encuentren en el centro del eritrocito (figura 2).

Figura 1

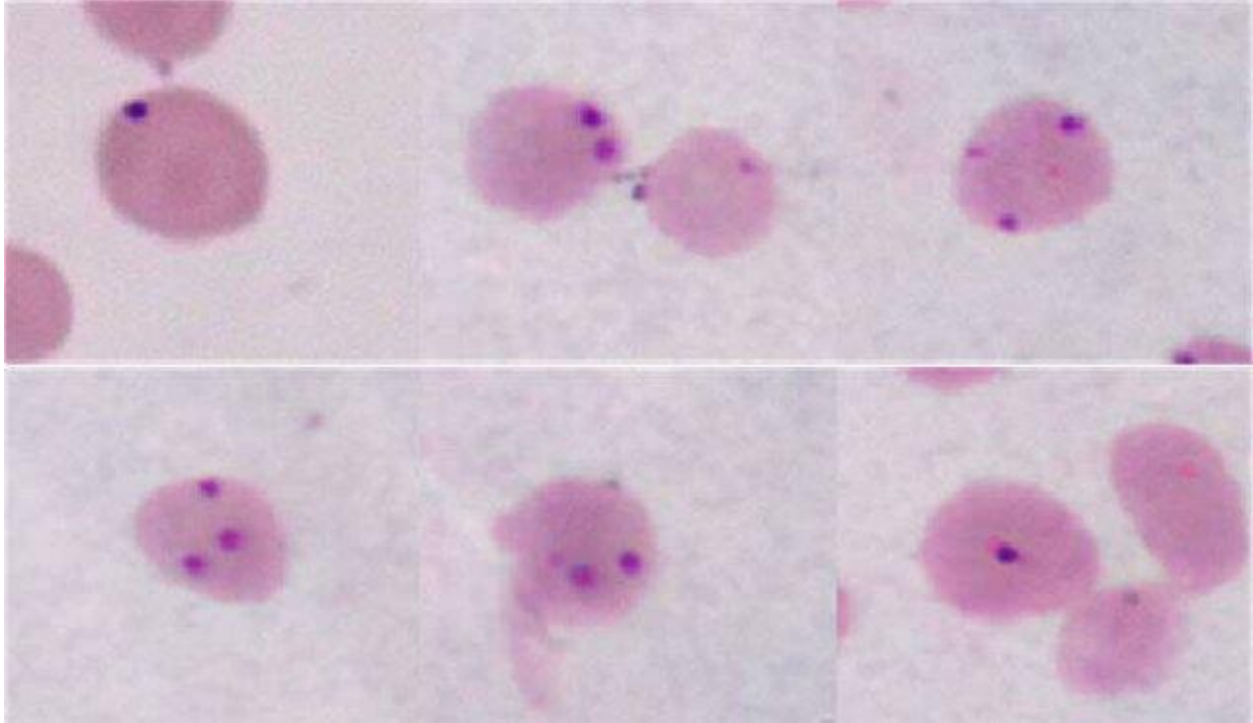
Eritrocitos bovinos infectados con *Anaplasma marginale*



*Nota:* (A) Cuerpos de inclusión en la periferia de los eritrocitos en frotis sanguíneos teñidos con Giemsa a 10000x. (B) Micrografía electrónica de una inclusión de *A. marginale* que contiene 5 organismos. Tomado de *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host–pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia, por Kocan et al. (2004), Department of Veterinary Pathobiology.

*Figura 2*

Micrografía de un frotis de sangre teñido con Giemsa que muestra *A. marginale*.



*Nota:* Tomado de Diagnostic approaches for tick -borne hemoparasitic diseases in livestock, por Salih, Hussein & Singla (2015), Journal of Veterinary Medicine and Animal Health.

### **Sintomatología de la anaplasmosis**

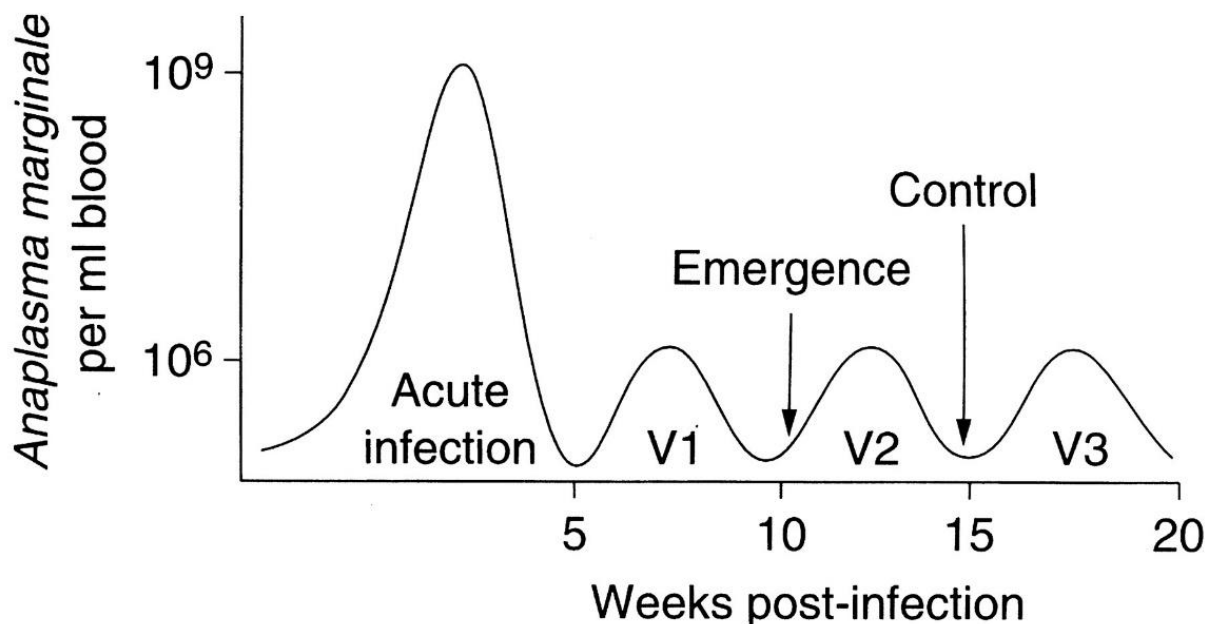
La anaplasmosis bovina es una enfermedad infecciosa de presentación aguda o crónica en animales adultos que se caracteriza por presentar anemia, ictericia e hipertermia; y una debilidad severa, emaciación, anemia e ictericia en algunos casos donde el animal llega a morir (Radostits, Gay, hinchcliff, & Constable, 2007).

Debido a la variación antigénica que le confiere la proteína MSP2 (por sus ciclas en inglés de Mayor Surface Protein), la enfermedad transcurre con ciclos recurrentes de pirexia concomitantes a los picos de rickettsemia (figura 3) (Palmer, Rurangirwa, Kocan, & Brown, 1999). Según este autor la infección empieza con la fase de incubación en periodos de 7 a 60 días, con un promedio de infección de 28 días, acompañado de aumento de temperatura y la posible detección de la anaplasmosis. Luego empieza la fase aguda (V1) con un aumento de la

población bacteriana en 4 o 9 días dando lugar a que sea posible fagocitar los eritrocitos por células reticuloendoteliales bovinas y así se desarrolla anemia e ictericia, palidez de mucosas, pérdida de peso, letargo y depresión, llegando hasta causar abortos y muerte en los periodos finales de la fase aguda. En la fase V2 la MSP2 cambia sus epítomos por un proceso de recombinación génica que da lugar a los periodos de repoblación de la bacteria en los eritrocitos. En la última fase se llegan a dar ciclos de aumento y disminución en los niveles de *A. marginale* con niveles no detectables de la bacteria, convirtiéndose en un reservorio de la enfermedad con fase crónica de la anaplasmosis con una inmunidad concomitante (Richey, 1991; Kocan y otros, 2010; Richey, 1991)

Figura 3

Niveles de rickettsemia aguda ( $>10^9$  ml<sup>-1</sup>) en volúmenes de sangre bovina.



*Nota:* Ciclos de rickettsemia en intervalos de 5 semanas denominando los ciclos como V1, V2 y V3 al analizarse las variantes de MSP2. Tomado de Antigenes and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle, por Kocan y otros (2003), *Clinical Microbiology Reviews*.

### Respuesta inmune

La respuesta inmune frente al *A. marginale* por parte del bovino, es extremadamente compleja, ya que los eritrocitos invadidos por *A. marginale*, no pueden presentar los antígenos vía CMH I, es así que la respuesta principal es inmunomediada principalmente vía CMH II, no obstante, a medida que los eritrocitos son fagocitados, la presentación también ocurre vía CMHI a nivel del bazo (Rodríguez Camarillo y otros, 2003-2004; Vidotto & Marangoni Marana, 2001).



En la respuesta celular, después de la desnaturalización y digestión de las proteínas en péptidos más cortos que son asociados al CMH II, donde se transportan a la superficie del macrófago para ser detectado por las células T cooperadoras CD4+ (Th CD4+) y formar el complejo antigénico péptido-CMH, estas 2 señales sirven para que se inicie la producción de interleucina 2 (IL 2) y la expresión de los receptores en la superficie del linfocito Th CD4+. Los macrófagos producen el factor de necrosis tumoral y en mayor cantidad IL 1 por las interacciones mencionadas, entonces, se produce interferón gamma por las células Th1. Siguiendo con la cascada de reacciones, se estimula la síntesis de IgG2 e IgM, además de la activación de los macrófagos, mientras que Th2 produce interleucinas 2, 6 y 10 para estimular la producción de IgG1. Las células T cooperadoras también incluyen Th1 que estimula la producción de IL2 e interferón gamma, IgM e IgG2 por las células B y activar los macrófagos. Los macrófagos aumentan su eficiencia al darse la opsonización y a su vez existe una exacerbación en la respuesta de células T CD4+ (Rodríguez Camarillo y otros, 2003-2004; Bautista Garfias, 1996).

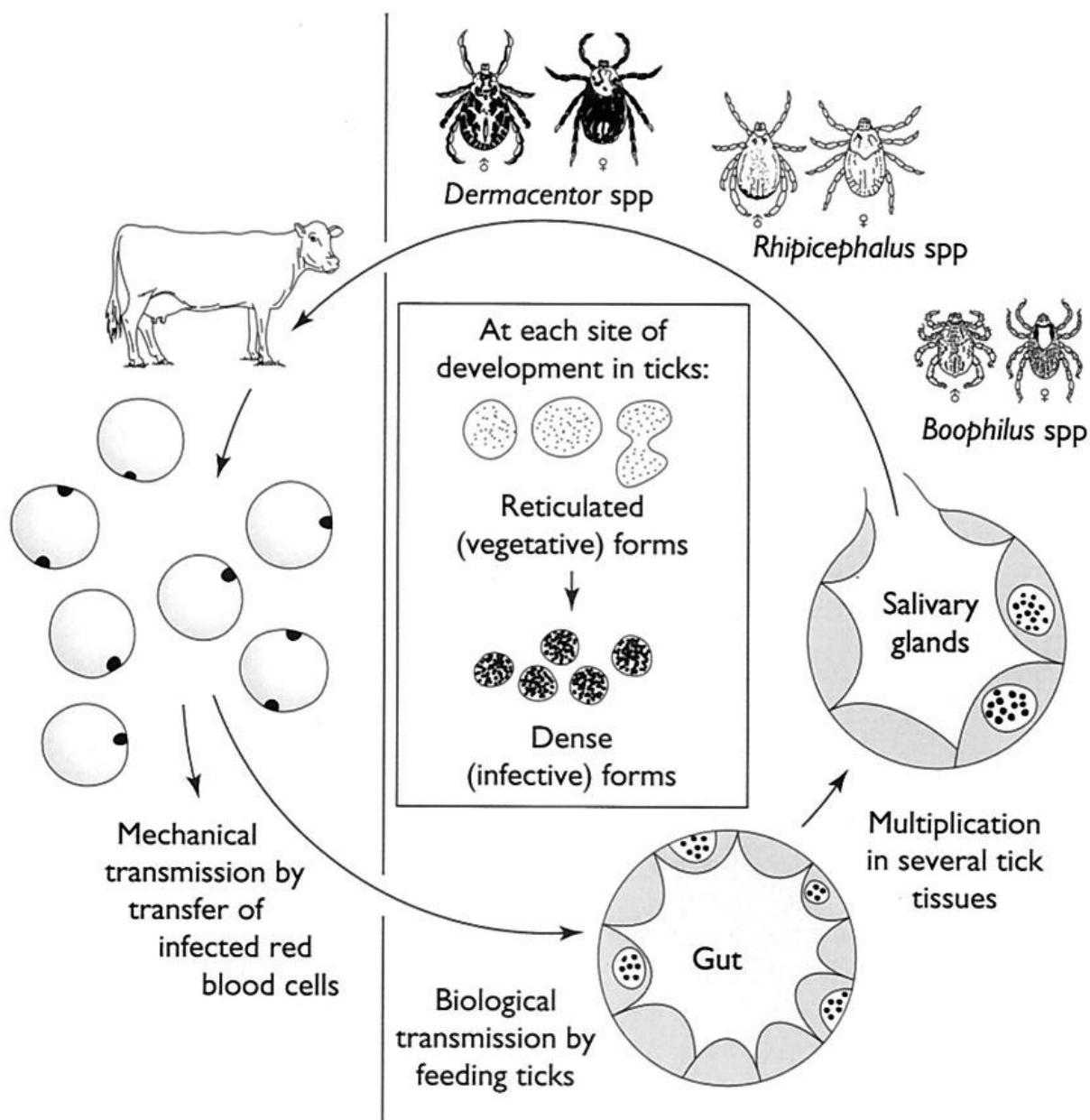
### **Transmisión de la anaplasmosis**

La transmisión de *A. marginale* en bovinos puede darse por 3 vías, la mecánica por picaduras de mosquitos o iatrogénicamente (castración, reutilización de la misma jeringa, descorné o utilización de instrumental contaminado). La vía biológica por garrapatas (Kocan, Fuente, Blouin, Coetzee, & Ewing, 2010) y transplacentaria en áreas endémicas, es decir, que la infección de la rickettsia es circular y se encuentra en constante reinfección por la incapacidad del sistema inmune bovino de eliminar la bacteria por la capacidad que esta tiene de expresar epítomos únicos al recombinar los genes que expresan las proteínas que recubren la membrana plasmática, es así que, al darse constantes ciclos de infección es más probable que en un pico alto de los niveles de población bacteriana esta sea capaz de atravesar la

barrera placentaria e infectar el feto bovino (Gonzalez Grau, da Cunha Filho, Geraldo Pappen, & da Rosa Farias, 2013).

La transmisión por garrapatas *Dermacentor*, presentes en Estados Unidos, y *Rhipicephalus microplus* en Latinoamérica, atraviesa una etapa reticular cuando estos artrópodos se infectan con la rickettsia al alimentarse de ganado bovino infectado. Posteriormente la bacteria infecta las células epiteliales del intestino e inicia su replicación y luego estas ascienden a las células acinares de las glándulas salivales donde son excretadas conjuntamente a la saliva para iniciar la succión de la sangre del bovino (Amaro Estrada, y otros, 2020). La siguiente fase se trata de la infección dentro de eritrocitos maduros, donde se replican hasta 16 individuos en una vacuola y luego estos cuerpos infectivos salen por exocitosis a infectar otros eritrocitos en el torrente sanguíneo hasta duplicar el número cada 24 o 48 horas (Bautista Garfias, 1996). En la figura 4 se puede ver como se da el ciclo de replicación en las garrapatas y como los bovinos infectados llegan a ser reservorio de la rickettsia.

Figura 4

Ciclo de vida de *A. marginale* en bovinos y garrapatas.

*Nota:* Infección de las células intestinales, salivares de la garrapata para posterior infección vía biológica a los eritrocitos de bovinos. Tomado de Antigenes and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle, por Kocan y otros (2003), *Clinical Microbiology Reviews*.

La vía de transmisión mecánica se reporta por artrópodos dípteros hematófagos del género *Tabanus*, *Stomoxis* y mosquitos, eso es común en la zona de África, América Central y del Sur o Estados Unidos (Kocan, Fuente, Blouin, Coetzee, & Ewing, 2010). En este sentido, Medina-Naranjo (2017) en un estudio sobre el diagnóstico de *A. marginale* por ELISA indirecto en fincas de Pastaza-Ecuador, muestra que la presencia o ausencia de garrapatas no está directamente relacionado con el diagnóstico positivo o negativo para la presencia de *A. marginale* por lo que otras vías o factores pueden estar incidiendo en la dispersión de la enfermedad.

### **Transmisión transplacentaria de la anaplasmosis en bovinos**

La transmisión transplacentaria es dependiente de la región, factores ambientales como el clima, la raza del ganado, la presencia de vectores y la variación génica exhibida por los aislados que se puedan encontrar en la zona (Sonia Costa, y otros, 2016). De esta forma se llega a tener diversos resultados de la transmisión transplacentaria desde la ausencia (Piercy, 1956; Kuttler y otros, 1962), niveles de infección baja (Passos & Lima, 1984), o incluso una transmisión moderada (Maldonado y otros, 2012; Silva y otros, 2014).

Según Zaugg (1990) la transmisión transplacentaria se da cuando la madre sufre un cuadro agudo y la *A. marginale* atraviesa la barrera placentaria y logra introducirse dentro del feto para trasladarse a una fase intraeritrocitaria (Zaugg J. L., 1990). Siempre que una zona sea endémica para anaplasmosis, la transmisión transplacentaria se debe tener en cuenta ya que, en poblaciones endémicas, se evidencia continuamente la transmisión vertical (Rey, Aso, & Coronado, 2000). Sin embargo, se ha demostrado que animales adultos en estado persistentemente infectados (casos crónicos), igual pueden transmitir la enfermedad a sus crías (Gonzalez Grau, da Cunha Filho, Geraldo Pappen, & da Rosa Farias, 2013).

## Diagnóstico de la anaplasmosis

El diagnóstico de esta enfermedad se dificulta ya que no existe sintomatología diferencial por la ausencia de signos patognomónicos, además de la ausencia de cuerpos de inclusión suficientes para ser detectados por métodos tradicionales como el frotis en animales crónicos. No obstante, la tinción sanguínea con Giemsa del frotis permite identificar la enfermedad en estado clínico a niveles de 0.1-0.2% ( $10^6$  eritrocitos infectados por ml de sangre) siendo poco sensible para detectar fases crónicas o en estadio de reservorio; también se menciona la hibridación de ácidos nucleicos para detectar parasitemia entre 0.0025 y 0.000025% con sondas radioactivas que deriven del gen *mSP1*, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando la amplificación del gen *mSP5* es uno de los métodos más ampliamente utilizado (Corona González y otros, 2014).

Sin embargo, existen métodos indirectos como ensayos serológicos del tipo o fijación del complemento, aglutinación en tubos capilares, aglutinación rápida en tarjeta, ensayos de IFI, y las pruebas Dot-ELISA y ELISA (Corona González y otros, 2014).

El control de la anaplasmosis, necesita de métodos de diagnóstico que permitan conocer la prevalencia del microorganismo en las diferentes zonas de los países tropicales y subtropicales, además que permitan identificar de forma segura los animales portadores para el movimiento de animales a zonas libres del hemoparásito. El diagnóstico de esta enfermedad se basa principalmente, en los hallazgos clínicos, métodos directos a través de frotis sanguíneos (Gainer, 1961) y métodos serológicos tales como inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA) (Corona González, y otros, 2014).

El frotis sanguíneo teñido con Giemsa es la prueba más utilizada para la identificación de *A. marginale*. Sin embargo, se ha demostrado que este colorante puede originar falsos positivos debido a ciertos depósitos precipitados sobre las células rojas similares a la rickettsia,

o falsos negativos, que resultan cuando el porcentaje de glóbulos rojos infectados es muy bajo. Además, muestra dificultad para poder diferenciar entre *A. marginale* y *A. centrale*, cuando existen niveles bajos de rickettsemia (OIE, 2015).

En muchas ocasiones, la ausencia de sintomatología grave puede llevar a que el reconocimiento de la anaplasmosis sea deficiente, por lo que el uso de técnicas avanzadas como PCR y ELISA son una alternativa fiable por su alta sensibilidad y especificidad (Medina-Naranjo, y otros, 2017). El diagnóstico de anaplasmosis bovina mediante PCR/MSP5 ya se ha registrado su uso en el estudio de Tana Hernández y otros (2017).

En la siguiente tabla se aprecia cómo es recomendable el uso de ciertas técnicas para los diversos propósitos que puede tener el diagnóstico de la anaplasmosis como demostrar ausencia de circulación de la bacteria en la población, ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos, contribuir a las políticas de erradicación, confirmar casos clínicos, determinar la prevalencia de la infección-vigilancia y determinar el estado *inmunitario* en animales o poblaciones tras la vacunación, esto según el Manual Terrestre de la OIE (2015).

Tabla 2

Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina y su propósito.

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de circulación del virus en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Examen microscópico	–	+	–	+++	–	–
<b>Identificación del agente<sup>1</sup></b>						
PCR	–	+++	–	+++	–	–
<b>Detección de la respuesta inmunitaria</b>						
CAT	–	–	–	–	+–	+
ELISA	+++	+	+++	–	+++	+++
IFA	+	–	–	–	++	++
CF	–	–	–	–	+	–

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito.  
 Aunque no todas las pruebas clasificadas como +++ o ++ han sido validadas formalmente, su uso sistemático y el hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hace aceptables.  
 CAT = prueba de aglutinación en placa; CF = fijación del complemento; ELISA = enzimoimmunoanálisis; IFA = prueba de la inmunofluorescencia indirecta; PCR = reacción en cadena de la polimerasa.

*Nota:* Tomado de Sección 3.4. Bovidae. Capítulo 3.4.1. Anaplasmosis Bovina del Manual Terrestre de la OIE (2015).

El manual citado hace hincapié en combinar métodos de identificación del agente en la misma muestra para poder obtener un mejor resultado y validación.

Para un examen microscópico de *A. marginale* el Manual Terrestre de la OIE nos menciona lo siguiente:

Las muestras obtenidas a partir de ganado vacuno vivo deben incluir frotis de gota fina de sangre y sangre recogida con anticoagulante. Los frotis de gota fina secados, se mantienen de modo satisfactorio a temperatura ambiente por lo menos 1 semana. Las

muestras de sangre con coagulante deben mantenerse a 4°C, a menos que puedan llegar al laboratorio en unas pocas horas. Esta muestra es útil para preparar frotis frescos si los anteriores no fueran satisfactorios. Además un hematocrito bajo y/o un recuento de eritrocitos bajo puede ayudar a poner de manifiesto *A.marginale* cuando en los frotis se detecta solo un bajo número de parásitos, como puede ocurrir en la fase de recuperación de la enfermedad (OIE, 2015, pág. 4).

La técnica de tinción Giemsa se caracteriza por ser altamente estandarizada, y conlleva consideraciones específicas para el diagnóstico en bovinos, así como para muestras procedentes de órganos o animales fallecidos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que esta técnica tiene una limitación temporal: los resultados suelen ser visibles entre 2 y 6 semanas después de la transmisión, alcanzando su punto máximo en número alrededor del décimo día, para luego disminuir a una velocidad similar. Esta demora puede influir en el diagnóstico, especialmente cuando hay una baja concentración de la rickettsia presente (OIE, 2015).

Las pruebas serológicas como la inmunoenzimática de competición (C-ELISA), el ELISA indirecto (I-ELISA) o la prueba de aglutinación en placa (CAT) son las preferidas en laboratorios cuando la infección ha superado los 14 días. Sin embargo, la sensibilidad y especificidad de estas pruebas pueden variar debido a un enfoque inadecuado en muestras que se consideran verdaderos positivos o negativos, especialmente en casos de infecciones de larga duración. La excepción a esto son las muestras utilizadas como controles, previamente verificadas mediante PCR anidada. Por tanto, es crucial ejercer especial precaución al certificar la enfermedad mediante estas pruebas (OIE, 2015).

Para la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el Manual Terrestre de la OIE (2015) menciona lo siguiente:



Se han desarrollado pruebas basadas en los ácidos nucleicos para detectar *A. marginale* en el ganado vacuno portador, aunque todavía no están totalmente validadas. La sensibilidad analítica de los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha estimado que es del 0,0001% de los eritrocitos infectados, pero a este nivel solo se detectaría una parte del ganado portador (OIE, 2015, págs. 4-5).

En el texto se enfatiza que esta técnica si bien no está estandarizada como el frotis sanguíneo con Giemsa, tiene un nivel de detección muy alto que incluso puede aumentarse más hasta reconocer apenas 30 eritrocitos infectados por mililitro de sangre cuando se emplea una PCR anidada, o también se pueden tener ventajas adicionales al usar PCR en tiempo real al acceder a uno o varios genes, o también al ARNr 16S con niveles de sensibilidad similares a la PCR anidada (OIE, 2015).

### **Major Surface Proteins (MSP) de *Anaplasma marginale***

El genoma de *A. marginale* es circular y tiene un tamaño aproximado de entre 1200 y 1260 kbp, con un contenido de G+C del 56% (Alleman, Kamper, Viseshakul, & Barbet, 1993). De hecho, este genoma fue secuenciado completamente, en 2004 por Brayton, y colaboradores, encontrando en la cepa *St. Maries* 1.197.687 bp. Además, identificaron dos superfamilias de proteínas con terminales transmembranales, correspondientes a la superfamilia MSP2 y MSP1. Esto permitió estudiar a mayor profundidad como la recombinación génica de pseudogenes y genes conformacionales, pueden constituir variabilidad antigénica a la bacteria.

Dentro de su genoma se ha encontrado que codifican para las 6 principales proteínas de superficie (MSP, Major Surface Proteins por sus siglas en inglés) que pueden ofrecer información sobre las secuencias de genes, proteínas recombinantes, anticuerpos monoespecíficos y monoclonales, además de ser identificable la variabilidad de los distintos

aislados geográficos en base a las proteínas. MSP1a, MSP4 y MSP5 son codificados por genes únicos, mientras que MSP1b, MSP2 y MSP3 son expresadas por familias multigénicas (Kocan, de la Fuente, Guglielmone, & Meléndez, 2003).

### **Proteína principal de superficie 1 (MSP1)**

Esta proteína es un heterodímero que está formado por 2 polipéptidos que se denominan MSP1a y MSP1b que son codificados por genes distintos siendo que MSP1a es codificado por un gen único, mientras que MSP1b por 2 genes llamados MSP1b<sub>1</sub> y MSP1b<sub>2</sub> (Barbet et al., 1987). El tamaño de esta proteína se puede aproximar a 105 KDa variando según la recombinación génica, la cual le confiere una región antigénicamente variable (Allred et al., 1990). Bowie et al (2002) menciona que esta proteína se mantiene constante dentro del huésped y durante su transmisión biológica por el vector *Dermacentor* en específico la especie *Dermacentor variabilis* (Bowie et al., 2002).

### **Proteína principal de superficie 2 (MSP2)**

Esta proteína como se ha mencionado pesa 36 KDa y está compuesta por subunidades peptídicas que se encuentran unidas por puentes de disulfuro, esta proteína es codificada por una familia mutigénica y una serie de pseudogenes, que se recombina durante la infección para expresar variables antigénicas (Palmer et al., 1988; Palmer et al., 1994).

### **Proteína principal de superficie 3 (MSP3)**

Esta proteína varía tanto en propiedades antigénicas como en su estructura en cada uno de sus aislados geográficos, que en general puede tomar un tamaño aproximado de 86 KDa (Allerman & Barbet, 1996). Esta proteína está implicada junto con MSP2 en la inducción de una respuesta inmunológicamente protectora contra la rickettsia (Kocan, de la Fuente, Guglielmone, & Meléndez, 2003)

### **Proteína principal de superficie 4 (MSP4)**

Esta proteína se encuentra codificada por un solo gen y presente un peso de 31 KDa es bien conservada, lo que le confiere un potencial para poder ser utilizada en la inmunización en animales (Oberle et al., 1993).

### **Proteína principal de superficie 5 (MSP5)**

Esta proteína de 19 KDa fue codificada por un solo gen de 633 bp es conservada y muy inmunogénica, con la capacidad de ser reconocida por sueros postinfección, lo que indica su gran potencial para ser un antígeno útil en el diagnóstico serológico (Visser et al., 1992).

### **PCR para identificación de MSP5**

El primer estudio indexado en la plataforma PubMed Central investigó el uso de la proteína mayor de superficie 5 (MSP5) para detectar *Anaplasma marginale* en bovinos infectados de forma natural mediante PCR anidada (nPCR). En esta PCR se obtienen bandas de 458 bp tras la electroforesis en gel de agarosa, incluso con una concentración diluida de [10<sup>-3</sup>] *A. marginale* por eritrocito infectado, lo que indica una detección efectiva de tan solo 30 eritrocitos infectados por mililitro de sangre (Torioni de Echaide et al., 1998).

Si bien, el uso de una nPCR puede ser recomendable, una PCR convencional también exhibe buenas cualidades de sensibilidad y especificidad al contar con detección de un nivel de parasitemias de hasta 0.000025% (Corona & Martínez, 2011).

El uso de primers que amplifiquen el gen que codifica para MPS5 es diverso y muy útil en identificar molecularmente la identidad de la secuencia amplificada de 643 bases de longitud, como en garrapatas *Hyalomma asiaticum* mostrando una similitud del 99% del producto de PCR/MSP5 con el gen reportado EF546443 de *A. marginale* y mostrar un análisis de detección mucho más consistente que la examinación bajo microscopio de tinciones, además, de ser mucho más sensible ya que exhibe resultados positivos en muestras que

parecían ser negativas por examinación en microscopio, lo que conlleva una detección de la rickettsemia en niveles mucho más bajo y más eficiente en el diagnóstico temprano de la enfermedad (Zhang et al., 2013).

La amplificación del gen que codifica para MSP5 también pueden servir para establecer un análisis filogenético y genotípico de ganado, camellos y búfalos tras amplificar este gen por PCR y así pueden establecerse relaciones entre *A. marginale* reportadas en bases de datos y las estudiadas a través del mundo (Mahmoud et al., 2023).

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se emplea para amplificar el fragmento de ADN de 806 pares de bases conocido como Mayor Surface Protein 5 (msp5), con el fin de detectar y confirmar la presencia de *A. marginale* en muestras. Los cebadores utilizados para amplificar este fragmento son 19A (5'-GTGTCCTGGGGTACTCCTA-3') y 19B (5'-TGATCTGGTCAGCCCCAGCT-3') (Reyna-Bello et al., 1998). La búsqueda de amplificación de esta proteína se basa en su alta conservación en todos los *Anaplasma* detectados y al menos un epítipo conservado de esta proteína (Reyna-Bello et al., 1998).

Según describe Reyna-Bello (1998), las concentraciones para la master mix de PCR incluyen 100 µL que contienen 10 mM de Tris-HCL (pH 9,0), 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.1% de Triton X-100, 0.2 mg de gelatina por ml, 200 µM de cada trifosfato de desoxinucleósido, 1 µM de cada cebador, 100 ng de ADN genómico y 2.5 U de Taq DNA polimerasa. Con este protocolo, se logró amplificar una secuencia de 714 pares de bases, y se confirmó la identidad de este gen mediante una digestión con enzimas de restricción para evaluar la corrección de los cortes que se realizan con AluI, EcoRI, EcoRV, HaeIII, HindIII, Sau3AI, SspI, Styl y TaqI de la empresa Appligene.

## Metodología/Diseño

### Metodología

#### *Toma de muestras*

Se realizó un muestreo por conveniencia y no probabilístico en tres fincas (figura 3) ubicadas geográficamente como se muestra en la tabla 3. Igualmente se señalan en la tabla 4, el número de animales muestreados en cada una de las fincas seleccionadas.

Tabla 3

Ubicación geográfica de las fincas donde se efectuó el muestreo

Finca	Provincia	Cantón	Parroquia	Ecosistema	Coordenadas
F1	Santo	Santo		Selvático cálido	
	Domingo de los	Domingo de los	Luz de América	húmedo con media densidad	-0.41230351136127097, -79.309665772x45165
	Tsáchilas	Tsáchilas		vegetal	
F2	Santo	Santo		Selvático cálido	
	Domingo de los	Domingo de los	Luz de América	húmedo con alta densidad	-0.353919705860835, -79.25426086210437
	Tsáchilas	Tsáchilas		vegetal	
F3				Selvático cálido	
	Los Ríos	Ventanas	Los Ángeles	húmedo con alta densidad	-0.5672162678153114, -79.4374014846566
				vegetal	

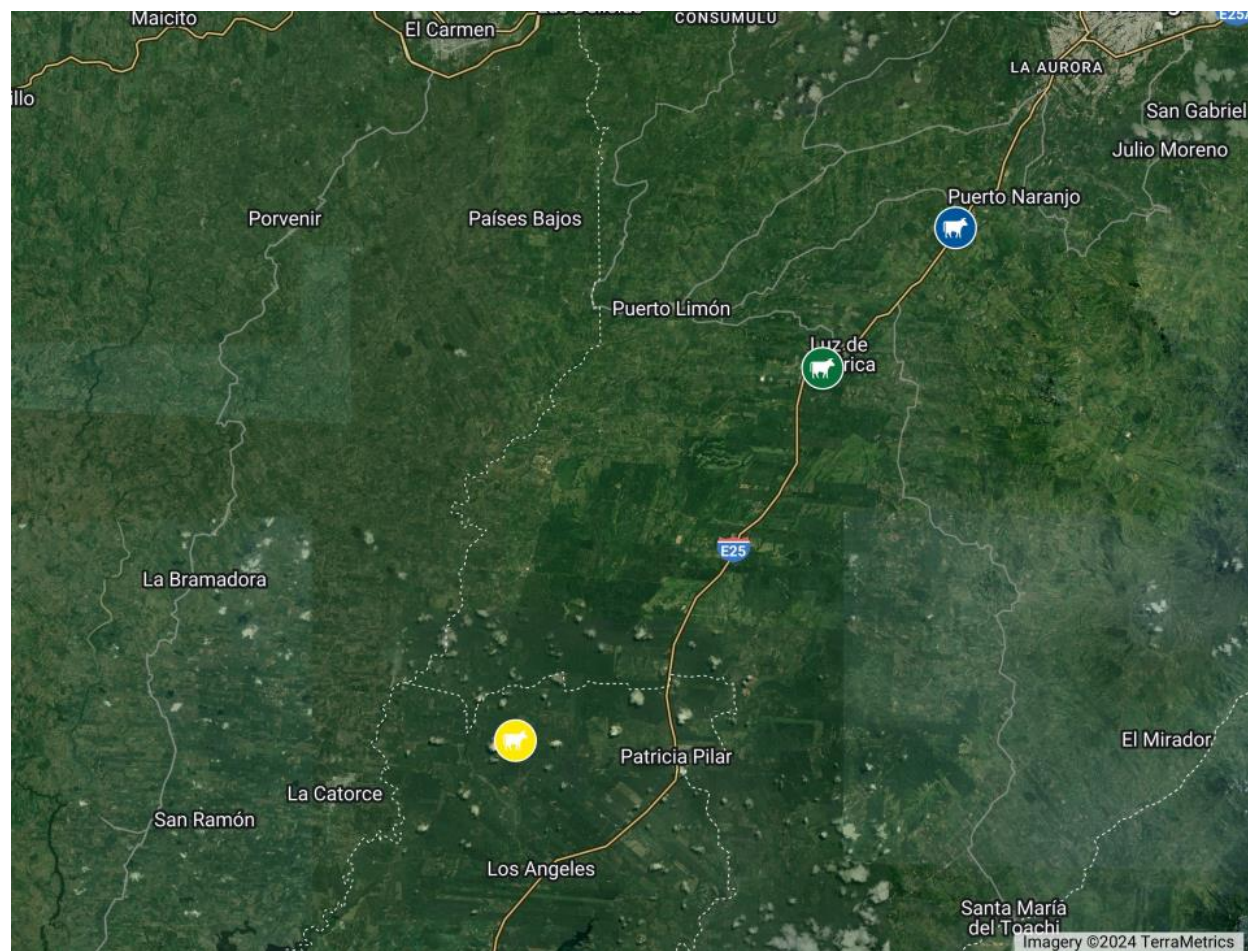
Tabla 4

Número de muestras recolectadas

Número de Finca	Número de vacas madres	Número de becerros
1	6	6
2	2	2
3	30	30
Total	38	38

Figura 5

Puntos de muestreo



*Nota:* Mapa del Ecuador con las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas y Los Ríos, donde el marcador verde corresponde a la finca 1, el marcador azul a la finca 2 y el marcador amarillo a la finca 3. Adaptado de TerraMetrics (2024).

Para la toma de muestra sanguíneas bovinas madres, se establecieron como criterios que sean gestantes próximas a parir de más de 8 meses o recién paridas y para los neonatos la edad máxima para tomar la muestra fue de 17 días. Cumpliendo este criterio, se tomaron 76 muestras de madres con sus sendas crías, siendo: 38 madres y 38 crías.

Se tomó la sangre en un tubo lila al vacío con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de 5 mL con un equipo Vacutainer, en las madres se realizó una punción en la vena coccígea usando 1 aguja por animal; para los becerros, la muestra se obtuvo de una punción en la vena yugular también en tubos con presencia de EDTA, agitando los tubos por inversión para evitar que se coagule la muestra, al llevar la muestra al laboratorio se la conserva a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

### ***Extracción de ADN***

Se extrajo el ADN genómico usando el kit comercial GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (K0781, K0782) usando el protocolo que ofrece la casa comercial Thermo scientific.

Brevemente, se añade el paso que se emplea en la extracción de volúmenes grandes de sangre total ya que se excede el volumen recomendado de  $200\ \mu\text{L}$  y se debe romper los globulos rojos lo que ayudará a liberar la bacteria de la célula. Entonces se toma  $500\ \mu\text{L}$  de sangre total y se añade  $1000\ \mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas en un tubo estéril de microcentrífuga de  $1.5\ \text{mL}$ .

El tubo de microcentrífuga se agitó en vortex (Genie 2) por 5 minutos a temperatura ambiente a la máxima potencia del equipo.

Posteriormente, se centrifuga a 10000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente en la centrifuga refrigerada (Hettich, MIKRO 200R) una vez terminado el ciclo se descarta el sobrenadante en un envase designado para desechos infecciosos, con ayuda de una micropipeta 1000  $\mu\text{L}$  y se re-suspende el pellet en 200  $\mu\text{L}$  de PBS 1X (el cual fue previamente diluido a partir de una concentración 10X) con ayuda del Vórtex a máxima potencia.

En el tubo se añade 400  $\mu\text{L}$  de solución de lisis y 20  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (20 mg/mL) que vienen incluidos en el kit y se homogeniza por vortex, incubándose a 56°C en baño maría (LAUDA, ALFA) y con agitación (vortex, Genie 2) durante 10 minutos.

Luego, se añade 200  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto mezclando por pipeteo con el líquido del tubo De microcentrífuga. Esta mezcla se transfiere a una columna de purificación del kit con un tubo de recogida, y se centrifuga a 10000 rpm durante 1 minuto en la centrifuga refrigerada (Hettich, MIKRO 200R), luego se descartó el tubo de recogida junto con el líquido y se colocó la columna en un nuevo tubo de 2 mL

A continuación, se hace un lavado con 500 $\mu\text{L}$  de Wash buffer I (incluido en el kit), centrifugar por 1 minuto a 10000 rpm en la centrífuga refrigerada, una vez centrifugado, se descarta el flujo y se añaden 500  $\mu\text{L}$  de Wash buffer II (incluido en el kit) centrifugando a 10000 rpm durante 3 minutos, para descartar el flujo al terminar el ciclo y volver a centrifugar la columna a velocidad máxima para evaporar cualquier resto de etanol y luego descartar el flujo junto con el tubo.

Finalmente se transfiere la columna a un tubo estéril de 1.5 mL donde se eluye el ADN de la columna con buffer de elución (incluido en el kit) y se centrifuga en 2 ciclos a 10000 rpm por 2 minutos con 40  $\mu\text{L}$  y luego se añaden otros 10  $\mu\text{L}$  del buffer de elución para terminar conservando el ADN a -20°C hasta continuar el proceso.



### **Amplificación de MSP5 mediante PCR**

Para la detección del ADN de *A. marginale*, se empleó una PCR que amplifica el gen *msp5*, para ello se utilizaron los cebadores 19A (5'-GTGTTCCCTGGGGTACTCCTA-3') y 19B (5'-TGATCTGGTCAGCCCCAGCT-3') (Reyna-Bello, y otros, 1998).

La reacción se realizó a un volumen final de 25  $\mu$ L en tubos para PCR de 200  $\mu$ L, en la *tabla 5*, se detallan los volúmenes y las concentraciones de los componentes para la PCR y en la *tabla 6*, las condiciones de los ciclos que se usaron en el termociclador (<sup>3</sup>Prime, TECHNE) para la detección de *A. marginale*.

Tabla 5

Reactivos para la detección de MSP5 por PCR convencional

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Volumen Final (<math>\mu</math>L)</b>
H2O	-	16,225
Buffer	1X	2,5
MgSO4	2,5 mM	2,5
F	0,5 $\mu$ M	1,25
R	0,5 $\mu$ M	1,25
dNTP	0,2 mM	0,125
Taq	0,75 U/ $\mu$ L	0,15
DNA	100 ngr	1
<b>Volumen total</b>		<b>25</b>

Tabla 6

Condiciones para los ciclos de la PCR para detección de MSP5.

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	45 seg	35
Hibridación	64	30 seg	35
Extensión	72	1 min	35
Extensión final	72	10 min	1
Mantenimiento	4	∞	-

Para evitar una contaminación por parte del operador, la master mix para la PCR se realizó en una cámara de flujo laminar aura mini de BIO AIR, mientras que la adición del ADN a los tubos de PCR con 24  $\mu$ L de master mix se hizo en la cámara de flujo laminar THERMO Forma, habiéndolas desinfectado con hipoclorito de sodio (1%), agua y alcohol, asegurando la desinfección de ambas con luz UV por 15 minutos, propia de cada cámara.

### ***Electroforesis en gel de agarosa***

#### **Integridad del ADN extraído.**

Para revisar la integridad del ADN extraído mediante el kit se realizó una electroforesis de las muestras en un gel de agarosa 0,8% (p/v). Para ello se pesó en una balanza analítica (sartorius, Entris) 0,672 gramos de agarosa (ABM, BioGENA) y se añadió en un matraz Erlenmeyer de 125 mL junto con 84 mL de solución TAE 1X (la cual se preparó diluyendo una solución TAE 50X) medidos en una bureta de 100 mL. Esta mezcla se llevó a ebullición en un microondas hasta que se disuelva la agarosa en el TAE.

Posteriormente, se homogeniza en un agitador magnético (PHOENIX, RSM-10HP) a 300 rpm hasta que se encuentre a una temperatura de 56°C y a continuación, añadir el bromuro de etidio como agente intercalante en proporción 1/10000 con respecto al volumen de gel a preparar, por lo que se añadió 8,5 µL, llevando a homogenizar nuevamente en el agitador magnético.

Pasados 5 minutos, se vierte el gel líquido en la cámara de electroforesis con los 2 peines ya puestos, dejando solidificar 20 minutos para posteriormente llenar la cámara hasta cubrir el gel por completo con solución TAE 1X.

Luego de cargar las muestras de ADN (2 µL) junto con 1 µL de buffer de carga en todos los pocillos (20 en el extremo superior y 12 en el inferior) exceptuando en el pocillo de la esquina superior izquierda, donde se cargó 5 µL de marcador de peso molecular (ABM, 100bp Opti-DNA Marker Cat# G016) tapamos la cámara de electroforesis y conectamos a la fuente de poder (Thermo, EC1000-90) configurando el programa para que funcione durante 45 min y 100V constantes.

Pasado el tiempo de la electroforesis, revelamos el resultado de la integridad poniendo el gel en un transiluminador UV (EZEE clearview, Cleaver Scientific) anotando los resultados con respecto a las muestras cargadas, notando que la fluorescencia nos indicará la integridad del ADN.

### **Electroforesis del producto de PCR para MSP5**

El producto de las PCR se reveló en electroforesis en gel de agarosa 1.5% (p/v) teñido con bromuro de etidio. Para eso empleamos un protocolo similar al seguido para evaluar la integridad del ADN, cambiando el volumen del gel preparado de 84 mL a 50 mL ya que se va a usar una cámara de electroforesis (Mini HS) de 24 pocillos en la cual se utiliza 2 peines de 12

pocillos cada uno. Además, se carga 10 µL del producto de la PCR junto con 2 µL del buffer de carga y se coloca en la esquina el mismo marcador de peso molecular de 100 bp.

De igual manera, se configura la fuente de poder a 100 V constantes por 45 minutos para revelar el resultado de la PCR en el transiluminador y anotar los resultados del diagnóstico de *A. marginale* por PCR/MSP5

### **Diseño**

Al ser un estudio de diagnóstico de la presencia de *A. marginale* por PCR convencional se aplica un diseño no experimental donde únicamente se verifica la amplificación del gen que codifica para la proteína MSP5 de 806 bp.

### **Prevalencia de anaplasmosis**

Para determinar la prevalencia de las poblaciones de las madres y las crías se emplea una ecuación descrita por Tapia (1995).

$$Prevalencia = \frac{\text{Número de casos positivos}}{\text{Número total de casos}} \times 100$$

En cuanto a la transmisión transplacentaria se determina el porcentaje usando la siguiente formula:

$$\% \text{transmisión} = \frac{\text{Número de becerros positivos}}{\text{Número de madres positivos}} \times 100$$

Teniendo en cuenta que se contarán para el análisis únicamente los becerros cuando la madre es positiva.

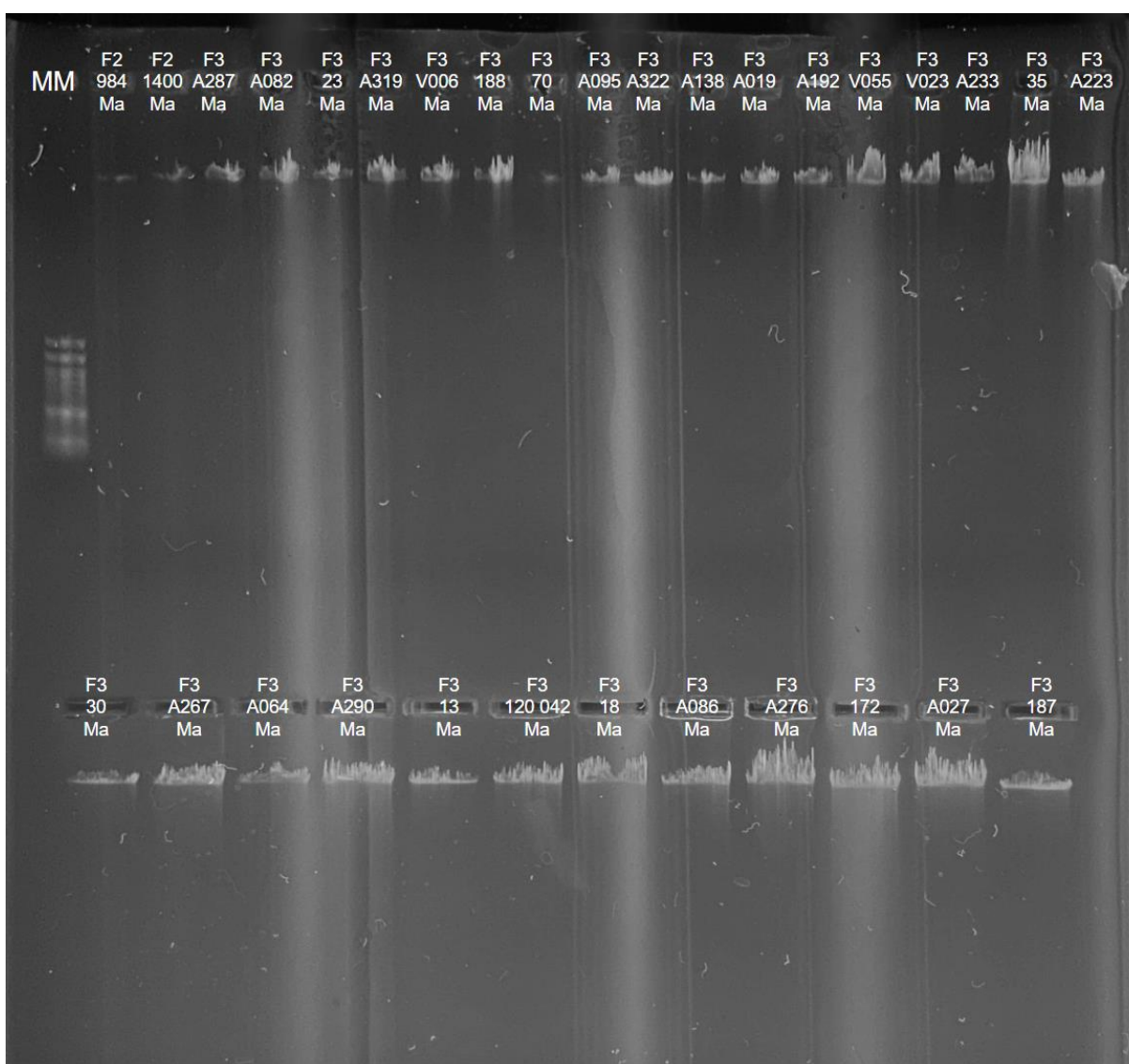
## Resultados

### Extracción de ADN

La extracción de ADN se verificó evidenciando una banda por encima de los 1000 bp en el gel de agarosa en todas las muestras indicando que por el peso molecular corresponde a ADN genómico (figura 6) evidenciando que no existe degradación del ADN y además la cantidad es abundante para poder realizar un diagnóstico certero de la anaplasmosis.

*Figura 6*

Integridad del ADN genómico extraído de muestras de sangre bovinas.



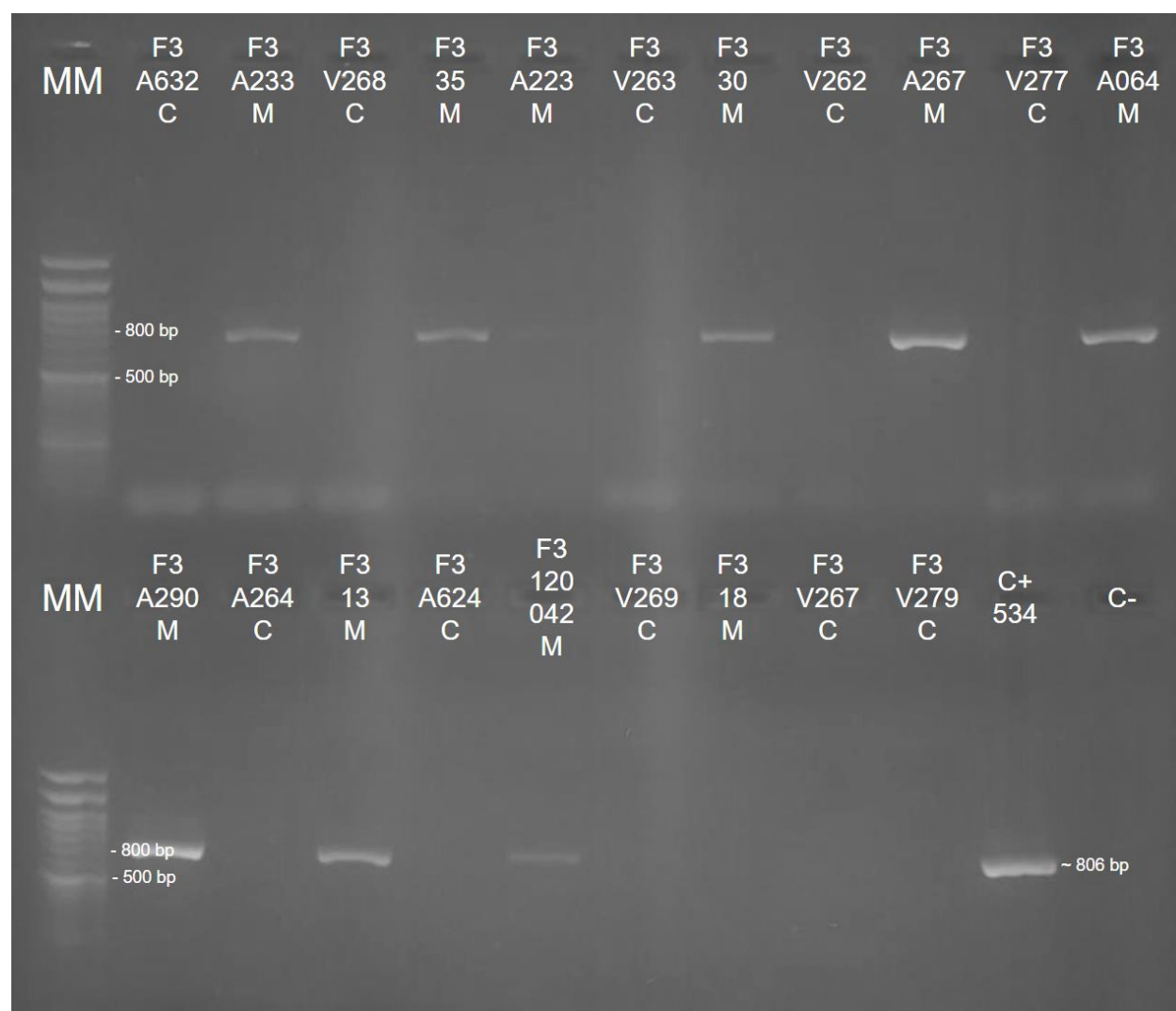
Nota: Electroforesis de algunas muestras de la extracción de ADN genómico de las muestras de sangre bovina en gel de agarosa al 0,8%.

### Diagnóstico de anaplasmosis

En base a la amplificación del gen que codifica para MSP5 y haberlo visualizado en el transiluminador bajo luz UV (figura 7) se establece la positividad de la enfermedad en los bovinos (tabla 7).

Figura 7

Electroforesis de los productos de PCR para el gen de la MSP5.



*Nota:* Electroforesis del producto de PCR en gel de agarosa 1,5%. Las muestras en los pocillos 4, 5, 6, 8, 10 y 12 de la primera fila, 2, 3, 5, 7, y 9 de la segunda fila resulta positivas para la anaplasmosis con un tamaño aproximado de ~806 bp, correspondiendo al fragmento positivo conocido (C+, muestra 534).

Tabla 7

Prevalencia de la anaplasmosis en las fincas muestreadas.

Finca	Numeración		Resultado		Prev.	Numeración		Edad		Resultado		Prev.
	Madre		PCR			Cría	(días)	PCR				
1	125		-			125	3	-				
1	181		-			181	4	-				
1	120		-			120	2	-				
1	203		+		33,33%	203	1	-				0%
1	210		-			210	3	-				
1	172		+			172	1	-				
2	984		+			984	0	-				
2	1206		+		100%	1206	0	-				0%
3	A287		+			A631	3	-				
3	A082		+			V274	4	-				
3	23		+			A622	10	-				
3	A319		+			A628	4	-				
3	V006		+		100%	A636	2	-				6,67%
3	188		+			A635	2	-				
3	70		+			A638	1	+				
3	A095		+			V278	3	-				

Finca	Numeración		Resultado Prev.	Numeración		Edad (días)	Resultado		Prev.
	Madre	PCR		Cría	PCR				
3	A322	+		A623	8	-			
3	A138	+		A626	4	-			
3	A019	+		A625	8	+			
3	A192	+		V276	3	-			
3	V055	+		A629	3	-			
3	V023	+		V260	17	-			
3	A233	+		A632	3	-			
3	35	+		V268	8	-			
3	A223	+		V263	10	-			
3	30	+		V262	16	-			
3	A267	+		V277	3	-			
3	A064	+		V279	1	-			
3	A290	+		A634	3	-			
3	13	+		A624	8	-			
3	120 042	+		V269	8	-			
3	18	+		V267	8	-			
3	A086	+		V273	4	-			
3	A276	+		A633	3	-			
3	A027	+		A627	4	-			
3	187	+		V275	3	-			
3	A167	+		V271	4	-			
3	A177	+		V270	4	-			
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>34</b>	<b>89,47%</b>	<b>38</b>	<b>-</b>	<b>2</b>	<b>5,26%</b>		



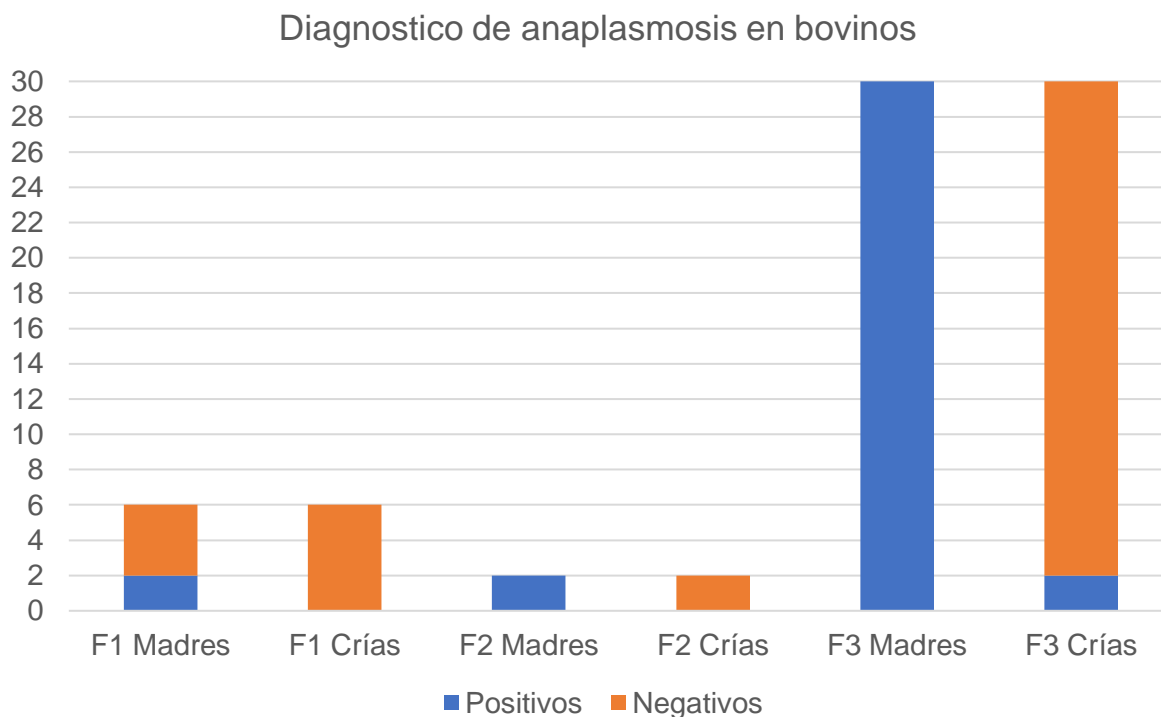
*Nota:* Prevalencia (Prev.) de anaplasmosis mostrando el resultado de la PCR y la edad de vida de los becerros

En este trabajo se evidenció una prevalencia total de anaplasmosis del muestreo de 89,47% en las madres (34/38), siendo que este valor se puede interpretar en función del lugar geográfico de muestreo, ya que en las Fincas 2 y 3 existe una prevalencia del 100%, mientras que en la Finca 1 solo de un 33% (2/6) lo que indica una infección un poco menor a la mitad de la muestra (figura 8). Esto es similar a lo expuesto por Sala (2013) que expone una prevalencia diferente en 3 lugares muestreados, por lo que la transmisión puede variar según el lugar geográfico.

También es importante señalar que en el diagnóstico de los becerros por PCR solo se obtuvo un 5,26% de prevalencia total en las 3 fincas, de igual manera, denotando que en las fincas 1 y 2 no existió ningún resultado positivo de los becerros (figura 7). Mientras que en la finca 3, se obtuvo una prevalencia específica de 6,67% lo que es un valor más cercano al 10% que reportaba Gonzalez et al (2013) en Brasil y Añez Rojas et al (2010) en Colombia.

Figura 8

Distribución de los casos positivos para anaplasmosis.



*Nota:* Número de casos positivos y negativos en función del lugar de muestreo separándolas para tener una visualización mejor de los casos de diagnóstico.

Cabe mencionar que los estudios mencionados toman las muestras de una sola ubicación geográfica, mientras que en este trabajo se realizaron 3 muestreos en ubicaciones distintas, lo que puede indicar que el tamaño de la muestra puede ser un factor para poder notar la transmisión de esta rickettsemia.

Según Medina-Naranjo (2017) la vía transmisión más probable de la anaplasmosis puede llegar a darse por el tábano y no por *R. microplus* ya que este vector tiene una vida infestando a un solo huésped lo que vuelve cuestionable su traspaso a otros animales. Mientras que la infección por miembros del género *Tabanus* es más probable tanto para becerros como para las madres.

Sin embargo, es crucial destacar que el becerro A625 de la finca 3 tiene solamente 8 días de edad. Además, resulta notable que el becerro A638, con tan solo 1 día de vida, ya ha arrojado un resultado positivo en la evaluación de la presencia por PCR/MSP5. Estos resultados demuestran la posibilidad de transmisión transplacentaria en la zona.

## Conclusiones y recomendaciones

Existió un 5,26% (2/38) de becerros neonatos infectados con tan solo 1 y 8 días de vida siendo indudablemente infectados por la vía transplacentaria.

Se logró obtener muestras sanguíneas de vacas gestantes, así como de vacas con pocos días de paridas para realizar su análisis de detección para la rickettsia *A. marginale*, con una prevalencia de 89,47% en las madres de las 3 fincas. Y del 100% tanto en la finca 2 (2 muestras) y finca 3 (30 muestras) lo que indica que la anaplasmosis bovina es endémica en estas zonas y estos animales al no exhibir síntomas, están persistentemente infectados y son reservorio de bacteria de donde pueden ser la fuente de infección de otros animales.

De igual manera, la muestra de los becerros neonatos se logró con un rango inferior a los 17 días de nacido teniendo un tamaño de muestra considerable con un total de 38 muestras lo que resulta bueno para el análisis ya que tomar una muestra de sangre de aquellos bovinos recién paridos es complicada.

Se logró obtener resultados positivos para la identificación de *A. marginale* por PCR/MSP5, 2 de 38 casos fueron positivos para la transmisión de esta enfermedad por una vía biológica proveniente del estado gestacional. Confirmando la transferencia de *A. marginale* de una vaca gestante a su feto.

Todos los animales muestreados no exhibían ninguna sintomatología, lo que indica el estadio crónico de la enfermedad con niveles de parasitemia bajos pero reinfectando al animal persistentemente. Se recomienda analizar los niveles de hematocrito de estos animales para evaluar si los niveles de eritrocitos son adecuados.

Para no tener la menor duda de la transmisión transplacentaria se puede buscar secuenciar el producto de la PCR para cotejar el aislado de las madres con los becerros. Así

como buscar la iniciativa de otras fincas para permitir la toma de muestras sanguíneas de becerros neonatos.

Las prevalencias de 100% en las 2 fincas muestreadas pueden ser un gran problema para la búsqueda de implementación de políticas de erradicación de la enfermedad tanto en los bovinos como de los posibles vectores como garrapatas e insectos hematófagos. Lo que indica la importancia de evaluar los animales por métodos moleculares y así determinar la prevalencia de más sectores. Recomendándose ampliar el tamaño del muestro y la robustez del mismo.

### Bibliografía

- Alleman, A. R., Kamper, S. M., Viseshakul, N., & Barbet, A. F. (Octubre de 1993). Analysis of the *Anaplasma marginale* genome by pulsed-field electrophoresis. *Journal of general microbiology*, 139(10), 2439-2444. doi:10.1099/00221287-139-10-2439
- Allred, D.R.; Mcguire, T.C.; Palmer, G.H.; Leib, S.R.; Harkins, T.M.; Mcelwain, T.F. Y Barbet, A.F. (1990). Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. USA. Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 3220-3224.
- Amaro Estrada, I., García Ortiz, M., Preciado de la Torre, J. F., Rojas Ramírez, E. E., Hernández Ortiz, R., Alpírez Mendoza, F., & Rodríguez Camarillo, S. D. (2020). Transmission of *Anaplasma marginale* by unfed *Rhipicephalus microplus* tick larvae under experimental conditions. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 11(1), 116-131. doi:<https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i1.5018>
- Añez-Rojas, N., Romero, O., Valbuena, H., Crisante, G., Rojas, A., & Bolívar, A. M. (Julio de 2010). DETECCIÓN DE TRANSMISIÓN TRANSPLACENTARIA DE *Anaplasma marginale* EN BOVINOS ASINTOMÁTICOS. *Revista Científica*, 20(4), 377-382. Obtenido de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592010000400007&lng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000400007&lng=es)
- Barbet, A.F.; Palmer, G.H.; Myler, P.J. Y Mcguire, T.C. (1987). Characterization of an Immunoprotective Protein Complex of *Anaplasma marginale* by Cloning and Expression of the Gene Coding for Polypeptide Am1O5L. *Infect. Immun.* 55: 2428-2435
- Bautista Garfias, C. R. (1996). La respuesta inmune celular en Anaplasmosis bovina. *Ciencia Veterinaria*, 7, 315-329. Recuperado el 14 de Febrero de 2024, de <https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol7/CVv7c11.pdf>

- Biberstein, E. L. (1999). *Anaplasmataceae Vet. Microbiol.* Blackwel Science Publ.
- Bowie, M. V., de la Fuente, J., Kocan, K. M., Blouin, E. F., & Barbet, A. F. (2002). Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. *Gene*, 282(1-2), 95–102. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(01\)00845-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(01)00845-9)
- Brayton, K. A., Kappmeyer, L. S., Herndon, D. R., Dark, M. J., Tibbals, D. L., Palmer, G. H., . . . Konwles Jr, D. P. (Enero de 2005). Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 844-849. doi:10.1073/pnas.0406656102.
- Conelius, B. P. (1957). Family IV. Anaplasmataceae Philip Fam. Nov. En R. S. Breed, E. G. Murray, & N. R. Smith, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Septima ed., págs. 980-984). Waverly Press. Obtenido de <https://www.biodiversitylibrary.org/item/41848#page/7/mode/1up>
- Corona González, 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. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v36n2/rsa01214.pdf>
- 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. Obtenido de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2011000100004&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2011000100004&lng=es&tlng=es)
- Corporación Financiera Nacional. (2021). *Cría y Reproducción de Ganado*. CFN. Recuperado el 15 de Febrero de 2024, de <https://www.cfn.fin.ec/wp-content/uploads/downloads/biblioteca/2021/fichas-sectoriales-4-trimestre/Ficha-Sectorial-Ganaderia.pdf>

Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., . . .

Rurangirwa, F. R. (1 de Noviembre de 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:<https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>

Gainer, J. H. (1961). Demonstration of *Anaplasma marginale* with the fluorescent dye, acridine orange; comparisons with the complement-fixation test and Wright stain. *American Journal of Veterinary Research*, 22, 882-886.

Gioia, G. V., Vinueza, R., Marsot, M., Devillers, E., Cruz, M., Petit, E., . . . Zanella, G. (2018). Bovine anaplasmosis and tick-borne pathogens in cattle of the Galapagos Islands. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(2), 1-10. doi:<http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12866>

Gonzalez Grau, H. E., da Cunha Filho, N. A., Geraldo Pappen, F., & da Rosa Farias, N. A. (Abril-Junio de 2013). Transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle chronically infected in southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22(2). doi:<https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000200038>

Kocan, K. M., De la Fuente, J., & Garcia-Garcia, J. C. (2004). *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host–pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*, 129, S285–S300. doi:10.1017/S0031182003004700



- Kocan, K. M., de la Fuente, J., Guglielmone, A. A., & Meléndez, R. D. (2003). Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(4), 698-712. doi:<https://doi.org/10.1128/cmr.16.4.698-712.2003>
- Kocan, K. M., Fuente, J. d., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., & Ewing, S. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, 167(2-4), 95-107. doi:10.1016/j.vetpar.2009.09.012
- Kuttler, K. L., Marble, D. W., & Matthews, N. J. (1962). Anaplasmosis complement-fixation response in calves from. *American journal of veterinary research*, 23, 1007-1010. Recuperado el 15 de Febrero de 2024
- Lozina, L., Torioni, E. S., Barbieri, F., Del Río, F., & Ríos, E. E. (2019). Evaluación de la actividad inmunogénica de una vacuna para profilaxis de la anaplasmosis bovina. *Revista Veterinaria*, 30(1), 3-6. doi:<https://doi.org/10.30972/vet.3013875>
- Mahmoud, H. Y. A. H., Ali, A. O., & Tanaka, T. (2023). Molecular detection and characterization of *Anaplasma marginale* infecting cattle, buffalo, and camel populations in southern Egypt. *Frontiers in veterinary science*, 10, 1169323. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1169323>
- Maldonado, J., Coronado, A., Kowalski, A., & Medina, J. (Mayo de 2012). Molecular evidence of transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in zebu neonatal calves of Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 30(1), 109-114. Recuperado el 15 de Febrero de 2024
- Medina-Naranjo, V. L., Reyna-Bello, A., Tavares-Marques, L. M., Campos, A. M., Ron Román, J. W., Moyano, C. J., . . . Chávez-Larrea, M. A. (2017). DIAGNÓSTICO DE LOS HEMOTRÓPICOS *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma* spp. Y *Babesia* spp. MEDIANTE LAS TÉCNICAS DE ELISA Y PCR EN TRES FINCAS GANADERAS DE

- LA PROVINCIA DE PASTAZA, ECUADOR. *Revista Científica*, 27(3), 162-171. Obtenido de [https://www.redalyc.org/journal/959/95952010005/html/#redalyc\\_95952010005\\_ref36](https://www.redalyc.org/journal/959/95952010005/html/#redalyc_95952010005_ref36)
- Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca. (27 de Diciembre de 2023). *Boletín de cifras del Sector Productivo*. Obtenido de <https://www.produccion.gob.ec/wp-content/uploads/2023/12/Boletin-Cifras-Productivas-DIC-2023.pdf>
- Molina Chávez, J. E., Vargas Hidalgo, J. S., & Viamontes Garcés, M. I. (2022). Estudio bibliográfico sobre la prevalencia de Anaplasmosis bovina en la región. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 6(1). Recuperado el 13 de Febrero de 2024
- Muñoz Guanizo, T. R., Ayora Fenández, P., Luzuriaga Neira, A., Corona González, B., & Martínez Marrero, S. (2017). Prevalencia de Anaplasma marginale en bovinos de la provincia Zamora Chinchipe, Ecuador. *Revista de Salud Animal*, 39(1), 68-74. Recuperado el 14 de Febrero de 2024, de <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v39n1/rsa09117.pdf>
- Norton, J. H., Parker, R. J., & Fourbes-Faulkner, J. C. (1983). Neonatal anaplasmosis in a calf. *Australian Veterinary Journal*, 60(1), 348-348. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1983.tb02844.x>
- Oberle, S. M., Palmer, G. H., & Barbet, A. F. (1993). Expression and immune recognition of the conserved MSP4 outer membrane protein of Anaplasma marginale. *Infection and immunity*, 61(12), 5245–5251. <https://doi.org/10.1128/iai.61.12.5245-5251.1993>
- OIE. (2015). Anaplasmosis Bovina. En OIE, *Manual Terrestre* (págs. 1-16). Obtenido de [https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/3.04.01\\_Anaplasmosis\\_bovina.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.01_Anaplasmosis_bovina.pdf)

Palmer, G. H., Barbet, A. F., Musoke, A. J., Katende, J. M., Rurangirwa, F., Shkap, V., Pipano, E., Davis, W. C., & McGuire, T. C. (1988). Recognition of conserved surface protein epitopes on *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale* isolates from Israel, Kenya and the United States. *International journal for parasitology*, 18(1), 33–38.

[https://doi.org/10.1016/0020-7519\(88\)90033-1](https://doi.org/10.1016/0020-7519(88)90033-1)

Palmer, G. H., Rurangirwa, F. R., Kocan, K. M., & Brown, W. C. (Julio de 1999). Molecular Basis for Vaccine Development against the Ehrlichial Pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitology today*, 15(7), 281-286. doi:[https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(99\)01469-6](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(99)01469-6)

Passos, L. F., & Lima, J. D. (1984). Diagnóstico de anaplasmosse bovina congênita em Minas Gerais. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 36(6), 743-744.

Piercy, P. L. (1956). TRANSMISSION OF ANAPLASMOSIS. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 64(2), 40-48. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1956.tb36605.x>

Radostits, O. M., Gay, C. C., hinchcliff, K. W., & Constable, P. D. (2007). *Veterinary Medicine A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. Saunders Ltd.

Rey, C., Aso, P. A., & Coronado, A. (2000). Homologous and Heterologous Immune Reactions between Venezuelan Geographic Isolates of *Anaplasma marginale*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916(1), 658–661. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05355.x>

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* (pág. 703). Venezuela: Astro Data S.A.

Reyna-Bello, A., Cloeckeaert, A., Vizcaíno, N., Gonzatti, M. I., Aso, P. M., Dubray, G., & Zygmunt, M. S. (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*, 5(2), 259-262.  
doi:<https://doi.org/10.1128%2Fcdli.5.2.259-262.1998>
- Richey, E. J. (1991). Bovine Anaplasmosis. *AMERICAN ASSOCIATION OF BOVINE PRACTITIONERS*, 3-11. doi:<https://doi.org/10.21423/aabppro19916695>
- Rodríguez Camarillo, S. D., García Ortiz, M. A., Aboytes Torres, R., Cantó Alarcón, G. J., & Barigye, R. (2003-2004). Inmunología e inmunoprofilaxis de la anaplasmosis bovina. *Ciencia veterinaria*, 9, 124-164. Recuperado el 15 de Febrero de 2024, de <https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol9/CVv9c5.pdf>
- Rodríguez-Camarillo, S. D., Garcí-Ortiz, M. A., Cantó-Alarcón, G. J., Henández-Salgado, G., Santos-Cerda, N., & Abortes-Torres, R. (1999). Ensayo de un inmunógeno experimental inactivado. *Técnica Pecuaria en México*, 37, 1-12.
- Sala, J. M. (2013). *TRANSMISIÓN TRANSPLACENTARIA DE ANAPLASMA MARGINALE EN BOVINOS NATIVOS DEL NORESTE ARGENTINO*. Tesis de maestría, Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Santa Fe. Obtenido de <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/469/tesis.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Silva, J. B., Santana Castro, N. G., & Adivaldo, F. H. (2014). Longitudinal study of risk factors for anaplasmosis and transplacental transmission in herd. *Semina: Ciências Agrárias*, 35(4), 2491-2500. Recuperado el 14 de Febrero de 2024, de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744143023>
- Smith, T., & Kilborne, F. (1893). *Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever*. Washington: Medicine in the Americas. Recuperado el 2 de Febrero de 2014, de <http://resource.nlm.nih.gov/62350480R>

- Sonia Costa, C. L., Sampaio de Magalhaes, V. C., Volkart de Oliveira, U., Santos Carvalho, F., Pereira de Almeida, C., Zacarias Machado, R., & Dias Munhoz, A. (Marzo de 2016). Transplacental transmission of bovine tick-borne pathogens: Frequency, co-infections and fatal neonatal anaplasmosis in a region of enzootic stability in the northeast of Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7(2), 270-275.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.11.001>
- Tana Hernández, L., Navarrete Arroyo, K., Ron Román, J., Reyna Bello, A., & Chávez Larrea, M. A. (2017). PCR-diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle populations of Ecuador and its molecular identification through sequencing of ribosomal 16S fragments. *BMC Veterinary Research*, 13(392). doi:10.1186/s12917-017-1311-1
- Tapia Granados, J. A. (1995). Medidas de prevalencia y relación incidencia-prevalencia. *Medicina clínica*, 105(6), 216-218.
- Theiler, A. (1910). Gall-sickness of South Africa. (Anaplasmosis of Cattle.). *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 23, 95-115.  
doi:[https://doi.org/10.1016/S0368-1742\(10\)80028-1](https://doi.org/10.1016/S0368-1742(10)80028-1)
- Torioni de Echaide, S., Knowles, D. P., McGuire, T. C., Palmer, G. H., Suarez, C. E., & McElwain, T. F. (Marzo de 1998). Detection of Cattle Naturally Infected with *Anaplasma marginale* in a Region of Endemicity by Nested PCR and a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 777-782. doi:10.1128/jcm.36.3.777-782.1998
- Vidotto, O., & Marangoni Marana, E. R. (2001). DIAGNÓSTICO EM ANAPLASMOSE BOVINA. *Ciência Rural*, 31(2), 361 - 368. doi:<https://doi.org/10.1590/S0103-84782001000200028>
- Visser, E. S., McGuire, T. C., Palmer, G. H., Davis, W. C., Shkap, V., Pipano, E., & Knowles, D. P., Jr (1992). The *Anaplasma marginale* msp5 gene encodes a 19-kilodalton protein

conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infection and immunity*, 60(12), 5139–5144. <https://doi.org/10.1128/iai.60.12.5139-5144.1992>

Zaugg, J. L. (1985). Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation. *American journal of veterinary research*, 46(3), 570-572. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3994125/>

Zaugg, J. L. (1 de Abril de 1990). Seasonality of natural transmission of bovine anaplasmosis under desert mountain range conditions. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 196(7), 1106-1109. Recuperado el 4 de Febrero de 2024, de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2329080/>

Zhang, L., Wang, Y., Cai, D., He, G., Cheng, Z., Liu, J., Meng, K., Yang, D., & Wang, S. (2013). Detection of *Anaplasma marginale* in *Hyalomma asiaticum* ticks by PCR assay. *Parasitology research*, 112(7), 2697–2702. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3437-9>