

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS

MENCIÓN: "SALUD ANIMAL"

**TRANSMISIÓN TRANSPLACENTARIA DE *ANAPLASMA*
MARGINALE EN BOVINOS NATIVOS DEL NORESTE
ARGENTINO**

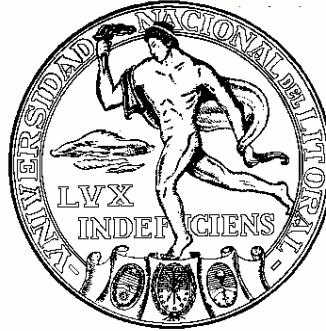
Juan Manuel Sala

Para optar por el grado de:

***MAGISTER SCIENTAE* en CIENCIAS VETERINARIAS**

**Esperanza, Santa Fe
Agosto de 2013**

República Argentina



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS

MENCIÓN: "SALUD ANIMAL"

**TRANSMISIÓN TRANSPLACENTARIA DE *ANAPLASMA*
MARGINALE EN BOVINOS NATIVOS DEL NORESTE
ARGENTINO**

Juan Manuel Sala

Para optar por el grado de:

***MAGISTER SCIENTAE* en CIENCIAS VETERINARIAS**

Director: MV, MPH Víctor R. Vanzini

Vice director: MV, MSc Susana Torioni de Echaide

Codirector: MV, MPVM, PhD Héctor D. Tarabla

Jurado: MV, PhD Atilio Mangold

MV, MSc Onelia Lavaroni

MV, MSc Norma Russi

DEDICATORIA

A mis abuelas, Pepa y Juana.

A mi tía Pocha.

A mi esposa e hijos.

A mi padre.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores y codirector de tesis, los Dres. Víctor Vanzini, Susana Torioni de Echaide y Héctor Tarabla por su paciencia, permanente apoyo y orientación a lo largo de todo el trabajo.

A todos los integrantes del grupo de sanidad animal de la EEA INTA Mercedes, en especial a mis directoras de beca: Dra. María Graciela Draghi y Dra. Patricia Zimmer; y los ayudantes Walter Bevans y Gustavo Sosa por su incondicional apoyo en lo laboral.

A todos los integrantes del grupo de Inmunología de la EEA INTA Rafaela por su constante apoyo, en especial a la MV Nerina Aguirre y Paola Amherdt por su ayuda en todo el procesamiento de las muestras.

Al grupo de hemoparásitos del Instituto de Biotecnología de INTA Castelar, en especial a la Dra. Marisa Farber por todo el apoyo brindado en el procesamiento de las muestras.

Al grupo de la AER INTA Santo Tomé, por su apoyo en los muestreos a lo largo de todo el trabajo.

ABREVIATURAS

AcM	anticuerpo monoclonal
C+	Control positivo
C-	Control negativo
CC	control de conjugado
C-ELISA	enzimoinmunoensayo de competición
CMH	complejo mayor de histocompatibilidad
CT	prueba de aglutinación en placa
DO	densidad óptica
DOT-ELISA	enzimoinmunoensayo puntual
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FNT	Factor de necrosis tumoral
FC	fijación del complemento
I-ELISA	enzimoinmunoensayo indirecto
IFI	inmunofluorescencia indirecta
INF- γ	interferón gama
IL	interleucina
LA	acción prolongada
LPS	lipopolisacáridos
MSP	proteína principal de superficie
MW	Control de Peso Molecular
n-PCR	PCR anidada
OIE	Organización Mundial de la Salud Animal
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RLBH	hibridización reversa en línea
RT-PCR	PCR en tiempo real
sn-RT-PCR	RT-PCR semianidada
Th CD4 ⁺	células T cooperadoras CD4 ⁺
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
%I	porcentaje de inhibición

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Transmisión de anaplasmosis	4
1.1.1 Garrapatas	4
1.1.2 Insectos hematófagos	5
1.1.3 Fomites	5
1.1.4 Transplacentaria	6
1.2 Objetivos	6
1.2.1 General	6
1.2.2 Específicos	7
2. Revisión bibliográfica	8
2.1 Historia	8
2.1.1 Taxonomía	8
2.2 Morfología	11
2.3 Ciclo de vida	12
2.4 Patogenia	15
2.5 Inmunidad y resistencia	18
2.5.1 Resistencia natural	18
2.5.2 Mecanismos de inmunidad adquirida	19
2.6 Fuentes de infección y reservorios	21
2.7 Transmisión	25
2.7.1 Intrauterina	25
2.7.2 Garrapatas	27

2.7.3	Insectos hematófagos	32
2.7.4	Iatrogénica	34
2.8	Biología molecular	35
2.8.1	Proteínas principales de superficie (MSP)	35
2.8.1.1	Proteína principal de superficie 1 (MSP1)	35
2.8.1.2	Proteína principal de superficie 2 (MSP2)	36
2.8.1.3	Proteína principal de superficie 3 (MSP3)	36
2.8.1.4	Proteína principal de superficie 4 (MSP4)	36
2.8.1.5	Proteína principal de superficie 5 (MSP5)	37
2.9	Diagnóstico	37
2.9.1	Diagnóstico directo	38
2.9.2	Dagnóstico indirecto	40
2.10	Control y prevención	41
2.10.1	Control de artrópodos	42
2.10.2	Quimioprofilaxis	42
2.10.3	Vacunación	43
2.10.3.1	Vacunas inactivadas	43
2.10.3.2	Vacunas vivas	45
2.11	Recomendaciones la para importación de ganado bovino a países libres	46
2.12	Tratamiento	46
3.	Materiales y métodos	50
3.1	Ecorregiones de la provincia de Corrientes	50
3.1.1	Ecorregión del Espinal	50

3.1.2	Ecorregión de Campos y Malezales	50
3.1.3	Muestras	51
3.1.4	Edad de gestación del feto	51
3.1.5	Estudio epidemiológico	51
3.2	Ecorregión del Chaco húmedo	51
3.2.1	Muestras	52
3.3	Muestras de sangre	53
3.3.1	Sangre con anticoagulante	54
3.3.2	Sangre sin anticoagulante	54
3.4	Terneros esplenectomizados	54
3.5	Reproducción de anaplasmosis	55
3.5.1	Subinoculación con sangre de fetos	55
3.5.2	Subinoculación con sangre de terneros	55
3.5.3	Subinoculación experimental de <i>Anaplasma marginale</i> en terneros	56
3.6	Técnicas serológicas para la detección de anticuerpos de <i>Anaplasma</i> spp.	56
3.6.1	Aglutinación en placa o tarjeta (<i>Card Test-CT</i>)	56
3.6.2	Enzimoimmunoensayo de competición (C-ELISA)	57
3.7	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	58
3.7.1	Extracción de ADN mediante el método de fenol-cloroformo	58
3.7.2	PCR <i>msp5</i>	59
3.7.3	PCR en tiempo real (RT-PCR)	60
3.7.4	Tipificación molecular de <i>A. marginale</i>	61

3.7.5	Amplificación del gen <i>msp1α</i>	62
3.7.6	Clonado	63
3.7.7	Secuenciación de <i>msp1α</i>	63
3.8	Análisis estadístico	64
4.	Resultados	65
4.1	Detección de la enfermedad mediante técnicas serológicas	65
4.1.1	Ecorregión del Espinal	65
4.1.2	Ecorregión de Campos y Malezales	65
4.1.3	Detección de anticuerpos en feto	66
4.1.4	Brote de anaplasmosis en vacas gestantes	66
4.1.5	Concordancia entre las técnicas serológicas	67
4.1.6	Análisis de riesgo	68
4.2	Detección de <i>A. marginale</i> mediante técnicas moleculares	70
4.2.1	RT-PCR semianidada <i>msp5</i> (sn-RT-PCR <i>msp5</i>)	70
4.2.1.1	Muestras obtenidas en frigorífico	70
4.2.1.2	Brote de anaplasmosis en vacas gestantes	74
4.2.1.3	Evaluación de PCR en terneros infectados experimentalmente con <i>A. marginale</i>	77
4.2.2	PCR <i>msp1</i>	78
4.2.2.1	Tipificación molecular	78
4.2.2.1.1	Muestras obtenidas en frigorífico	78
4.2.2.1.2	Brote de anaplasmosis en vacas gestantes	79

4.2.2.1.3	Determinación de variantes genotípicas de <i>A. marginale</i> en vacas gestantes involucradas en el brote de anaplasmosis	81
5.	Discusión	83
6.	Conclusiones	90
7.	Bibliografía	91

RESUMEN

Se estudió el rol epidemiológico de la transmisión transplacentaria de *Anaplasma marginale* en bovinos. Se analizaron muestras de sangre y suero de 731 vacas (167 preñadas), de diferentes ecorregiones, Espinal (n= 347), Campos y Malezales (n= 384) y 32 del Chaco húmedo, sobrevivientes de un brote de anaplasmosis mientras gestaban y de sus terneros. La proporción de positivos (+) se determinó por las pruebas serológicas Card test (CT) y C-ELISA. Se identificó *Anaplasma* spp. por PCR-*msp5* y se genotipificó *A. marginale* mediante PCR-*msp1α*.

Vacas de la región Espinal fueron 30% CT+ y el 34% C-ELISA+ significativamente diferente ($p < 0.0001$) de Campos y Malezales con 86% CT+ y 73% C-ELISA+ con un riesgo de infección 5,2 veces mayor. PCR-*msp5*+ se encontró en un 79,4% de las hembras gestantes y en un 5,3% de los fetos, dos de ellos (1,5%) portaba *A. marginale* (PCR-*msp1α*).

Vacas de Chaco húmedo fueron 63% CT+ y 81% C-ELISA+, el 100% de las vacas y un 25% de los terneros fueron PCR-*msp5*+, un 15,6% de ellos portaba *A. marginale* (PCR-*msp1α*). Se encontraron nueve genotipos, y un ternero llevaba el mismo que su madre. No se logró reproducir la enfermedad. De ocurrir, la transmisión transplacentaria de *A. marginale* sería de escasa relevancia epidemiológica.

Palabras clave: *Anaplasma marginale*, Transmisión transplacentaria, ELISA, PCR, Card Test, Genotipificación.

SUMMARY

The epidemiological role of trans-placental transmission of *A. marginale* in cattle was studied. Blood and serum samples were taken from 731 cows (167 pregnant). Cows came from different ecological regions (Espinal n= 347, Campos and Malezales n= 384 Humid Chaco n= 32). All cows survived outbreaks of anaplasmosis while they were pregnant. Two serological tests were performed: Card test (CT) and C-ELISA. *Anaplasma* spp. was identified by PCR-*msp5* and *A. marginale* was genotyped by PCR-*msp1a*.

Prevalence of CT and C-ELISA positive cows was higher on Campos and Malezales (86 and 73% respectively) than on Espinal (30 and 34% respectively) (OR= 5,2 p<0.0001).

One and a half percent of fetus carried *A. marginale*. PCR-*msp5*+ was detected on 132/167 (79,4%) pregnant cows and 7/132 (5,3%) fetus. Prevalence of CT and C-ELISA on cows from Humid Chaco was 63% and 81%, respectively. All these cows and 8 calves (25%) were PCR-*msp5*+, while 15,6% carried *A. marginale*.

Nine *A. marginale* genotypes were found. One calf carried the same genotype that its mother. It was not possible to reproduce the disease. Trans-placental transmission of *A. marginale*, may be sporadic and of little epidemiological significance.

Keywords: *Anaplasma marginale*, trans-placental transmission, ELISA, PCR, Test Card, Genotyping.

1. INTRODUCCIÓN

La anaplasmosis de los bovinos es una enfermedad infecciosa de curso agudo a crónico producida por un organismo perteneciente al orden *Rickettsiales*, familia *Anaplasmataceae*, género *Anaplasma* (Dumler *et al.*, 2001).

El agente etiológico es *Anaplasma marginale* que causa enfermedad clínica en el ganado bovino caracterizándose por producir anemia, ictericia, fiebre, anorexia, aborto, disminución de la fertilidad, debilidad general y hasta muerte en caso agudos (Radostits *et al.*, 2002).

A. marginale infecta eritrocitos maduros a través de un proceso endocítico y se reproducen por fisión binaria dando lugar a un corpúsculo de inclusión formado por 2-8 corpúsculos iniciales que se liberan mediante exocitosis e infectan a otros eritrocitos duplicándose cada 24-48 hs (Radostits *et al.*, 2002). Si bien puede multiplicarse en otros rumiantes como búfalos (*Bubalus bubalis*) y ovinos, la infección es subclínica y su importancia como reservorio de la enfermedad no parece ser significativa (Kuttler, 1984a).

El período de incubación de la anaplasmosis oscila entre 2-6 semanas y la duración del mismo está influida por la dosis de inoculación inicial que recibe el animal (Gale *et al.*, 1996). Los eritrocitos parasitados son eliminados por el sistema reticuloendotelial dando como resultado el desarrollo de una leve o severa anemia e ictericia sin hemoglobinuria, con la consiguiente aparición de fiebre (Radostits *et al.*, 2002; Kocan *et al.*, 2003; Baumgartner, 2005).

Hay una fuerte correlación entre la edad del vacuno y la gravedad de la enfermedad. Los animales jóvenes, menores de un año de edad, son más resistentes a la enfermedad clínica que los adultos, que generalmente presentan síntomas más severos

(Jubb *et al.*, 1991; Vanzini y Ramírez, 1994; Radostits *et al.*, 2002; Kahn, 2007). Esto se debe a que los anticuerpos ingeridos con el calostro protegen en gran medida a los terneros de los efectos clínicos de la enfermedad (Potgieter y Stoltsz, 2004).

La enfermedad es endémica en áreas tropicales y subtropicales de todo el mundo, incluyendo los cinco continentes (Radostits *et al.*, 2002) y la presencia de distintas cepas de *A. marginale* se han demostrado en varios países como EE.UU, Canadá, México, Brasil, Puerto Rico, Cuba, Argentina, España, Italia, Israel, China, Australia y Sudáfrica (De la Fuente *et al.*, 2007), extendiéndose aproximadamente entre los paralelos 40° N a 32° S (Kahn, 2007). Aunque ocurren brotes esporádicos en zonas de clima templado al norte y al sur por encima de estas latitudes, respectivamente (Radostits *et al.*, 2002).

La prevalencia de la infección en el ganado vacuno de zonas endémicas por lo general es muy elevada, con tasas de seropositividad superiores al 60% y a menudo del 90%. La seropositividad es menor en áreas de transición entre regiones endémicas y no endémicas, con zonas de alta prevalencia en rodeos que generan una fuente constante de infección y zonas de baja prevalencia en donde la anaplasmosis se presenta a menudo como brotes clínicos en rodeos indemnes (Hungerford y Smith, 1997).

La gravedad de la enfermedad entre otros factores, probablemente sea dependiente de la cepa actuante y no se considera de igual importancia en los distintos países. En Norteamérica, algunos países de Sudamérica y África, la distribución es amplia y las cepas actuantes son muy virulentas. En Australia, en cambio, la anaplasmosis es una enfermedad relativamente leve (De Vos, 1992), representando desde 1990 a 2002 un poco más del 13% de casos confirmados y rara vez causa una mortalidad significativa (Bock *et al.*, 2003). Aislamientos de diferentes regiones

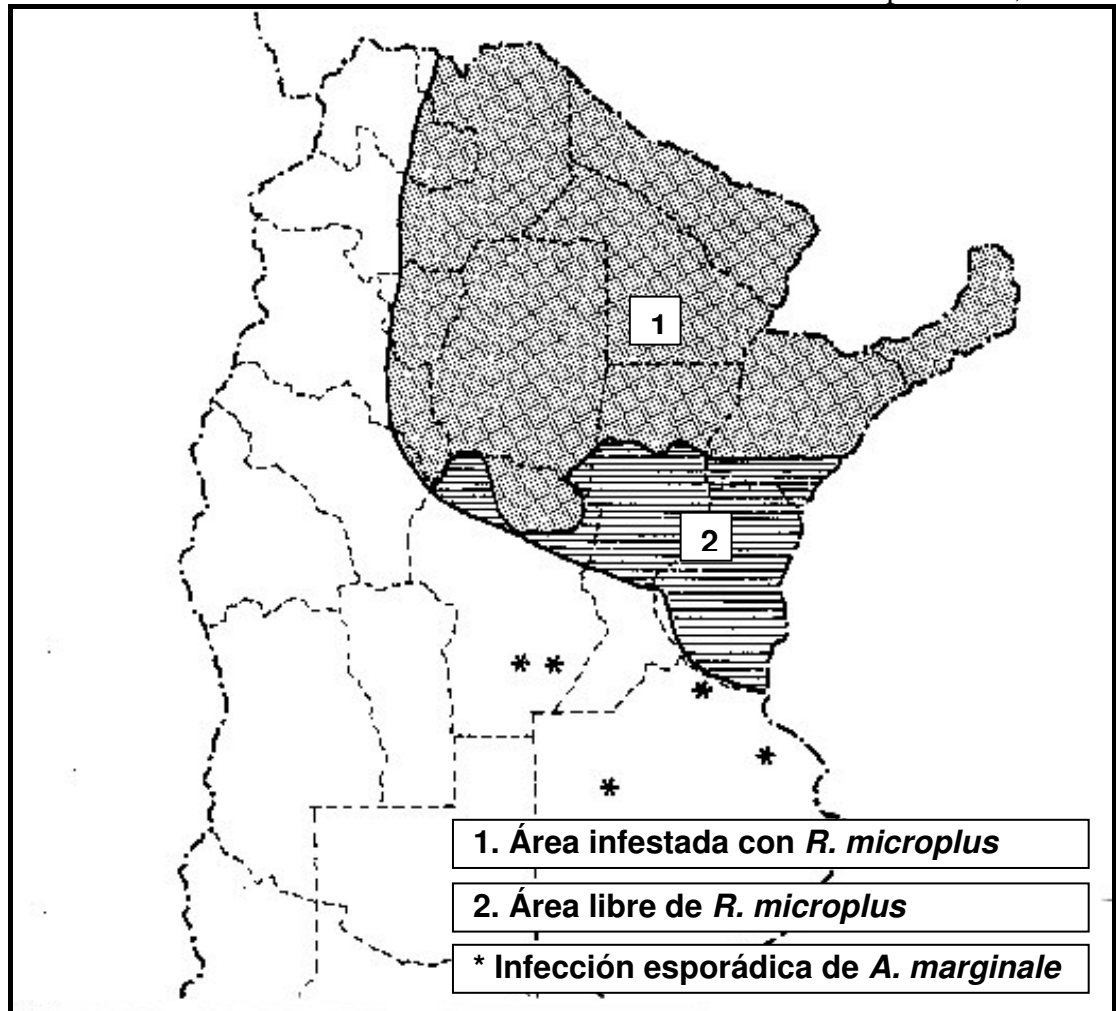
geográficas de Australia confirman una naturaleza conservada en el gen *msp1 α* , por el cual se pueden diferenciar las distintas cepas de *A. marginale*, lo que sugiere una introducción limitada de *A. marginale* en Australia (Lew *et al.*, 2002). De la Fuente *et al.* (2007), también reportan una sola cepa en aislamientos australianos, la cual coincide con la encontrada por Lew *et al.*, (2002). Esto hace que las vacunas australianas basadas en *Anaplasma centrale*, proporcionen una inmunidad adecuada para prevenir la enfermedad en la mayoría de los casos en este país, pero a menudo son insuficientes contra cepas antigénicamente diferentes y más virulentas de otros países (Bock y De Vos, 2001).

La distribución de la anaplasmosis en nuestro país es de alrededor de 1.000.000 de km² (Figura 1) (Vanzini y Ramírez, 1994; Späth *et al.*, 1994) en donde se encuentran actualmente 19.140.739 bovinos equivalentes a un 37,8% del stock nacional (Rearte, 2010), pero podría modificarse debido al calentamiento del planeta que influye sobre el movimiento de los vectores involucrados en la transmisión de diferentes enfermedades (Jonsson y Reid, 2000), aunque esto no sólo depende de los vectores propiamente dichos, sino también de la existencia de hospedadores susceptibles, portadores y condiciones ecológicas favorables (Kuttler *et al.*, 1970; Palmer y McElwain, 1995).

Las pérdidas económicas debidas a la anaplasmosis se miden con varios parámetros dentro de los cuales se incluyen: pérdida de peso, reducción de la producción de leche, aborto, costo de los tratamientos y mortalidad (Kocan *et al.*, 2003).

Figura 1: Distribución geográfica de *A. marginale* en la Argentina.

Fuente: Späth *et al.*, 1994.



1.1 Transmisión de la anaplasmosis

1.1.1 Garrapatas: Distintas especies de garrapatas pueden actuar como transmisoras de la enfermedad (*Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Hyalomma*, *Ornithodoros*) de forma mecánica o como vectores biológicos como en el caso de *Dermacentor* spp. donde la transmisión puede ocurrir intraestadio o transestadio y *A. marginale* cumple parte de su ciclo, previo a la inoculación en animales susceptibles (Kahn, 2007).

El desarrollo de *A. marginale* en las garrapatas es complejo y está coordinado con los ciclos de alimentación de las mismas. Los eritrocitos infectados son ingeridos

por la garrapata y los corpúsculos de *Anaplasma* colonizan las células del intestino donde se multiplican e infectan otros tejidos, incluyendo las glándulas salivales desde donde las rickettsias se transmiten, vía saliva, a los vertebrados susceptibles a la enfermedad durante la alimentación (Kocan *et al.*, 2003).

1.1.2 Insectos hematófagos: La transmisión mecánica por algunas especies de *Tabanus* es posible mediante la transferencia de eritrocitos infectados a través del aparato bucal entre un animal portador y uno susceptible, la misma debe ocurrir en un lapso no mayor de dos horas (Hawkins *et al.*, 1982) siendo imprescindible que la sangre se mantenga fresca (Aubry y Geale, 2011). *Stomoxys calcitrans* también puede transmitir *A. marginale* (Potgieter *et al.*, 1981).

No hay reportes de manifestaciones de enfermedades transmitidas por ninguna especie de *Haematobia*, sin embargo, podría ser un potencial vector mecánico de *A. marginale* (Rodríguez Vivas y Domínguez Alpizar, 1998).

1.1.3 Fómites: La anaplasmosis se transfiere con relativa facilidad mediante objetos inanimados que puedan traspasar eritrocitos infectados entre un animal enfermo y otro susceptible cuando no se toman las medidas de higiene adecuadas. Al igual de lo que ocurre en la transmisión por insectos hematófagos, la sangre no debe secarse. Las prácticas veterinarias más comunes incluyen transfusiones de sangre, descorne, castración, señalado, tatuaje y la aguja hipodérmica de jeringas automáticas utilizadas para la administración masiva de vacunas, antiparasitarios o medicamentos (Kessler, 2001; Aubry y Geale, 2011).

1.1.4 Transplacentaria.

Este tipo de transmisión ha sido reportada en varias oportunidades en casos experimentales pero con poca frecuencia en casos naturales. La transmisión ocurre si al momento de la infección, la madre está cursando el segundo o tercer tercio de la gestación provocando el nacimiento de terneros con debilidad general, anemia e ictericia, ó muerte a los pocos días de nacer (Calderón Gonçalves *et al.*, 2005).

En Argentina se han hecho investigaciones de transmisión por garrapatas (Ríos *et al.*, 1990; Aguirre *et al.*, 1994; Gaido *et al.*, 1995) pero no existen trabajos acerca de la transmisión vertical bajo condiciones naturales. Su implicancia en la epidemiología de la enfermedad todavía no se conoce con precisión y no existe información local acerca de la relevancia de este tipo de transmisión.

Hipótesis:

La transmisión transplacentaria de *A. marginale* en forma natural no tiene un rol importante en la epidemiología de la anaplasmosis.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general:

Evaluación del rol epidemiológico de la transmisión transplacentaria de *A. marginale* en bovinos de distintas ecorregiones del NEA, donde la anaplasmosis es endémica.

1.2.2 Objetivos específicos:

1- Evaluación de la ocurrencia de transmisión transplacentaria en hembras bovinas de dos ecorregiones de la provincia de Corrientes.

2- Evaluación de la ocurrencia de transmisión transplacentaria en un rodeo de cría con un brote reciente de anaplasmosis en la provincia del Chaco.

3- Caracterización genotípica de *A. marginale* en vacas preñadas afectadas por el brote de anaplasmosis y sus respectivos terneros.

2. REVISION BIBLIOGRÁFICA

2.1 Historia

Smith y Kilborne (1893) estudiando la fiebre de Texas (babesiosis) descubrieron en los animales infectados cuerpos cocoides de 0,2 a 0,5 μ de diámetro situados en el margen de los glóbulos rojos e interpretaron que estas formas distintas eran diferentes etapas del ciclo de vida de la babesiosis.

En Sudáfrica Theiler (1910), describió un pequeño agente en los eritrocitos de bovinos afectados de anemia aguda y lo diferenció de la entidad patológica fiebre de Texas. De acuerdo a sus características tintoriales, describió un microorganismo carente de citoplasma y ubicado en el margen del eritrocito por lo que propuso el término de *A. marginale*. Un año después describió una nueva especie de *Anaplasma*, a la cual por su ubicación dentro del eritrocito, preferentemente central, denominó *A. centrale* (Theiler, 1911).

2.1.1 Taxonomía

La taxonomía del agente infeccioso ha ido cambiando a través del tiempo con el conocimiento del microorganismo y los avances tecnológicos.

Theiler (1910), luego de su descubrimiento propuso a *A. marginale* como un parásito protozoario endoglobular verdadero. Este punto de vista que generalmente fue aceptado en el pasado con algunas objeciones, se basaba principalmente en que la enfermedad presentaba signos clínicos similares a la babesiosis.

Philip (1957) observó que el microorganismo presentaba una estructura interna semejante a la de las rickettsias por lo que lo incluyó dentro del orden *Rickettsiales*, y creó la familia *Anaplasmataceae* y el género *Anaplasma*.

Walker y Dumler (1996) mediante un análisis filogenético, utilizando la secuencia de la región 16S del ARNr, cambiaron nuevamente su clasificación y situaron a *A. marginale* dentro del genogrupo II de las *Ehrlichias*.

Actualmente basándose en análisis genéticos se propuso que se incluyeran en la familia *Anaplasmataceae* especies del género *Wolbachia*, *Ehrlichia* y *Neorickettsia*, conservando los géneros *Anaplasma* y *Aegyptianella* dentro de la familia. También se incluyeron en el género *Anaplasma* a *Ehrlichia phagocytophila*, *E. equis*, *E. bovis*, *E. platys* y *E. granulocitica* (Dumler *et al.*, 2001). La clasificación actual del orden *Rickettsiales* con sus respectivas familias y géneros se detalla en la tabla 1.

Tabla 1: Clasificación del Orden Rickettsiales (Kocan *et al.*, 2004).

1. Orden Rickettsiales

1.1 Familia Rickettsiaceae: bacterias intracelulares obligadas que crecen libremente en el citoplasma de las células hospedadoras eucarióticas

1.1.1 Género *Rickettsia*

1.1.2 Género *Orientia*

1.2 Familia Anaplasmataceae: bacterias intracelulares obligadas que se replican en vacuolas derivadas de membrana, en el citoplasma de las células hospedadoras eucarióticas

1.2.1 Género *Anaplasma*

Anaplasma marginale (tipo de especies)

Anaplasma centrale

Anaplasma ovis

Anaplasma bovis (antes *Ehrlichia bovis*)

Anaplasma phagocytophilum (antes *Ehrlichia phagocytophilum*, *E. equi*, agente de la Ehrlichiosis Granulocítica Humana)

Anaplasma platys (antes *Ehrlichia platys*)

Aegyptianella (Género *Incertae sedis* debido a la falta de información de la secuencia)

1.2.2 Género *Ehrlichia*

Ehrlichia chaffeensis

Ehrlichia ruminantium (antes *Cowdria ruminantium*)

Ehrlichia ewingii

Ehrlichia ovis

Ehrlichia canis

Ehrlichia muris

1.2.3 Género *Neorickettsia*

Neorickettsia helminthoeca

Neorickettsia risticii (antes *Ehrlichia risticii*)

Neorickettsia sennetsu (antes *Ehrlichia sennetsu*)

1.2.4 Género *Wolbachia*

Wolbachia pipientis

2.2 Morfología

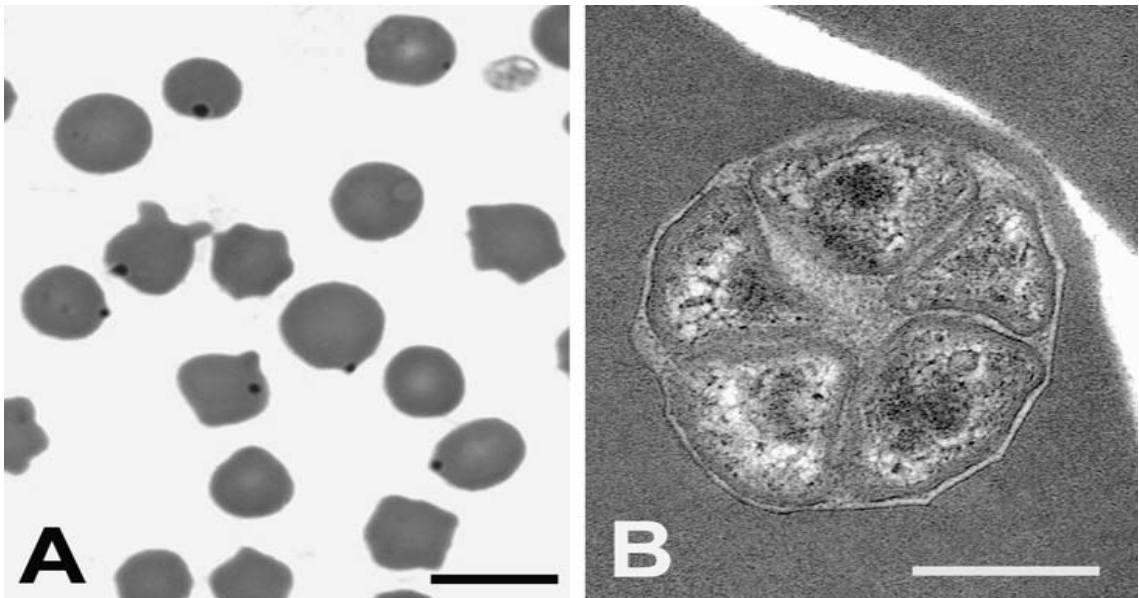
Los anaplasmas, al igual que todas las *Rickettsias*, se caracterizan por no tener su cromatina organizada en un núcleo con membrana limitante y por carecer de retículo endoplásmico (Rodríguez *et al.*, 2004).

En el ganado bovino, el único sitio de desarrollo conocido de *A. marginale* es el eritrocito (Kocan *et al.*, 2000). Con tinción de Giemsa y observado al microscopio óptico este organismo aparece dentro de los eritrocitos como cuerpos redondeados de 0,2 a 1,0 μ de diámetro que no muestran diferenciación entre componentes nucleares y citoplasmáticos, de color púrpura rojizo, situados mayormente en el margen de los eritrocitos o raramente en el centro (Kreier y Ristic, 1963) (Figura 2A).

Teñidos con el colorante de Gram se presentan como pequeños cuerpos cocoides de 0,3 a 0,8 μ de diámetro Gram negativos (Amerault *et al.*, 1973).

La microscopía electrónica revela dos formas morfológicamente distintas del microorganismo: (1) los clásicos corpúsculos marginales denominados cuerpos de inclusión y (2) los cuerpos iniciales. Cada cuerpo de inclusión contiene en su interior de 1 a 8 cuerpos iniciales que son las formas infectantes, cada uno de 0,3 a 0,4 μ de diámetro compuestos por densos agregados de un material granular fino embebido en un plasma electro-lúcido y limitados por una doble membrana (Ristic y Watrach, 1961) (Figura 2B). La membrana externa que recubre los cuerpos iniciales formando una vacuola intracitoplasmática en los eritrocitos maduros es derivada de la membrana del eritrocito (Francis *et al.*, 1979).

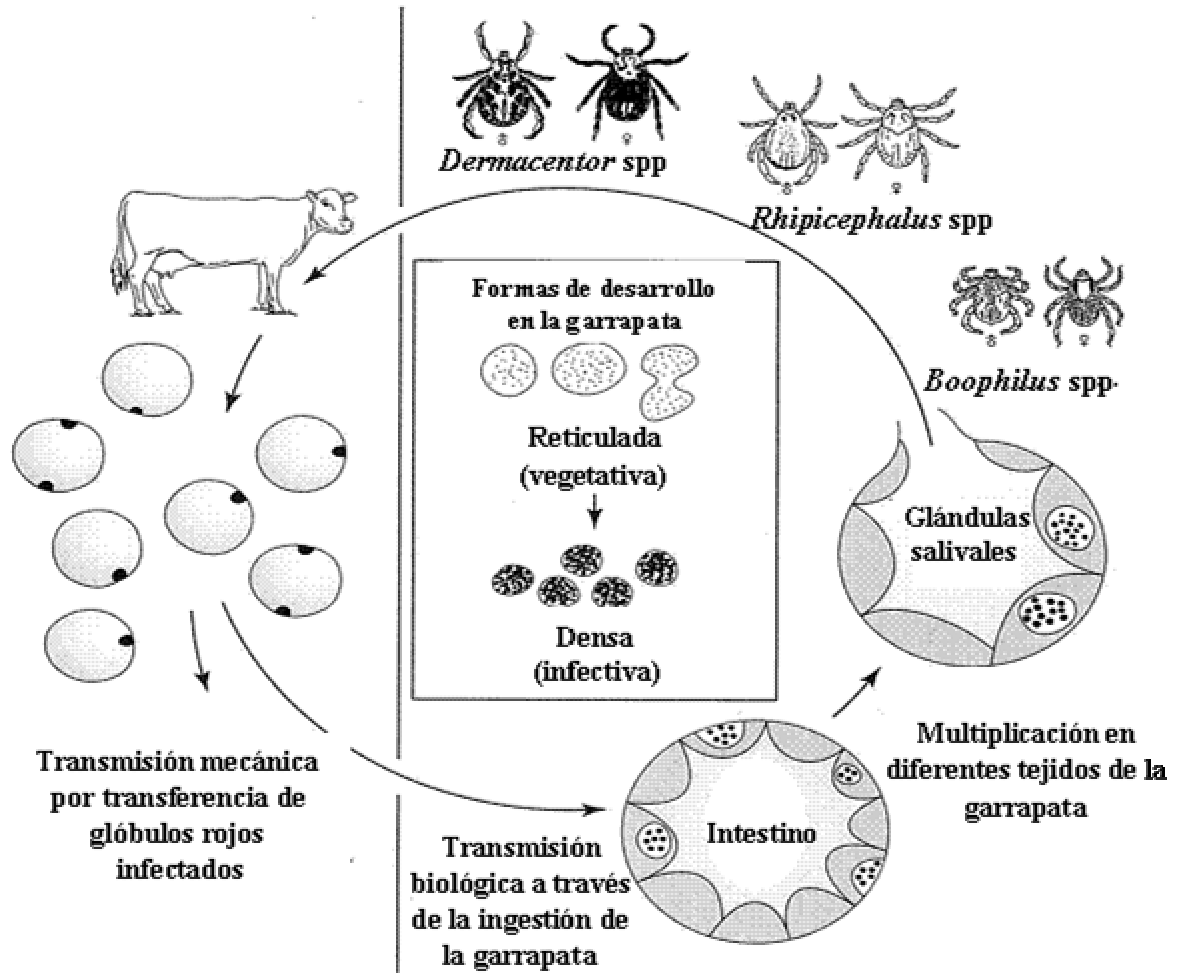
Figura 2: Eritrocitos bovinos infectados con *A. marginale*. (A) Cuerpos de inclusión localizados en la periferia del eritrocito en una impronta de sangre teñida. (B) Micrografía electrónica donde se observa un cuerpo de inclusión que contiene cinco cuerpos iniciales (Kocan *et al.*, 2004).



2.3 Ciclo de vida

El desarrollo en la garrapata (Figura 3) comienza cuando ésta se alimenta con sangre de animales portadores de *Anaplasma* spp., colonizan las células del intestino, en donde se replican y pasan a otros tejidos incluyendo glándulas salivales. Forman colonias limitadas por una membrana donde en un primer estadio se encuentran las formas reticuladas (vegetativas) que se dividen por fisión binaria generando colonias que pueden contener centenares de organismos. Éstos, pasan a una forma densa (infectante) que son transmitidas por la garrapata cuando se alimentan vía glándula salival (Kocan *et al.*, 1996).

Figura 3: Ciclo de *A. marginale* en el ganado bovino y la garrapata. Adaptado de Kocan *et al.*, 2003.



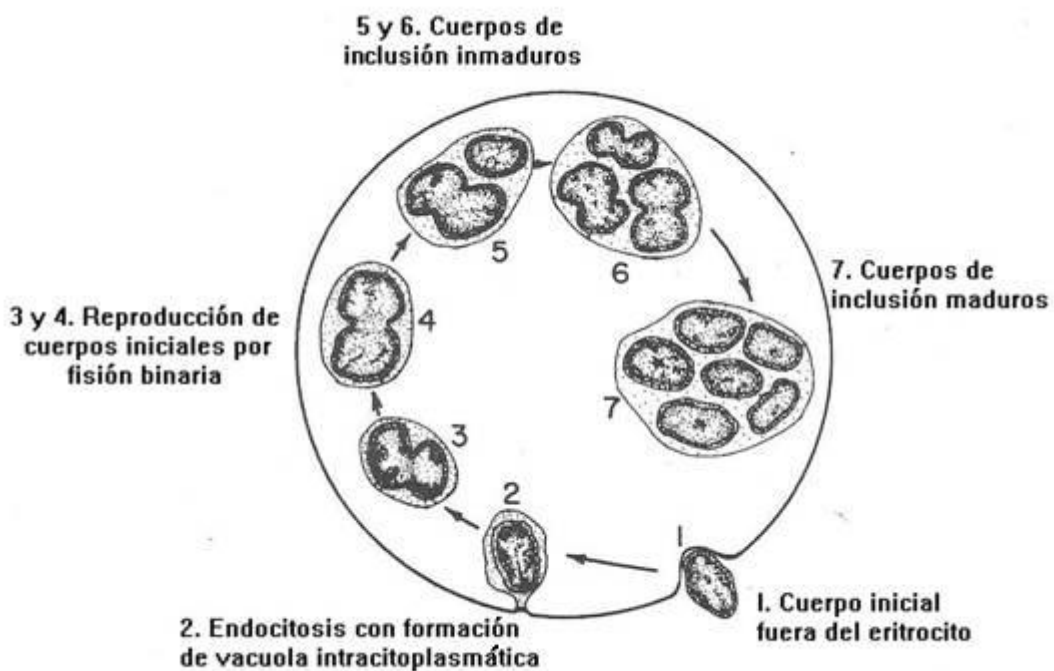
En el hospedador vertebrado el desarrollo completo del agente infeccioso se produce dentro del eritrocito maduro (Ristic y Watrach, 1963) y el ciclo comienza cuando la forma infectante (corpúsculos iniciales) de 0,3 a 0,4 μ penetra en el glóbulo rojo mediante endocitosis (Simpson *et al.*, 1967; Bauntgartner, 2005), proceso que consiste en la invaginación de la membrana citoplasmática con la consiguiente formación de una vacuola que contiene al organismo (Francis *et al.*, 1979; Ristic *et al.*, 1981). Dentro de la vacuola el agente se multiplica sometándose a una serie de fisiones

binarias para formar las estructuras conocidas como corpúsculos de inclusión que están compuestos por 4 a 8 corpúsculos iniciales (Potgieter, 2004) (Figura 4).

La salida de los corpúsculos iniciales del eritrocito se produciría por exocitosis sin generar la lisis del glóbulo rojo a través de poros originados en la membrana por los que salen las formas infectantes (Giardina *et al.*, 1983; Erp y Fahrney, 1975). En contraposición, otros autores señalan a la lisis celular como forma de liberación del agente (Bundza y Samagh, 1982).

Una vez que los corpúsculos iniciales (formas infectantes) son liberados invaden otros eritrocitos (Potgieter, 2004) incrementándose al doble el número de eritrocitos infectados cada 24 a 48 horas (Radostits *et al.*, 2002).

Figura 4: Supuesto ciclo de desarrollo de *A. marginale* basado en evidencia estática obtenida a partir de estudios de microscopía electrónica. Adaptado de Ristic y Carson, 1977.



2.4 Patogenia

Después que el agente infeccioso ingresa al hospedador vertebrado, existe un período prepatente hasta que los primeros eritrocitos infectados son detectados en los extendidos de sangre. Esto es seguido por una fase patente en la que hay cada vez mayor parasitemia y anemia, terminando ya sea en la muerte del animal o en su convalecencia y recuperación, desarrollando un estado de portador (Potgieter y Stoltsz, 2004).

Durante el período patente de la enfermedad los eritrocitos infectados son eliminados rápidamente de la circulación por el sistema retículoendotelial, especialmente el bazo (Ristic, 1981). Esto hace que se produzcan alteraciones orgánicas que están relacionadas con una hiperactividad e hiperplasia de dicho sistema (Ristic, 1960). Si bien las células reticuloendoteliales están presentes en todos los órganos son más abundantes en el bazo e hígado; esto resulta en esplenomegalia y hepatomegalia con un aumento de la friabilidad del bazo que predispone a su ruptura (Anziani *et al.*, 1981).

La anemia se produce 1 a 6 días después del pico de parasitemia y su aumento puede persistir por 4 a 15 días en donde se pueden perder hasta un 70% de los eritrocitos circulantes (Ristic, 1981).

Baker *et al.*, (1961), demostraron que la anemia se debe a un aumento en la destrucción de los glóbulos rojos. Utilizando eritrocitos marcados con Cr⁵¹ determinaron que la supervivencia de los mismos durante la crisis hemolítica en terneros esplenectomizados e infectados experimentalmente con *A. marginale* era de 8 a 10 veces menor que el valor normal; ello se debería a un incremento de similar magnitud en el catabolismo de los eritrocitos por el sistema retículoendotelial, concluyendo que en la anaplasmosis la anemia se debería a una aguda hemólisis

extravascular. De esta manera es posible explicar la ausencia de hemoglobinemia y hemoglobinuria ya que los eritrocitos no son destruidos por hemólisis intravascular, sino que son retirados de la circulación por fagocitosis extravascular (Baumgartner, 2005).

Como consecuencia de la elevada destrucción de glóbulos rojos disminuyen los valores de hemoglobina. El aumento del catabolismo de la hemoglobina produce un aumento de la bilirrubina circulante, que supera la capacidad de conjugación por parte del hígado para su excreción como ácidos y sales biliares. Cuanto mayor es la destrucción de glóbulos rojos mayor es la cantidad de bilirrubina sérica total y de bilirrubina conjugada en los líquidos corporales, resultando el color amarillo característico de los distintos tejidos (ictericia). También son muy elevados los valores de urobilinógeno fecal (Jones y Brock, 1966).

Esta fase aguda de la infección da lugar a un rápido inicio de los signos clínicos que se caracterizan por palidez de las mucosas, depresión, inapetencia, disminución en la producción de leche, fiebre, éstasis ruminal, pérdida de peso, deshidratación, ictericia y hasta abortos en casos severos (Potgieter y Stoltsz, 2004).

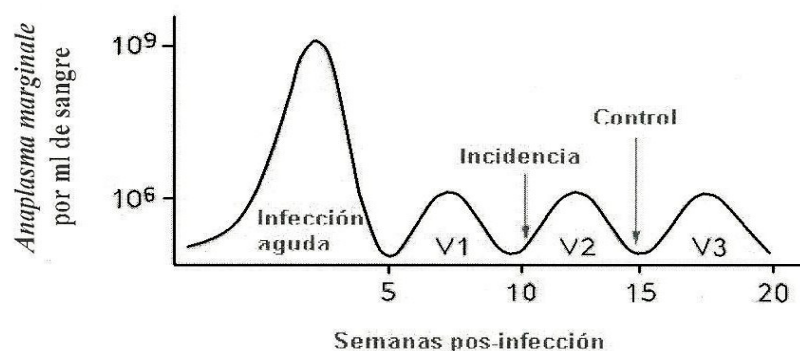
En el ganado que sobrevive a la fase patente de la enfermedad, la convalecencia comienza con una hematopoyesis acelerada caracterizada por reticulocitosis, macrocitemia y granulopoyesis (Ristic, 1981). Es importante destacar que estos animales siguen siendo persistentemente infectados con niveles a veces no detectables microscópicamente (French *et al.*, 1998). Estos niveles de parasitemia que van desde más de 0,0025% a menos de 0,000025% son muy variables, tanto entre animales portadores como dentro de un mismo individuo, lo que implica que en un determinado

momento cada animal portador puede diferir significativamente en su capacidad de transmitir la enfermedad (Eriks *et al.*, 1989).

French *et al.*, (1998) encontraron que los picos cíclicos de rickettsemia responden al polimorfismo de la proteína principal de superficie (MSP-2), de la cual surgen nuevas variantes que tienen que ser controladas por una población de linfocitos distinta en cada ciclo (Figura 5). Dicho hallazgo demuestra que las variantes estructurales de MSP-2 que surgen durante cada ciclo de rickettsemia son variantes antigénicas verdaderas y *A. marginale* lo usa como un mecanismo de evasión del sistema inmune y persistencia en el huésped (French *et al.*, 1999). Esto sería fundamental para la transmisión, ya que los animales que se recuperan de la infección actúan como reservorio para la transferencia mecánica de eritrocitos infectados y para la adquisición de la infección por las garrapatas (Palmer *et al.*, 1999).

Aunque los animales que han sobrevivido a la fase clínica de la enfermedad se encuentran protegidos durante toda la vida, en condiciones de estrés u otra causa que produzca una inmunosupresión pueden manifestar una recurrencia de la infección (Bock y De Vos, 2001).

Figura 5: Ciclos de rickettsemia en animales persistentemente infectados (Palmer *et al.*, 1999).



2.5 Inmunidad y resistencia

2.5.1 Resistencia natural

Es posible que la resistencia natural o innata se deba a características genéticas del propio individuo, así como también a la raza y a la edad. Animales de todas las edades son susceptibles a la infección, pero el incremento de la misma representa una determinante importante en la gravedad de la presentación clínica (Radostits *et al.*, 2002).

Tanto la parasitemia como la anemia es más leve en los terneros jóvenes después de la infección experimental con cepas virulentas de *A. marginale*, aunque no se sabe demasiado acerca de la resistencia juvenil a la anaplasmosis. Ristic (1981), sugiere como posibles factores a: 1) la rapidez de la respuesta inmune que es mayor en animales jóvenes por la competencia de la función del timo, en particular por la inmunidad mediada por células, 2) una vigorosa actividad eritropoyética de la médula ósea y 3) un papel protector por parte de la hemoglobina fetal.

Con respecto a los fenómenos de resistencia relativos a los biotipos, varios autores han hecho comparaciones entre *Bos indicus*, *Bos taurus* y sus cruzas, pero no hallaron evidencias significativas que avalen algún tipo de resistencia innata a la infección con *A. marginale* (Wilson *et al.*, 1980; Otim *et al.*, 1980). Aunque es posible que en áreas donde la garrapata es endémica *Bos indicus* no se afecte con tanta frecuencia debido probablemente a su resistencia relativa frente a la infestación intensa por garrapatas (Radostits *et al.*, 2002).

2.5.2 Mecanismos de inmunidad adquirida

El concepto actual de inmunidad contra *A. marginale*, propone que la eliminación del agente infeccioso requiere la inducción de altos niveles de anticuerpos, especialmente IgG₂ dirigidos contra epítopes de superficie en combinación con la activación de macrófagos para la opsonización y destrucción microbiana (Palmer *et al.*, 1999). El centro de este modelo son las células T cooperadoras CD4⁺ (Th CD4⁺) que expresan interferón gamma (INF- γ), lo que aumenta la síntesis predominante de IgG bovina opsonizante subclase IgG₂, y de forma concomitante activa los macrófagos aumentando la expresión de receptores, la fagocitosis, la fusión fagolisosomal y la liberación de óxido nítrico rickettsiaca (Potgieter y Stoltz, 2004).

Se ha demostrado que la inmunización de ganado bovino con proteínas de superficie de membrana purificadas de *A. marginale* induce una inmunidad sólida al desafío homólogo, en la que participan macrófagos, IgG₂ e INF- γ producido por los linfocitos Th CD4⁺ (Brown *et al.*, 1998). Asimismo, se ha informado que la inoculación con *Micobacterium phlei*, un potente inductor de interleucina 12 (IL12) y células Th CD4⁺ que expresan INF- γ incrementan de manera significativa el control inmunitario de la rickettsemia aguda por *A. marginale* (Sharma, 1988).

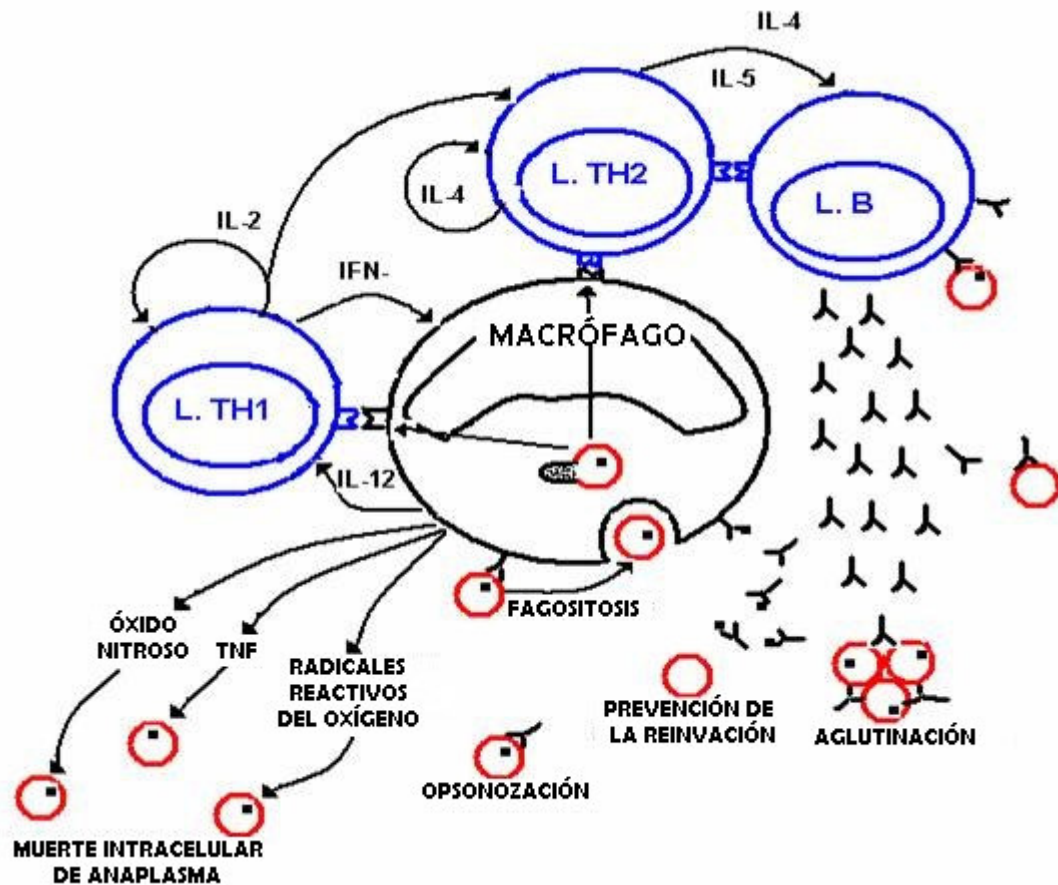
El proceso de invasión del cuerpo inicial es mediado por la proteína de superficie MSP1b que actúa como adhesina, y parece tener afinidad exclusiva por el eritrocito (De la Fuente *et al.*, 2001).

El probable modo de acción de la respuesta se iniciaría cuando los macrófagos fagocitan y procesan los eritrocitos infectados para luego presentarlos en su superficie asociados al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II en donde pueden ser reconocidos por las células Th CD4⁺ (Rodríguez Camarillo *et al.*, 2004).

Paralelamente, los linfocitos B, en concurrencia con las inmunoglobulinas de membrana son capaces de detectar eritrocitos infectados y anaplasmas libres, procesarlos y presentarlos en el CMH clase II de manera que los linfocitos Th2 puedan reconocerlos. Los linfocitos Th1 producen IL-2 e INF- γ , el primero activa Th1 y Th2, y el INF- γ activa a los macrófagos que provocan estimulación de linfocitos Th1 mediante liberación de IL-12 y muerte intracelular de microorganismos mediante liberación de óxido nítrico, factor de necrosis tumoral (TNF) y radicales reactivos del oxígeno. Los linfocitos Th2, por producción de IL-4 e IL-5 inducen a los linfocitos B para que generen anticuerpos (IgG2), los cuales actúan opsonizando eritrocitos infectados y no infectados debido a que el microorganismo genera cambios en la membrana de los mismos (Bautista-Grifas, 1996) (Figura 6).

A. marginale ha desarrollado mecanismos únicos para persistir en el huésped, que incluyen: la pérdida de lipopolisacáridos (LPS) y peptidoglicanos que activan los mecanismos de defensa innatos, el establecimiento de la infección en el eritrocito (célula no fagocítica que carece de CHM) y una extensa variación antigénica en proteínas de superficie (MSP2 y MSP3) que permiten la evasión de la respuesta inmune adaptativa (Brown, 2012).

Figura 6: Probable modo de acción de la respuesta inmune contra la infección por *A. marginale*. Modificado de Bautista-Grifas, 1996.



2.6 Fuentes de infección y reservorios

La fuente de infección y/o reservorio ocupan un lugar de gran importancia en la cadena epidemiológica, ya que es el encargado de mantener la enfermedad en el rodeo. En el caso de la anaplasmosis bovina tanto el ganado con enfermedad aguda como el que presenta infección persistente (portador), sirven como reservorio de *A. marginale* ya que a través de la sangre infectada se puede transmitir en forma mecánica o biológica (Kocan *et al.*, 2003).

A. marginale afecta principalmente a los bovinos pero también produce infección en otros mamíferos, especialmente ovinos, caprinos, búfalos y rumiantes

silvestres. Kuttler (1984a) describió diferentes rumiantes silvestres africanos, americanos y asiáticos de los cuales se recobró *A. marginale* (generalmente luego de inoculaciones experimentales) en los que produjo infecciones no aparentes o subclínicas. La jirafa sería hasta el momento el único animal silvestre que puede contraer anaplasmosis con sintomatología clínica aunque no se logró determinar la especie actuante. En la tabla 2 se listan las especies domésticas y silvestres susceptibles a *Anaplasma* spp.

La enfermedad también se logró reproducir en el bisonte americano (*Bison bison*) a partir de sangre bovina infectada, demostrándose la secuencia de infección bovino-bisonte-bovino (Zaugg y Kuttler, 1985; Zaugg, 1986). Posteriormente, Zaugg (1996) logró infectar en forma experimental alces (*Cervus elaphus*); aunque los mismos no presentaron sintomatología clínica.

En Estados Unidos, el ciervo de cola negra (*Odocoileus hemionus columbianus*) parece constituir un reservorio de *A. marginale* mientras que en Sudáfrica existen diversas especies de antílopes que desempeñan un papel similar (Radostits *et al.*, 2002).

Tabla 2: Animales domésticos y silvestres de América, África y Asia que pueden ser potenciales reservorios de la enfermedad (Modificado: Kuttler, 1984a).

Especies domésticas	<i>Anaplasma</i> spp.	<i>A. marginale</i>	<i>A. ovis</i>	<i>A. centrale</i>
Bovinos (Theiler, 1910, 1911)		+++	+/-	++
Ovinos (Donatien y Lestoquard, 1930; Splitter <i>et al.</i> , 1956; Gautam <i>et al.</i> , 1970; Ulienberg <i>et al.</i> , 1979; Magonigle <i>et al.</i> , 1981; Vanzini y Ramirez, 1989)	+	+	++	+
Cabras (Mallick <i>et al.</i> , 1979; Maas y Buening, 1981b)		+	++	
Caballos (Brion, 1943)	++			
Búfalo de agua (<i>Bubalus bubalis</i>) (Carpano, 1934; Gautam <i>et al.</i> , 1970; Singh y Gill, 1977)	+	+		
Especies silvestres de Norte América	<i>Anaplasma</i> spp.	<i>A. marginale</i>	<i>A. ovis</i>	<i>A. centrale</i>
Bison (<i>Bison bison</i>) (Zaugg y Kuttler, 1985.; Zaugg, 1986)		+		
Ciervo de cola blanca (<i>Odocoileus virginianus</i>) (Kreier y Ristic, 1963b; Roberts y Lancaster, 1963; Kuttler <i>et al.</i> , 1967; Lancaster <i>et al.</i> , 1968; Kuttler, 1981a; Maas y Buening, 1981a; Smith <i>et al.</i> , 1982)		+	+	
Ciervo mulo (<i>Odocoileus hemionus hemionus</i>) (Howe <i>et al.</i> , 1964; Howe y Hepworth, 1965; Renshaw <i>et al.</i> , 1977)		+		
Ciervo de cola negra (<i>Odocoileus hemionus colombianus</i>) (Boynton y Woods, 1933, 1940; Christensen <i>et al.</i> , 1958; Osebold <i>et al.</i> , 1959; Howarth <i>et al.</i> , 1969)		++		
Antílope americano (<i>Antilocapra americana</i>) (Howe <i>et al.</i> , 1964; Howe y Hepworth, 1965; Jacobson <i>et al.</i> , 1977)		+		
Ciervo de las Montañas Rocosas (<i>Cervus elaphus nelsoni</i>) (Post y Thomas, 1961; Howe <i>et al.</i> , 1964; Magonigle y Eckbland, 1979)		+	+	
Musmon (<i>Ovis canadensis canadensis</i>) (Howe <i>et al.</i> , 1964)		+		

Especies silvestres de África y Asia	<i>Anaplasma</i> spp.	<i>A.marginale</i>	<i>A.ovis</i>	<i>A.centrale</i>
Búfalo cafre (<i>Syncerus caffer</i>) (Brocklesby y Vidler, 1966; Potgieter, 1979)	+	+		
Jirafa (<i>Giraffa camelopardalis</i>) (Brocklesby y Vidler, 1966; Lohr y Meyer, 1973; Agustyn y Bigalke, 1974; Lohr <i>et al.</i> , 1974)	+++			
Ñu azul (<i>Connochaetes taurinus</i>) (Kuttler, 1965; Lohr y Meyer, 1973; Burridge, 1975)	+	+		
Ñu negro (<i>Connochaetes gnu</i>) (Neitz, 1935)		+		
Kongoni (<i>Alcelaphus buselaphus cokii</i>) (Lohr y Meyer, 1973)	+	+		
Gacela de Thompson (<i>Gzella thompsonii</i>) (Lohr y Meyer, 1973)	+	+		
Blesbuck (<i>Damaliscus albifrons</i>) (Neitz y Du Toit, 1932; Neitz, 1939)		+		
Impala (<i>Aepyceros melampus</i>) (Kuttler, 1965; Lohr <i>et al.</i> , 1974)	+/-			
Antílope sable (<i>Hippotragus níger</i>) (Thomas <i>et al.</i> , 1982)	++		+	
Gacela de Grant (<i>Gazella grantii</i>) (Lohr <i>et al.</i> , 1974)	+			
Duiker gris (<i>Sylvicapra grimmia grimmia</i>) (Neitz y Du Toit, 1932)		+		
Antílope acuático (<i>Kobus ellisiprymnus</i>) (Kuttler, 1965; Lohr <i>et al.</i> , 1974)	+/-			
Ibex siberiano (<i>Capra sibirica</i>) (Matthews, 1978)	+++			
Eland (<i>Taurotragus oryx</i>) (Lohr <i>et al.</i> , 1974)	+/-			
Alce (<i>Alces alces</i>) (Grobov, 1961)		+		

+/- : Sólo evidencia serológica. +: Infección subclínica con baja parasitemia.

+ +: Infección y respuesta clínica suave. + + +: Infección y respuesta clínica severa

2.7 Transmisión

2.7.1 Intrauterina

Además de la transmisión por garrapatas, insectos hematófagos y fómites, existen registros que indican la existencia de transmisión de *A. marginale* de vaca a feto en condiciones experimentales. La inoculación en vacas preñadas en el último tercio de la gestación indujo enfermedad clínica con alta parasitemia, y transmisión transplacentaria en dos de cinco animales, sugiriendo que el pasaje del agente ocurre cerca de 15 días pos inoculación endovenosa (Swift y Paumer, 1976).

En otro estudio realizado en vacas infectadas en el último tercio de la gestación, Fowler y Swift (1975) observaron transmisión y aborto. La determinación de las causas de la muerte fetal con el posterior aborto fue atribuida a factores como la severa anemia en la madre y la mayor demanda de oxígeno del feto en esta etapa de la gestación (Swift y Paumer, 1978). En casos de infecciones naturales con *A. marginale* se observó que la gestación llegó a término con el nacimiento de terneros débiles, anémicos e ictericos y una breve sobrevida, sugiriendo transmisión transplacentaria (Bird, 1973; Paine y Miller, 1977; Norton *et al.*, 1983; Calderon Gonçalves *et al.*, 2005).

Los anticuerpos calostrales provenientes de madres infectadas no parecen proteger totalmente a la prole, sino que prolongarían el período prepatente con retraso de la anemia y del pico de parasitemia (Zaugg y Kuttler, 1984).

La inoculación de sangre con *A. marginale* en terneros esplenectomizados, obtenida de fetos en gestación a los 40 y 56 días después de la infección experimental de sus madres en el segundo y tercer tercio de la gestación, fue capaz de causar anaplasmosis aguda. Sin embargo la sangre no fue infectante luego del nacimiento, lo cual sugiere que la infección fue esterilizada *in utero* (Zaugg, 1985).

Otros autores observaron transmisión en terneros nacidos de madres portadoras crónicas de *A. marginale* con un 15,6% de infecciones contraídas en el útero (Potgieter y Van Rensburg, 1987).

Bock *et al.* (2003) reportaron la presencia de *A. marginale* al esplenectomizar la descendencia de una vaca criada en una zona infestada de garrapatas que se mantuvo luego en una zona libre, asumiendo que el contagio se dio por vía transplacentaria durante dos generaciones.

En Cuba, se reportó un 86,4% de terneros positivos mediante extendidos sanguíneos dentro de las primeras 24 hs de vida. Los mismos eran hijos de vacas portadoras que habían sufrido anaplasmosis clínica en los últimos dos meses de la gestación y fueron tratadas con oxitetraciclina; concluyendo que la transmisión podría ser de gran importancia epizootiológica en las condiciones del país (Salaberria y Pino, 1988).

En Venezuela se evaluó la presencia de *A. marginale* en terneros recién nacidos y la respuesta de los anticuerpos a la enfermedad. Se observó una prevalencia del 100% con parasitemias del 1 al 3% en los animales estabulados a los 30 días de nacidos, sugiriendo transmisión transplacentaria y concluyendo que debería ser tomada en cuenta como factor de riesgo en zonas donde la anaplasmosis es endémica (Rey Valeirón *et al.*, 2003). Posteriormente se evaluó transmisión vertical en hembras asintomáticas y sus respectivas crías por medio de la técnica de PCR dando como resultado un 40% de terneros positivos (la edad de los mismos variaba de 1 a 330 días y todos los animales se mantuvieron estabulados con el fin de evitar la transmisión horizontal) concluyendo que este tipo de transmisión parece ser frecuente en esta región (Añez-Rojas *et al.*, 2010).

En Brasil, 11 vacas en el último tercio de la gestación fueron inoculadas con *A. marginale* y el 36% de los terneros resultaron serológicamente positivos antes del calostro. En un trabajo realizado en frigorífico, sobre 97 sueros de fetos de entre 121 y 150 días de gestación provenientes de vacas portadoras de *A. marginale*, se encontró un 2,1% de animales positivos mediante la técnica de DOT-ELISA (Ribeiro *et al.*, 1995).

Aunque los anticuerpos maternos no atraviesan la barrera placentaria bovina normal, el feto es susceptible a la infección por *A. marginale* y es capaz de producir anticuerpos entre los 100 a 140 días de gestación, por lo que los títulos de anticuerpos encontrados en la sangre fetal son debido solamente a la respuesta inmunológica del feto (Trueblood *et al.*, 1971).

Hubbert *et al.* (1975) relacionan la tasa de transmisión vertical y la variabilidad genética de cepas de *A. marginale* con diferente afinidad por el feto.

Aunque varios autores han constatado la transmisión vertical de la anaplasmosis, no hay trabajos en nuestro país que interpreten su importancia bajo condiciones naturales, por lo que son necesarios estudios regionales para entender y cuantificar la transmisión de *A. marginale* (Guglielmone, 1995).

2.7.2 Garrapatas

Las garrapatas son de suma importancia en la medicina veterinaria debido a que transmiten una gran variedad de microorganismos patógenos y actúan como vectores de enfermedades que afectan a humanos y animales (Jongejan y Uilenberg, 2004).

Aproximadamente unas 20 especies de garrapatas han sido incriminadas como vectores transmisores de la enfermedad en todo el mundo (Dikmans, 1950; Ewing,

1981). Kocan *et al.* (2004) presentan una lista de reportes de especies que actúan como vectores de *A. marginale* en la que se encuentran *Boophilus (Rhipicephalus) spp.*, *Dermacentor spp.*, *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus spp.* e *Hyalomma rufipes*.

La garrapata *R. microplus*, originalmente nativa del subcontinente indio, se ha extendido con los bovinos y equinos por toda Asia tropical y subtropical, sudeste de África, el Caribe, México y varios países de América Central y del Sur (FAO, 1987; The Center for Food Security & Public Health, 2007). Fue erradicada de los Estados Unidos entre 1906 y 1943, pero algunas veces se la suele encontrar en zonas limítrofes con México, como Texas o California. (The Center for Food Security & Public Health, 2007).

Introducida en el continente americano probablemente con la importación de vacunos en los siglos XVII o XVIII, se convirtió en el parásito más perjudicial desde el punto de vista económico en la mayoría de los países americanos (Núñez, 1994). Es la especie más importante en nuestro país, afectando al ganado de las provincias de Corrientes, Misiones, Chaco, Formosa, Santiago del Estero, parcialmente Tucumán, Catamarca, Salta y zonas nortenas de Córdoba y Santa Fe (Romano, 1994).

La transmisión de *A. marginale* por *R. microplus* ha sido constatada por varios autores tanto en forma transestadial como intraestadial (Connell y Hall, 1972; Leatch, 1973; Thompson y Roa, 1978; Mason y Normal, 1981; Dalgliesh y Stewart, 1983; Futse *et al.*, 2003). Aguirre *et al.* (1994) demostraron transmisión de la enfermedad con adultos de *R. microplus* solamente cuando los animales portadores de los que se alimentaban presentaban una parasitemia superior al 0,3%, llegando a la conclusión de que la transmisión en condiciones naturales, depende de la tasa de migración de la

garrapata entre hospedadores susceptibles y del nivel de rickettsemia que presenten los animales.

Ribeiro y Lima (1996) mediante técnicas de microscopía óptica y electrónica demostraron desarrollo de colonias de *A. marginale* en células intestinales de *R. microplus*.

Kessler (2001), basándose en datos experimentales anteriores, considera a esta garrapata como el principal vector biológico y transmisor de la enfermedad en Brasil. Sin embargo, en otro estudio realizado en ese país con una cepa de *A. marginale* con apéndice, no se demostró la infección de células intestinales ni glándulas salivares en la garrapata y las larvas originadas de las mismas no fueron infectantes cuando se alimentaron en animales susceptibles, llegando a la conclusión de que *R. microplus* no sería un vector biológico para este aislamiento (Gonçalves Riuz *et al.*, 2005). Asimismo, otros informes consideran que la ruta principal de difusión de *A. marginale* en áreas de Centroamérica, Sudamérica y África es la mecánica ya que *R. microplus* no parece ser un vector biológico en la transmisión del agente (Kocan, *et al.*, 2003; Kocan *et al.*, 2010).

Los machos de *Rhipicephalus* spp. pueden tener, en condiciones naturales, un rol importante en la transmisión de *A. marginale* (Kocan *et al.*, 2003; Potgieter y Stoltsz, 2004) ya que los mismos pueden sobrevivir en el ganado por periodos superiores a dos meses (Potgieter y Stoltsz, 2004).

Pese a lo expresado anteriormente, algunos autores consideran que la transmisión de *A. marginale* por *R. microplus* podría tener una importancia menor de la que se le atribuye (Ríos *et al.*, 1990; Coronado, 2001).

La transmisión transovárica en esta garrapata también genera ciertas contradicciones ya que mientras varios trabajos experimentales avalan la teoría de que no existe (Connell y Hall, 1972; Leatch, 1973; Thompson y Roa, 1978), López Valencia y Vizcaino Gerdtz (1992) demostraron dicha transmisión en forma experimental alimentando teleoginas de *R. microplus* a 28° C con 80% de humedad, en animales infectados con una cepa silvestre, logrando la transmisión transovárica en la primera y la segunda generación de garrapatas. Shimada *et al.* (2004) utilizando larvas de *R. microplus* recogidas de una zona endémica y de garrapatas infectadas experimentalmente en animales con baja parasitemia, demostraron mediante técnicas de PCR, que las teleoginas incubadas a temperaturas de 18°C con un período más largo de oviposición, fueron capaces de transmitir la infección a su descendencia.

La transmisión transestadial e intraestadial en *R. annulatus* también fue demostrada en forma experimental (Samish *et al.*, 1993).

Potgieter y Van Rensburg (1980) en condiciones de laboratorio reprodujeron la enfermedad usando machos de *R. simus*. Estudios posteriores en *R. simus* lograron demostrar la presencia de algunas colonias de *A. marginale* con matriz densa rodeadas de pequeñas partículas electrodensas en células de glándulas salivales (Potgieter *et al.*, 1983).

También fue reportado como transmisor transestadial de la enfermedad en forma experimental *Amblyomma neumanni* (garrapata de tres hospedadores) común en el ganado de algunas regiones del noroeste de Argentina (Gaido *et al.*, 1995).

El género *Dermacentor* spp., que es uno de los más estudiados, es de gran importancia en partes de Norte América pero no se encuentra en el sur del continente (Guglielmone, 1995).

D. andersoni es el vector biológico de mayor importancia en los Estados Unidos, esta especie de 3 hospedadores, como la mayoría de los *Dermacentor* americanos, afecta rumiantes silvestres y domésticos; extendiéndose geográficamente desde el oeste de Nebraska hasta las cascadas y montañas de Sierra Nevada, y desde el norte de Arizona y Nuevo México hasta el oeste de Canadá (FAO, 1987).

La transmisión del agente patógeno en estas garrapatas, como en las demás especies nombradas anteriormente también se puede dar en forma transestadial o intraestadial (Eriks *et al.*, 1993; Kocan *et al.*, 1996).

La transmisión transestadial se ha comprobado experimentalmente en garrapatas *D. andersoni* y *D. variabilis* infectando ninfas y posteriormente reproduciendo la enfermedad después de la muda a garrapatas adultas en animales susceptibles (Kocan *et al.*, 1980a; Kocan *et al.*, 1981).

La transmisión intraestadial ha sido probada en machos de *D. andersoni* (Zaugg *et al.*, 1986; Kocan *et al.*, 1992a; Kocan *et al.*, 1992b). Debido a que éstos presentan una conducta de alimentación intermitente y sólo unas pocas garrapatas son suficientes para transmitir la enfermedad, se sugiere que podrían tener un rol epidemiológicamente importante (Potgieter, 1979; Eriks *et al.*, 1993). Coan *et al.* (1989) demostraron experimentalmente que machos de *D. andersoni* infectados con una cepa de Idaho de *A. marginale* se mantuvieron en el campo como vectores eficaces en la transmisión de la enfermedad al menos durante 120 días. Estos datos demuestran que los machos de *D. andersoni* son vectores eficientes de *A. marginale* y pueden ser potenciales reservorios de la infección para los rumiantes durante períodos prolongados (Ge *et al.*, 1996; Kocan *et al.*, 1992a; Kocan *et al.*, 2004).

Este tipo de transmisión también ha sido demostrada en garrapatas machos de *D. occidentalis* y *D. albipictus* (Stiller *et al.*, 1983). Asimismo otro estudio hecho en Europa señala que los machos de *D. reticulatus* son vectores competentes para la transmisión de la enfermedad (Zivkovic *et al.*, 2007).

Si bien la transmisión transovárica en *Dermacentor* ha sido informada por Howell *et al.* (1941), otros autores no han podido demostrarla y consideran que no existe (Kocan *et al.*, 1981; Stich *et al.*, 1989; Kocan *et al.*, 2004).

Aunque se ha demostrado que varias cepas de *A. marginale* son infectantes para estas garrapatas (Cepa Idaho, Virginia, Washington), otras aparentemente no las infectan (Cepa Illinois y Florida) (Kocan *et al.*, 1996). Smith *et al.* (1986) compararon la capacidad de transmisión de dos cepas de *A. marginale* (Illinois y Virginia) por *D. variabilis*, logrando transmitir la enfermedad con la cepa de Virginia mientras que la cepa de Illinois no se pudo transmitir luego de varios intentos.

Otros estudios evidenciaron la presencia de *A. marginale* en diferentes células de *Dermacentor* spp., Kocan *et al.* (1980b) observaron *A. marginale* en células del epitelio intestinal de ninfas y adultos de *D. andersoni* y *D. variabilis*. Posteriormente Stiller *et al.* (1989) confirmaron mediante microscopía electrónica características morfológicas de colonias de *A. marginale* en las glándulas salivares de *D. andersoni*, *D. variabilis* y *D. occidentalis*.

2.7.3 Insectos hematófagos

En la transmisión mecánica se encuentran involucrados varios insectos y parece razonable suponer que probablemente la mayoría de los insectos hematófagos se pueden

considerar como potenciales transmisores de la enfermedad, si las condiciones para su alimentación son óptimas y si están activos en un número suficiente (Piercy, 1956).

Potgieter *et al.* (1981) logró transmitir exitosamente la enfermedad con *Stomoxys calcitrans* (mosca brava o de los establos) partiendo de animales esplenectomizados e infectados experimentalmente, que presentaban un cuadro de anaplasmosis aguda. Posteriormente, Scoles *et al.* (2005) demostraron que la transmisión biológica por la garrapata *D. andersoni* es considerablemente más eficiente que la transmisión mecánica por *S. calcitrans*.

Hay suficiente evidencia, tanto experimental como epidemiológica, para identificar a los *Tabanus* spp. como vectores importantes en la naturaleza. Pero su eficacia como agentes de transmisión no sólo depende de la alimentación y transferencia sin retardo a animales susceptibles, sino que es notablemente mayor cuando la fuente de infección es un animal con anaplasmosis clínica en lugar de un portador crónico (Piercy, 1956). Esto es posible mediante la transferencia de eritrocitos infectados a través del aparato bucal entre un animal portador y uno susceptible en un lapso no mayor de dos horas, dependiendo también de la cantidad de picaduras en el animal (Hawkins *et al.*, 1982). Asimismo cuando se comparó la eficiencia de transmisión entre *D. andersoni* y *Tabanus fuscicostatus*, la garrapata resultó ser un mejor transmisor de *A. marginale* (Scoles *et al.*, 2008).

Hornok *et al.* (2008) en un intento de identificar el vector principal y las posibles vías de transmisión de *Anaplasma* spp. en Hungría, proporcionaron la primera evidencia molecular de *A. marginale* en *Tabanus bovinus* considerándolo un potencial vector mecánico de la enfermedad.

Los mosquitos pueden a veces ser responsables de la transmisión natural de la anaplasmosis y se indica que las especies del género *Psorophora* debido a su gran tamaño, hábitos de alimentación voraz y prevalencia podrían ser las más importantes. Sin embargo no serían tan importantes en la difusión de la enfermedad y la transmisión activa sería relativamente baja (Piercy, 1956).

2.7.4 Iatrogénica

Otra forma de transmisión, no menos importante es la iatrogénica que se genera con el uso de agujas no esterilizadas (extracción de sangre, vacunaciones), instrumentos para la aplicación de caravanas, anillos nasales, equipos de tatuaje e intervenciones quirúrgicas (descorne, castración, transferencia embrionaria) (Baumgartner, 2005; Aubry y Geale, 2011).

Abdala *et al.* (1992) lograron transmitir la enfermedad en forma experimental haciendo prácticas de palpación rectal en vacas Holando Argentino, llegando a la conclusión de que dicha tarea sin la higiene adecuada también puede ser una fuente de diseminación de *A. marginale*.

Baumgartner *et al.* (1993) consiguieron experimentalmente reproducir la enfermedad en terneros por vía oral, con sangre infectada con *A. marginale*, informando que posiblemente el agente también pueda penetrar en los animales por microlesiones en las membranas mucosas de la cavidad oral.

2.8 Biología Molecular

2.8.1 Proteínas principales de superficie

El genoma de *A. marginale* es pequeño y circular, cuenta con 1,2 – 1,6 Mb (Meeus y Barbet, 2001). Aunque no cuenta con un gran tamaño geonómico, la bacteria posee una amplia expresión de antígenos de superficie y sobre todo una gran variabilidad de los mismos, ya sea en los diferentes ciclos de rickettsemia y/o en diferentes aislamientos (Palmer *et al.*, 2000).

Las proteínas principales de membrana (MSPs) están formadas por un grupo de cinco proteínas que se encuentran ubicadas en la membrana celular (Tebele *et al.*, 1991) e interactúan a nivel del sistema inmunitario de los hospedadores. Estas proteínas generan una respuesta inmune eficiente por lo que son útiles para el diagnóstico o para la prevención de la anaplasmosis bovina (Barbet *et al.*, 1999).

2.8.1.1 MSP1

Esta proteína es un heterodímero formado por dos polipéptidos MSP1a y MSP1b, ambos codificados por genes distintos. El MSP1a está codificado por un único gen *msp1a* y el MSP1b por dos genes, el *msp1β₁* y el *msp1β₂* (Barbet *et al.*, 1987). La proteína MSP1 tiene un peso molecular (PM) aproximado de 105 kDa, que puede variar según el número de repeticiones que posea la porción variable de la secuencia (entre 28 y 29 aminoácidos) en la región variable de la proteína (Allred *et al.*, 1990). Esta variación de las repeticiones en *tandem* puede ser utilizada para comparar aislamientos de diferentes zonas geográficas (Palmer *et al.*, 1988; Allred *et al.*, 1990). Se ha comprobado que esta proteína se mantiene constante en los diferentes ciclos (Rickettsemia) de *A. marginale* dentro del hospedador y también durante la transmisión por garrapatas como *D. variabilis* (Bowie *et al.*, 2002).

2.8.1.2 MSP2

Es una proteína de aproximadamente 36 kDa, cuyas subunidades se encuentran unidas por puentes disulfuro (Palmer *et al.*, 1988), y es codificada por una familia multigénica *mSP2* (Palmer *et al.*, 1994). Esta característica le permite ser polimórfica y expresar variaciones en cada ciclo de rickettsemia en animales con infección persistente (French *et al.*, 1999; De la Fuente y Kocan, 2001; Barbet *et al.*, 2001). Dichas variaciones antigénicas entre ciclos de rickettsemia explican la persistencia de por vida del *A. marginale* en los bovinos (French *et al.*, 1999). Se considera también que esta proteína estimula parcialmente el sistema inmunitario con aislamientos homólogos y heterólogos (Palmer *et al.*, 1988), debido a que comparten antígenos de membrana, lo que explicaría la protección cruzada y parcial entre *A. centrale* y *A. marginale*.

2.8.1.3 MSP3

Esta proteína está codificada por una familia multigénica, su PM es de aproximadamente 86 kDa (Palmer y McElwain, 1995). Al igual que la proteína MSP2 tiene variaciones durante las rickettsemias (French *et al.*, 1999) y también está involucrada en la respuesta inmune protectora que se genera en los animales expuestos por primera vez al agente (Palmer *et al.*, 1999). Presenta una gran variación en su estructura y en sus propiedades antigénicas en aislamientos de diferentes zonas geográficas (Allegan y Barbet, 1996).

2.8.1.4 MSP4

Es una proteína codificada por un sólo gen, pesa aproximadamente 31 kD. Se encuentra bien conservada, propiedad que le brinda un potencial importante para ser

utilizada en la protección de los animales, característica que no está presente en las proteínas de superficie con mucha variación (Oberle *et al.*, 1993).

2.8.1.5 MSP5

Esta proteína pesa aproximadamente 19 kDa, codificada por un único gen, es una proteína que presenta una estructura constante debida posiblemente a la unión disulfuro entre sus subunidades (Visser *et al.*, 1992). Se encuentra muy bien conservada en diferentes aislamientos de varios países (Vidotto *et al.*, 1994). Visser *et al.* (1992) identificaron otra de las características importantes de esta proteína, que se mantiene constante en varias de las especies del género *Anaplasma* lo que podría sugerir la importancia que tiene en el ciclo de vida de este agente. Se ha probado su utilidad para el diagnóstico serológico utilizando la técnica de ELISA de competición basada en el anticuerpo monoclonal AnaF16C1, y en el diagnóstico molecular mediante la técnica de PCR (Torioni de Echaide *et al.*, 1998).

2.9 Diagnóstico

Los síntomas clínicos más característicos de la enfermedad son anemia e ictericia sin presencia de hemoglobinemia ni hemoglobinuria, lo que a menudo ayuda en el diagnóstico diferencial con la babesiosis. No obstante la enfermedad sólo se puede confirmar mediante la identificación del microorganismo causante (OIE, 2008).

En los animales muertos los hallazgos más evidentes son emaciación, ictericia, palidez de tejidos, sangre poco espesa, hígado aumentado de tamaño con una coloración anaranjada, vesícula biliar repleta con bilis espesa, esplenomegalia y pueden observarse hemorragias miocárdicas (Vanzini y Ramírez, 1994; Radostits *et al.*, 2002).

En base a los síntomas clínicos y a los hallazgos de la necropsia se puede arribar a un diagnóstico presuntivo que debe corroborarse mediante la presencia del agente (Bauntgartner, 2005).

Una gran variedad de técnicas están disponibles para la confirmación del diagnóstico clínico que se puede hacer en forma directa o indirecta.

2.9.1 Diagnóstico directo

Este se puede hacer mediante la búsqueda de *A. marginale* en extendidos de sangre de animales infectados durante la fase aguda de la enfermedad, teñidos con Giemsa, pero no es confiable para la detección en animales portadores (Aubry y Geale, 2011). También es posible hacer el diagnóstico utilizando otras tinciones como Romanowski, Wright o solución al 3% de azul de toluidina (Bauntgartner, 2005). La tinción de Diff-Quick, que se encuentra disponible en el mercado parece tener mejores resultados que Giemsa y Wright-Giemsa ya que sólo se necesita un tiempo muy corto para teñir los extendidos de sangre y permite un recuento de microorganismos más preciso (Donovan-Myhand *et al.*, 1984).

El método “Estándar de Oro” considerado para demostrar que la sangre es libre de *A. marginale* consiste en la subinoculación de sangre del animal sospechoso en un ternero esplenectomizado que es altamente susceptible a la infección (Coetzee, *et al.*, 2006). En caso de haber recibido sangre infectada, se observará *Anaplasma* en los extendidos de sangre del ternero esplenectomizado, por lo general en 4 semanas, aunque este período puede prolongarse a 8 semanas (OIE, 2008).

Otro de los métodos que permite detectar el agente en forma directa es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a través de la identificación del ADN, tanto

en infecciones incipientes, agudas y crónicas de la enfermedad, donde los niveles de rickettsemia pueden ser extremadamente bajos.

Varios tipos de PCR han sido aplicados en el diagnóstico de la enfermedad. Figueroa *et al.* (1993) desarrollaron una PCR múltiple para detección de *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* y *A. marginale*; la sensibilidad analítica de esta prueba según la evaluación de hibridización de ácidos nucleicos con sondas no radiactivas, fue de 0,00001% de eritrocitos infectados para las tres enfermedades en animales persistentemente infectados.

Gale *et al.* (1996a) mediante técnicas de PCR simple y basándose en detección de niveles mínimos de *A. marginale* presentes en sangre de animales portadores, lograron un límite de sensibilidad de 0,00015% de parasitemia (24 eritrocitos infectados por microlitro de sangre). Un método más sensible para la detección de animales portadores es la PCR anidada (n-PCR) ya que es capaz de detectar niveles de 0,0000001% (30 eritrocitos infectados por mililitro de sangre), en contraposición con la PCR simple que detecta 0,0001% usando la misma dilución de eritrocitos infectados en ambos casos (Torioni de Echaide *et al.*, 1998).

Recientemente, también se ha aplicado la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR) para el diagnóstico de *A. marginale*, cuyo límite de detección presenta una concordancia de un 100% con el n-PCR (Carelli *et al.*, 2007; Decaro *et al.*, 2008).

La técnica de Hibridización Reversa en Línea (RLBH) ha sido desarrollada para la detección simultánea de agentes filogenéticamente relacionados, permitiendo diferenciar géneros y especies de los microorganismos detectados. Para el diagnóstico del grupo *Ehrlichia/Anaplasma* se amplifica la región 16S rRNA y para el grupo *Theileria/Babesia* se amplifica la región 18S rRNA (Schouls *et al.*, 1999; Gubbels *et al.*,

1999; Schnittger *et al.*, 2004). Esta técnica es utilizada como una herramienta de diagnóstico o en estudios epidemiológicos, consistiendo en un ensayo de PCR en el cual el producto del mismo se acopla a una membrana unida a sondas específicas pudiendo determinar el género y la especie a la que pertenece el agente en cuestión.

2.9.2 Diagnóstico indirecto

Para el diagnóstico indirecto se han evaluado varias técnicas que son capaces de detectar la presencia de anticuerpos, entre las que se pueden mencionar: fijación del complemento (FC), aglutinación en placa (Card Test, CT), inmunofluorescencia indirecta (IFI), enzimoimmunoensayo competitivo (C-ELISA), enzimoimmunoensayo indirecto (I-ELISA) y enzimoimmunoensayo puntual (DOT-ELISA) entre otras. Por lo general, excepto con los animales que han sido tratados o se encuentran en una fase incipiente de la infección (< 14 días), las pruebas serológicas preferidas para identificar animales infectados son el C-ELISA o el CT (OIE, 2008).

La técnica de C-ELISA que se usa actualmente en bovinos se desarrolló para la detección específica de anticuerpos anti-MSP5 de *Anaplasma* spp. (Knowles *et al.*, 1996; Torioni de Echaide *et al.*, 1998). Esta se basa en una proteína principal de superficie (MSP5) de 19 kDa, altamente conservada en las distintas especies de *Anaplasma* que es reconocida por el anticuerpo monoclonal (AcM) AnaF16C1 (Vissner *et al.*, 1992). Fue validada en animales persistentemente infectados en forma natural de una región endémica utilizando como prueba confirmatoria para los verdaderos positivos y negativos una PCR anidada (n-PCR), en donde para un punto de corte de 28% de inhibición (28% I) se obtuvo una sensibilidad de 96% y una especificidad de 95% (Torioni de Echaide *et al.*, 1998).

La prueba CT, fue desarrollada por Amerault y Roby (1968) y posteriormente se modificó con la adición de suero normal bovino, produciendo mejores resultados y logrando una concordancia del 97% con la prueba de FC (Amarault *et al.*, 1972). La ventaja del CT es que es una técnica sensible, que se puede realizar en el laboratorio proporcionando resultados en pocos minutos, pero algunas reacciones inespecíficas y la subjetividad de su interpretación pueden ser un problema. Además, el antígeno para CT, es difícil de preparar y puede variar entre lotes y de un laboratorio a otro (OIE, 2008).

Comparando las pruebas, el C-ELISA logró ser más específico que el CT y este último produjo mayores resultados sospechosos que el C-ELISA, trabajando con sueros bovinos de una zona libre y de una zona endémica. La mayor concordancia posible entre las dos pruebas fue de 91,5% y se logró usando un punto de corte en el C-ELISA de 10% I (Molloy *et al.*, 1999). C-ELISA es considerada como una alternativa útil y excelente para estudios epidemiológicos, programas de erradicación y regulación internacional de movimiento de ganado por la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE) (Torioni de Echaide *et al.*, 1998; Molloy *et al.*, 1999).

2.10 Control y prevención

Las medidas de control contra la anaplasmosis no han cambiado notablemente en los últimos 60 años. Varían con la localización geográfica e incluyen el control de artrópodos mediante la aplicación de acaricidas, la administración profiláctica de antibióticos y la vacunación preventiva (Kocan *et al.*, 2010).

2.10.1 Control de artrópodos

El control de artrópodos mediante la eliminación de garrapatas y moscas, es una labor intensiva y costosa. La contaminación ambiental se está convirtiendo en una cuestión relevante y la aplicación repetida de acaricidas puede dar como resultado poblaciones de garrapatas y moscas resistentes (Kocan *et al.*, 2000). Este método no es práctico en muchos aspectos y sólo puede controlar parcialmente la transmisión de *A. marginale*, ya que a menudo la enfermedad se produce por transmisión mecánica de sangre infectada a través de fómites cuando no se toman las medidas adecuadas de higiene (Kocan *et al.*, 2010).

Intentar prevenir la enfermedad controlando los transmisores es considerado utópico, ya que éstos no están definidos con certeza. Sin embargo aminorar los efectos perniciosos de dípteros como tábanos, mosquitos y mosca brava, deriva en beneficio para el rebaño pero su efecto sobre la transmisión horizontal de *A. marginale* es incierto (Guglielmone, 1994).

2.10.2 Quimioprofilaxis

La quimioprofilaxis de la anaplasmosis está basada en la administración continua o repetida de fármacos quimioterapéuticos para el control de las parasitemias en bovinos naturalmente infectados (Potgieter y Stoltsz, 2004). El objetivo es la prevención de la anaplasmosis clínica, pero no impide que el ganado se convierta en portador de la enfermedad (Kocan *et al.*, 2000).

La administración de tetraciclinas como procedimiento preventivo se ha efectuado mediante inyecciones o por vía oral a través de piensos medicamentosos en algunas zonas de Estados Unidos, pero rara vez en otras zonas del mundo. Si bien el

método puede utilizarse, es costoso y lleva al riesgo de desarrollar cepas resistentes, aunque esto no ha sido reportado hasta la fecha (Kocan *et al.*, 2000).

2.10.3 Vacunación

La vacunación ha sido una forma económica y eficaz para el control mundial de la anaplasmosis en la especie bovina (Kocan *et al.*, 2003) y la mayor parte de los programas de control en las áreas de enzootia se basa en el incremento de la resistencia de los animales mediante la misma (Radostits *et al.*, 2002).

Las vacunas para el control de la enfermedad se pueden dividir en dos grandes grupos: vacunas vivas y vacunas muertas. Ambos tipos inducen inmunidad protectora que reduce o previene la enfermedad clínica, pero no previenen que el ganado se transforme en portador y sirva como reservorio de la infección (Kocan *et al.*, 2003).

Es importante remarcar que distintos aislamientos geográficos de *A. marginale* a menudo no dan una buena protección cruzada entre sí, por lo que el uso de vacunas puede estar restringido a una determinada región geográfica (Kuttler *et al.*, 1984b). Así que probablemente la gran diversidad genética de *Anaplasma* spp. influya en el desarrollo de una vacuna efectiva para diferentes aislamientos geográficos (De la Fuente *et al.*, 2005).

2.10.3.1 Vacunas inactivadas

La utilización de vacunas vivas a base de *A. centrale* no está permitida en los Estados Unidos por ser exótico. Esta prohibición llevó a los investigadores a realizar ingentes esfuerzos para desarrollar vacunas utilizando *A. marginale* inactivado y hacia fines de los '60 una vacuna a base de *A. marginale* atenuado la cual sólo fue utilizada en

California (Aubry y Geale, 2011; Brown, 2012). A partir de la década de 1960 se desarrollaron y comercializaron hasta 1999 vacunas muertas a base de *A. marginale* (Kocan *et al.*, 2003; Kocan *et al.*, 2010), si bien en la actualidad hay una vacuna aprobada por el USDA (United States Department of Agriculture) para uso experimental que se distribuye en 14 estados (Luther, 2007).

La vacuna muerta fue la única herramienta para la prevención de la anaplasmosis clínica en el centro-sur de los Estados Unidos, y aparentemente proporcionaba una adecuada inmunidad (Kocan *et al.*, 2000), sin embargo, como esta vacuna estaba contaminada con las membranas celulares de eritrocitos bovinos, producía isoeritrolisis neonatal en algunos terneros luego de la ingestión de calostro de madres inmunizadas (Kocan *et al.*, 2000). Este inconveniente se podía reducir vacunando sólo a las vacas no gestantes y evitando las revacunaciones (Radostits *et al.*, 2002).

Las vacunas muertas tienen ventajas sobre las vivas, por su bajo riesgo de contaminación con agentes infecciosos no deseados, se pueden almacenar a bajo costo y causan mínimas reacciones después de la aplicación. Aunque presentan las desventajas de la necesidad de refuerzos anuales, un alto costo de purificación y falta de protección cruzada entre cepas de áreas geográficas distantes. Además la inmunidad protectora conferida por las vacunas muertas es generalmente menor que la de las vacunas vivas (Kocan *et al.*, 2010), razón por la cual posiblemente no se expandió su uso a otros países de América y no se encuentran avaladas por la OIE.

2.10.3.2 Vacunas vivas

La vacuna con mayor difusión es la que contiene *A. centrale*, rickettsia de menor patogenicidad para el bovino que el *A. marginale* pero con la capacidad de producir una inmunidad parcial contra éste (Guglielmone, 1994; OIE, 2012). Dicha vacuna se prepara a partir de sangre de terneros donantes esplenectomizados inoculados para tal fin y causa una enfermedad leve o poco aparente, aunque en algunos animales puede producir reacciones graves. La vacunación con *A. centrale* reduce la gravedad de la reacción cuando los animales se infectan con cepas silvestres, pero no aporta una protección absoluta (Radostits *et al*, 2002).

Este tipo de vacunas con *A. centrale* se utiliza en varias zonas del mundo, incluyendo África, Australia, Israel y algunos países de America Latina (Kocan *et al.*, 2010; Aubry y Geale, 2011).

Otro tipo de vacunas que estuvieron presentes en el mercado argentino, corresponden a aquellas vacunas vivas que contienen *A. marginale* supuestamente atenuados en su patogenicidad (Guglielmone, 1994). Estas cepas atenuadas por irradiación o por el paso sucesivo del microorganismo en otros huéspedes, como oveja o ciervos, han sido consideradas para su uso, pero la protección proporcionada por las mismas es en general poco fiable (Kocan *et al.*, 2010). Trabajos experimentales hechos en Argentina demostraron que el uso de cepas atenuadas de *A. marginale* pueden producir reacciones que no difieren de las producidas por cepas silvestres (Anziani *et al.*, 1981), por lo que existen dudas de que se comporten como tales en forma homogénea y predecible (Guglielmone, 1994).

2.11 Recomendaciones para la importación de ganado bovino a países libres

El código sanitario para los animales terrestres (11.1.2), presenta las recomendaciones para países libres de la enfermedad que realicen importaciones de bovinos procedentes de países considerados infectados de anaplasmosis, especificando que los animales no presenten signos clínicos al momento del embarque, que hayan nacido y permanecido en una zona libre de anaplasmosis durante los últimos dos años con una prueba diagnóstica negativa 30 días previos al embarque y se encuentren libres de garrapatas al momento del embarque (OIE, 2010).

2.12 Tratamiento

La terapéutica en el ganado bovino requiere de un tratamiento específico, que se basa en la supresión o eliminación del parásito, y uno de soporte para sustentar la recuperación del animal (Potgieter y Stoltsz, 2004).

Los fármacos más utilizados para el tratamiento de la anaplasmosis son las tetraciclinas y el imidocarbo. Anteriormente también se utilizaba la gloxazona, pero por ser excesivamente tóxica para las vacas en lactancia ya no se utiliza (FAO, 1988).

La dosis habitual indicada de oxitetraciclina para casos clínicos en condiciones de campo es de 10-15 mg/kg cuando se utilizan fórmulas al 5-10% o una dosis de 20 mg/kg si se utilizan formulaciones de acción prolongada (LA) (SENASA, 2006).

En el caso del dipropionato de imidocarbo, las dosis indicadas para el tratamiento de la enfermedad son de 2,5 a 3,5 mg/kg. En Argentina se comercializa en solución al 12% y se indica una dosis de 3 mg/kg (SENASA, 2006).

A pesar de que muchos estudios han tratado de evaluar la eficacia de diferentes drogas, principalmente las tetraciclinas para eliminar el estado de portador se han encontrado resultados contradictorios (Aubry y Geale, 2011).

Cuando se transfieren animales de zonas endémicas a libres de la enfermedad, la OIE recomienda esterilizar portadores mediante la aplicación de oxitetraciclinas en dosis de 22 mg/kg, durante 5 días consecutivos, sin embargo este tratamiento no resultó eficaz en infecciones experimentales con una cepa de *A. marginale* aislada en Oklahoma (Coetzee *et al.*, 2005).

También se utiliza como tratamiento esterilizante las oxitetraciclinas LA en 3 dosis de 20 mg/kg cada 3-4 días (SENASA, 2006), o con una semana de intervalo entre cada una, lo cual suele ser eficaz en la mayoría de los casos (Anziani y Abdala, 1986; Vanzini y Ramírez, 1994b; Torioni y Echaide, 2003), pero no es un tratamiento fiable para eliminar las infecciones persistentes en todo el ganado (Coetzee *et al.*, 2006a).

En tratamientos a largo plazo para eliminación de portadores se usaba la clortetraciclina, para cuyo fin la recomendación general era de 2,2 mg/kg durante 60 días o 1,1 mg/kg durante 90 días por vía oral (FAO, 1988). Un trabajo posterior en ganado alimentado con clortetraciclina en dosis de 4,4 mg/kg, 11 mg/kg y 22 mg/kg día, en el cual se midieron las concentraciones plasmáticas de la droga, fue eficaz para esterilizar animales infectados con una cepa de *A. marginale* aislada en Virginia, dando negativo a RT-PCR a los 49 días de comenzado el tratamiento, corroborándose la esterilización por subinoculación en novillos esplenectomizados y mencionándose como importante para futuras estrategias de libre comercio entre países y regiones con contraste de endemicidad (Reinbold *et al.*, 2010).

Existen restricciones en el uso de las oxitetraciclinas en bovinos para carne, los cuales no deben faenarse para consumo humano hasta transcurridos 10 días si son tratados con soluciones al 5%, 14 días con soluciones al 15% y 28 días si se utiliza una LA. En leche las restricciones al consumo son 3 días posteriores al tratamiento en soluciones al 5% y 5 días para soluciones al 10% (SENASA, 2006).

Para eliminar el estado de portador con dipropionato de imidocarbo, Radostits *et al.* (2002) sugiere utilizar 2 dosis de 5 mg/kg de peso corporal con un intervalo de 14 días.

Otra de las drogas probada en el tratamiento de la anaplasmosis bovina es la enrofloxacin, que ha sido eficaz utilizando 2 dosis de 10 mg/kg cada 24 hs en animales infectados con una cepa Argentina de *A. marginale* (Guglielmone *et al.*, 1996). También ha sido efectivo el tratamiento con 2 dosis de 12,5 mg/kg de enrofloxacin cada 48 hs en terneros esplenectomizados que presentaban un 25% de parasitemia, pero este no elimina la infección persistente de los mismos (Coetzee y Apley, 2006).

Otros estudios en el cual se compararon tratamientos con oxitetraciclina, imidocarbo y enrofloxacin en cultivos de eritrocitos infectados con aislamientos de Virginia y Oklahoma, indican que la dosis de 1,0 µg/ml de imidocarbo en los dos aislamientos y 4,0 µg/ml de enrofloxacin en el de Oklahoma durante 7 días fueron esterilizantes, siendo la oxitetraciclina el antimicrobiano menos eficaz en ambos casos (Coetzee *et al.*, 2006b; Coetzee *et al.*, 2009).

El tratamiento de apoyo con carditónicos, antihistamínicos, soluciones parenterales, vitamínicos y minerales es importante para la recuperación del animal y generalmente se realizan en el momento de la administración de la medicación específica sobre todo cuando se trabaja con bovinos para carne en condiciones

extensivas (SENASA, 2006). Las transfusiones de sangre también están indicadas como tratamiento de soporte en los animales con un hematocrito menor al 15% (Radostits *et al.*, 2002), pero no es de aplicación masiva (Potgieter y Stoltsz, 2004).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Con el propósito de determinar transmisión vertical por vía transplacentaria de *A. marginale* se realizaron estudios en hembras bovinas procedentes de dos ecorregiones de la provincia de Corrientes y de la ecorregión Chaco húmedo del noreste argentino donde la anaplasmosis es endémica.

3.1 Ecorregiones de la provincia de Corrientes

3.1.1 Ecorregión del Espinal: comprende las subregiones de afloramientos rocosos y montes de ñandubay que incluye a los departamentos Mercedes, Curuzú Cuatiá y Monte Caseros. El paisaje predominante es de llanura plana a suavemente ondulada ocupada por bosques bajos, sabanas y pastizales hoy convertidos en gran parte a la agricultura.

En relación a la presencia de garrapatas (*R. microplus*) según el SENASA, en esta región coexisten un área indemne, conformada por establecimientos libres de garrapata e interdictos por reinfestación y una área de erradicación obligatoria, de acuerdo a las normativas vigentes del plan nacional de control de la garrapata. Los bovinos estudiados de esta ecorregión se faenaron en el frigorífico Mercedes.

3.1.2 Ecorregión de Campos y Malezales: comprende las subregiones campos de malezal y lomadas lateríticas que incluye a los departamentos Gral. Alvear, Santo Tomé e Ituzaingó. Esta ecorregión se caracteriza por ser una planicie sedimentaria con escurrimientos lentos sin cauces definidos y presencia de bañados que desaguan en los ríos Miriñay, Aguapey o directamente en el Uruguay. El control de la garrapata no es obligatorio, sin embargo la población de garrapatas tiene amplias variaciones en función

de la magnitud de las precipitaciones. Los bovinos analizados de esta ecorregión se faenaron en el frigorífico de Gdor. Virasoro.

3.1.3 Muestras

Se obtuvieron 731 muestras de sangre de hembras bovinas, de las cuales 347 se extrajeron en el frigorífico Mercedes y 384 en el de Gdor. Virasoro. Además, se tomaron en paralelo muestras de sangre y líquido amniótico de las hembras preñadas y sangre de sus respectivos fetos.

3.1.4 Edad de gestación del feto

Para determinar la edad de gestación se utilizó la longitud occipito-coccígea de los fetos, fijándose en 55 cm el límite para diferenciar el segundo tercio de gestación del tercero (Roberts, 1979) (Tabla 10).

3.1.5 Estudio epidemiológico

Mediante un estudio transversal se evaluó la proporción de hembras positivas a anaplasmosis ingresadas a cada frigorífico. Un número de muestras (n =322) de suero bovinos se calculó en cada frigorífico para una prevalencia esperada del 70% (Guglielmone, 1994) con un 5% de error y 95% de confianza. Los datos se analizaron con el programa Infostat®.

3.2 Ecorregión del Chaco Húmedo

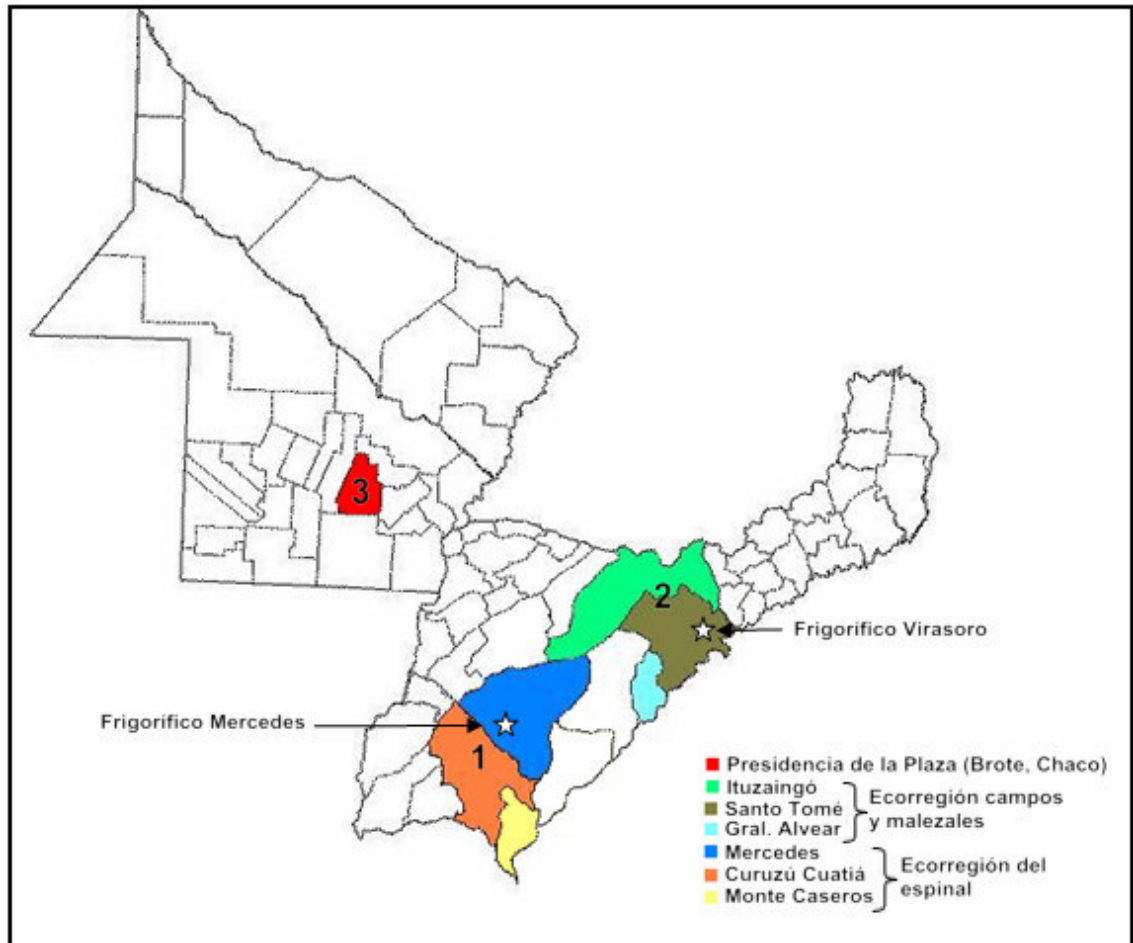
El paisaje es un mosaico de franjas de tierras altas, bien drenadas, con bosques acompañando el curso de los ríos y alternando con interfluvios bajos de estero y cañadas con fisonomía de pastizal, sabana y pajonal.

El estudio se realizó en un establecimiento ubicado en el departamento de Presidencia de la Plaza en la provincia de Chaco (figura 7), donde se produjo un brote de anaplasmosis en un lote de 63 vacas preñadas que se encontraban en el segundo tercio de la gestación determinado por ecografía. El diagnóstico se realizó en la E.E.A INTA Mercedes, Corrientes, mediante extendidos de sangre teñidos con Giemsa. El lote completo fue tratado con oxitetraciclinas y sólo 32 hembras lograron completar la gestación.

3.2.1 Muestras

Se obtuvieron muestras de sangre de las 32 vacas que completaron la gestación y de sus crías dentro de los primeros 6 días post-parto. Debido a que la mayoría de los terneros ya había ingerido calostro al momento de tomar las muestras de sangre, la transmisión transplacentaria en estos animales fue evaluada solamente por técnicas moleculares.

Figura 7: Localización geográfica de los departamentos de donde provinieron las muestras



1-■-■-■- Procedencia de bovinos faenados en frigorífico Mercedes, 2-■-■-■- Procedencia de bovinos faenados en frigorífico Gdor. Virasoro, 3-■- Rodeo bovino donde se registró el brote de anaplasmosis.

3.3 Muestras de Sangre:

Las muestras de sangre de las vacas y terneros se obtuvieron por punción de la vena yugular y la de los fetos por punción cardíaca. Se utilizaron agujas y jeringas estériles, descartables.

3.3.1 Sangre con anticoagulante: La sangre entera se depositó en tubos con tapa rosca de 15 ml conteniendo 1 ml 0,013 M de citrato de sodio al 3,8% y una vez homogeneizada una parte se mantuvo a 4–8°C por un máximo de 4 días hasta ser inoculada en terneros esplenectomizados y la otra se conservó a –20°C hasta su procesamiento mediante PCR.

3.3.2 Sangre sin anticoagulante: Se depositó en tubos de vidrio de 10 ml los cuales después de formados los coágulos se centrifugaron a 1000 rpm durante 15 min para la obtención de sus sueros, los que se acondicionaron en microviales y se conservaron a -20°C hasta su procesamiento mediante las técnicas de CT y C-ELISA.

3.4 Terneros esplenectomizados

Se utilizaron 24 terneros nacidos y criados en zona libre de anaplasmosis. Adicionalmente, previo a la esplenectomía se les realizó un análisis serológico (C-ELISA) para verificar la seronegatividad a la enfermedad.

El protocolo anestésico consistió en sedación y analgesia de los animales con una dosis de xilasina al 2% de 1 ml/100 kg de peso vivo, seguido de una anestesia local infiltrativa aplicando la técnica de Farquharson, que consiste en bloquear los nervios torácico 13 y lumbares 1, 2 y 3 con una dosis de 80 ml de lidocaína al 2%, la cual está indicada para laparotomías altas, medias y bajas (Garnero y Perusia, 2002).

Para la esplenectomía de los animales se utilizó el procedimiento descrito en el capítulo 10 del Manual Práctico de Campo de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (FAO, 1984).

3.5 Reproducción de anaplasmosis

3.5.1 Subinoculación con sangre de fetos

En cada visita a frigorífico se realizaron muestreos durante 3 días consecutivos. De cada feto se obtuvo 5 a 10 ml de sangre en forma aséptica la cual se mantuvo a 4–8°C. Posteriormente, con el volumen individual obtenido se prepararon muestras grupales (pools) de 2 a 12 animales (dependiendo del número muestreado en cada visita) y luego se inoculó por vía endovenosa en terneros esplenectomizados con el fin de reproducir la enfermedad. El tiempo transcurrido entre la obtención de la muestra y la inoculación del ternero esplenectomizado varió entre 1 a 4 días. Los terneros esplenectomizados inoculados se mantuvieron bajo vigilancia durante 90 días.

3.5.2 Subinoculación con sangre de terneros

De cada uno de los terneros nacidos de las vacas preñadas del lote donde ocurrió el brote de anaplasmosis se extrajeron 10 ml de sangre con anticoagulante. Las muestras se mantuvieron refrigeradas a 4–8°C durante 1 a 2 días y se formaron pools de 2 a 6 animales (dependiendo de los terneros nacidos por semana) que se inocularon por vía endovenosa en terneros esplenectomizados, los que se mantuvieron bajo vigilancia durante 90 días.

3.5.3 Subinoculación experimental de *Anaplasma marginale* en terneros

Con el propósito de determinar el tiempo transcurrido entre la inoculación y la primera detección de *A. marginale* por PCR, se inocularon por vía subcutánea dos terneros (1 normal y otro esplenectomizado) con una cepa de *A. marginale* en dosis de 10^6 eritrocitos infectados. La sangre infectada, proveniente de una multiplicación experimental, estuvo conservada una semana a 4–8°C hasta el momento de su inoculación. A los terneros inoculados se les extrajo muestras de sangre entera con citrato de sodio 0,013 M al 3,8% durante 10 días consecutivos. Las muestras se conservaron a –20°C hasta su procesamiento.

3.6 Técnicas serológicas para la detección de anticuerpos de *Anaplasma* spp.

3.6.1 Card Test modificado (CT)

La prueba de aglutinación rápida en tarjeta descrita por Amerault y Roby (1968) fue utilizada para demostrar la presencia de anticuerpos contra *Anaplasma* en el suero sanguíneo de todos los animales del experimento con algunas modificaciones (Echaide *et al.*, 1989).

La prueba consiste en una reacción de conglutinación donde actúan el complemento y la conglutinina para que se produzca una aglutinación visible entre el antígeno y el anticuerpo. Brevemente, sobre una placa de vidrio se deposita por separado, 15 µl de antígeno, 30 µl de suero a analizar y 30 µl de suero factor bovino como fuente de complemento y conglutinina. Se homogeiniza con un mezclador, se incuba en cámara húmeda a 25–26°C en agitación continua a 100–110 rpm durante 4 min y se observa en un aglutinoscopio (IICA, 1989). En cada placa se incluyen sueros

controles positivo y negativo. Se consideró positivo cuando se observaron grumos francamente visibles inmediatamente de concluida la incubación.

3.6.2 Enzimoimmunoensayo de competición (C-ELISA)

La prueba se realizó según la técnica descrita por Torioni de Echaide *et al.* (1998), basada en la proteína principal de superficie 5 (*Major Surface Protein*, MSP5) de *A. marginale*, obtenida por recombinación genética (rMSP5). Para revelar la reacción antígeno-anticuerpo se utilizó el anticuerpo monoclonal (AcM) AnaF16C1 específico para un epítopo de la rMSP5, conjugado con peroxidasa (AnaF16C1-Peroxidasa) y H₂O₂-ABTS (2,2-Azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) como sustrato-cromógeno. El principio de la prueba se basa en poner en contacto el antígeno y el suero bovino de modo que en presencia de anticuerpos específicos para *Anaplasma* spp. se produzca la unión rMSP5-anticuerpos policlonales. Al agregar luego el anticuerpo monoclonal conjugado (AnaF16C1-Peroxidasa) no encontrará su epítopo libre y será eliminado con los lavados sucesivos, lo que se traducirá en una falta de desarrollo de color.

La lectura se realizó en un lector de ELISA (Labsystem Multiskan RC) utilizando un filtro de 405 nm. Los resultados obtenidos en densidad óptica (DO) se expresaron en porcentaje de inhibición (%I), en relación al control de conjugado (CC) que mide el grado de unión máximo entre el Ac monoclonal-peroxidasa y la proteína rMSP5, que en presencia del sustrato representa el 100% de desarrollo de color, sin inhibición alguna (0% I). El CC constituye el valor de referencia del %I para los sueros problema, según la siguiente fórmula:

$$\%I = (100 - DO \text{ suero problema}) \times 100 \div DO \text{ CC.}$$

El límite entre negativo y positivo se estableció en ≥ 28 %I.

Se utilizaron placas PolySorp (Nunc475094) fondo plano de 96 pocillos, en las que se adsorbió 1 μg de antígeno (rMSP5-MBP) en 100 μl de buffer carbonato-bicarbonato 0,05 M (pH 9,6). Las placas se mantuvieron 12 hs a 25°C y luego se conservaron a -20°C. Para realizar la prueba las placas se descongelaron a 37°C durante 40 min y se bloquearon con PBS 0,5 M con 4% de leche descremada en polvo durante 40 min. Se realizaron 4 lavados con 200 μl de PBS 0,01 M y 0,05% tween-20. Luego se agregaron 50 μl de cada suero y 50 μl de PBS 0,01 M-EDTA/EGTA 0,0075 M con 4% de leche descremada, y se incubaron en agitación a 28°C durante 40 min. Las placas se lavaron como se describió anteriormente, se agregaron 100 μl de conjugado (AnaF16C1-Peroxidasa) y se incubaron 40 min a 28°C. Después de 3 lavados se agregaron 100 μl de sustrato-cromógeno (H_2O_2 - ABTS) en buffer citrato 0,05 M (pH=4,5) y las placas se incubaron a 28°C en agitación. A los 4 minutos se realizó la primera lectura, en un sistema dinámico en donde la lectura real es realizada automáticamente cuando el CC alcanza una $\text{DO}=1,00 \pm 20\%$ con el programa SPEIA 1.03[®] (Walter Kelly, Agriculture Canada, 1991-98).

Como controles se utilizaron sueros de referencia de la FAO, un control positivo fuerte (C++) y un control negativo (C-), además se evaluó un control positivo débil (C+) obtenido de un bovino inoculado con *A. centrale* y el CC mencionado anteriormente.

3.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

3.7.1 Extracción de ADN mediante el método de fenol-cloroformo

Se extrajo ADN de las muestras de sangre completa. A tal fin 800 μl de sangre se colocaron en tubos Eppendorf y se homogeneizaron con 1000 μl de buffer lisis para

glóbulos rojos, se mezclaron e incubaron 10 min a temperatura ambiente y se centrifugaron por 15 min a 10.000 rpm. Se removió el sobrenadante cuidadosamente con una pipeta dejando el sedimento. Se agregaron 1000 µl de agua destilada para lavar el sedimento y se centrifugaron nuevamente a 10.000 rpm por 10 min. El lavado se repitió hasta obtener el sobrenadante transparente. El sedimento se mezcló con 400 µl de buffer lisis celular y 8 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó 2 horas a 60°C. Las muestras se refrigeraron 5-10 min y se mezclaron con 200 µl de CLNa 5 M, y 1 volumen (400 µl) de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Luego de una vigorosa agitación y centrifugación a 14.000 rpm a 4-8°C por 10-15 min, se tomó cada sobrenadante y se mezcló con 400 µl de isopropanol. Después de precipitar el ADN se centrifugó a 14.000 rpm por 2 min. El sedimento se lavó con 400 µl de etanol 75% y se centrifugó a 14.000 rpm por 2 min. Una vez seco el ADN se resuspendió en 100 µl de agua destilada.

3.7.2 PCR *msp5*

Para la amplificación de gen *msp5* que codifica la proteína MSP-5 se utilizaron los siguientes oligonucleótidos iniciadores (primers): *msp5* INT FOR 5'-TACACGTGCCCTACCGACTTA-3' y *msp5* EXT REV 5'-TCCTCGCCTTGCCCCTCAGA-3' (Torioni de Echaide *et al.*, 1998). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl. La composición de la mezcla para cada muestra fue la siguiente: 10 µl buffer 5x (Promega), 2 µl dNTPs (10 mM, Promega), 0,5 µl de cada primer (20pmol/µl), 0,125 µl Taq Polimerasa (5U/µl, Promega), 11,875 µl de agua libre de DNAsas y RNAsas y 5 µl de la muestra de ADN. La amplificación se realizó en un termociclador MyCycler Thermal cycler (BioRad) con el siguiente

protocolo de ciclado: 3 min a 94°C, 35 ciclos de 40 seg a 94°C, 40 seg a 58°C y 40 seg a 72°C, seguido por la extensión final de 10 min a 72°C.

Se utilizaron como templados controles positivos de *A. marginale*, S1A (aislada en Salta y experimentalmente multiplicada en bovinos), controles negativos (*B. bigemina* S3P, *B. bovis* M2P) y control de reactivos (agua destilada libre de DNAsas y RNAsas). Luego de finalizada la amplificación las muestras fueron sujetas a electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñidas con bromuro de etidio (Promega) y visualizadas con luz UV.

3.7.3 PCR en tiempo real (RT-PCR)

A diferencia de la PCR común, el producto de la PCR puede observarse a medida que se produce la amplificación del ADN. El producto es medido a través de la temperatura de disociación (Temperatura de melting “Tm”) y de la emisión de fluorescencia, y no por tamaño molecular por lo que no requiere análisis por electroforesis.

Esta técnica hace una detección y medición de los productos generados en cada ciclo de la PCR que son directamente proporcionales a la cantidad de moldes de ADN disponibles antes del inicio y se basa en la detección de la señal de fluorescencia emitida durante cada ciclo en la fase exponencial de la reacción (Ginzinger, 2002).

Con el propósito de obtener una mayor sensibilidad se realizó una RT-PCR semianidada (sn-RT-PCR) a partir de los amplicones obtenidos en la PCR convencional.

La reacción fue llevada a cabo en un volumen final de 10 µl, en un termociclador Rotor Gene Q (Qiagen®) 5-Plex HRM. Se utilizaron reactivos comerciales (Byodynamics®), que contienen concentraciones optimizadas de Taq

polimerasa, DNTPs y el fluorocromo Eva green en un buffer de PCR. La mezcla para cada reacción incluyó 5 µl de la mezcla real, 0,5 µl de cada primer (0,002 nM) y 2 µl de ADN y agua destilada libre de DNAsas y RNAsas. El termociclador se programó según se describió para la PCR convencional y se utilizaron los mismos primers. Se analizó la fluorescencia emitida (%) y la temperatura de disociación (T_m) de los productos amplificados, en relación con las muestras de referencia analizadas en paralelo.

Interpretación de los resultados: arbitrariamente y en relación a los controles positivos y negativos se tomó una fluorescencia $\geq 20\%$ y una T_m igual a la generada por la cepa de referencia $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, como específica para *Anaplasma* spp.

3.7.4 Tipificación molecular de *A. marginale*

La genotipificación se realizó a través del gen *msp1a* específico para *A. marginale* con el fin de conocer los genotipos en las vacas positivas y en sus fetos o en sus terneros para establecer posibles asociaciones de valor epidemiológico.

La bibliografía describe el uso del gen *msp1 α* para la caracterización genotípica de diferentes aislamientos de *A. marginale* (De la Fuente *et al.*, 2007). En este trabajo para la caracterización del gen *msp1 α* , se utilizaron primers diseñados por el grupo de hemoparásitos del Instituto de Biotecnología de INTA Castelar (2007). Este gen de 650 pb a 1100 pb codifica para el polipéptido MSP1a que junto con el polipéptido MSP1b conforman el heterodímero denominado proteína principal de superficie o MSP1 (del inglés, *Major Surface Protein*). La estructura útil para discriminar entre aislamientos se encuentra en la región amino terminal de la proteína y esta constituida por secuencias de 28 a 31 aminoácidos que se repiten en *tandem* de 1 a 10 veces. En función de esta característica y debido a la fuerte presión de selección ejercida por el sistema

inmunitario del hospedador, es que esta proteína resulta en un valioso marcador de diversidad genotípica de *A. marginale*.

3.7.5 Amplificación del gen *msp1a*

Para cada reacción se utilizaron: 5 µl Buffer 10x (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl, Invitrogen®), 4 µl de dNTPs (10 mM, Promega), 3 µl de Cl₂Mg (50 mM, Invitrogen), 1 µl de cada primer (20 pmol/µl) MSP1a1 5'-ACCTCCGAGTAGTCTACCTTCGTT-3', MSP1a2 5'-TGCATAAGCACGAGTCGTATGGAG-5', 0,250 µl de Taq polimerasa (5U/µl, Promega), 31,75 µl de agua libre de DNAsas y RNAsas, y 5 µl de la muestra de ADN siendo el volumen final de reacción de 50 µl.

La amplificación de los productos de PCR se llevó a cabo en un termociclador MyCycler Thermal cycler (BioRad) con el siguiente protocolo de ciclado: 3 min a 94°C, 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 45 seg a 55°C y 1 min a 72°C seguido por una extensión final de 10 min a 72°C.

En algunos casos, a fin de aumentar la sensibilidad de la PCR, se realizó una PCR semianidada (sn-PCR), basado en una segunda PCR a partir de los amplicones obtenidos en la primera prueba y manteniendo las mismas condiciones físico-químicas, partiendo de 2 µl de cada amplicon y usando el primer MSP1a1 y un nuevo reverso MSP1a9 rev 5'-(CTCCCTGAGCAGCATAGACC-3'). Los productos de la sn-PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 1% y visualizados mediante la tinción con 0,025 M bromuro de etidio.

3.7.6 Clonado

Los fragmentos de interés amplificados mediante PCR se clonaron utilizando el plásmido pTOPO2 del sistema TOPO TA *Cloning* (Invitrogen®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron los clones luego de la transformación de *E. coli* DH5 α competentes utilizando el protocolo de transformación química descrito en el manual del sistema, según protocolos estándar (Ausubel *et al.*, 1994). De cada clon bacteriano se purificaron los plásmidos conteniendo la secuencia de interés utilizando el sistema de purificación de PROMEGA (Pure Yield™ Plasmid Miniprep System). Para determinar la secuencia nucleotídica del fragmento de PCR y deducir la porción de proteína codificante conteniendo la región repetitiva, cada uno de los plásmidos fue secuenciado (Unidad de Secuenciación, Instituto de Biotecnología, INTA). Las secuencias se analizaron con el programa Vector NTI (Vector NTI® Software).

3.7.7 Secuenciación de *msp1 α*

Las muestras positivas para *msp1 α* fueron secuenciadas utilizando el Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (ABI PRISM) en un secuenciador Applied Biosystem 373A en el Ibiotec-Servicio Interno de Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología, INTA Castelar. Las secuencias obtenidas fueron procesadas utilizando el software STADEN package (Source Forge Project).

Los genotipos fueron definidos según el número de bloques y la secuencia de los mismos en la región amino terminal de la proteína.

3.8 Análisis estadístico

La unidad de análisis fue el animal muestreado, la variable dependiente es dicotómica (serología positiva o negativa a anaplasmosis) y los factores de riesgo el frigorífico donde fueron faenados, asumiéndose éste como indicativo de origen geográfico y el estado fisiológico en relación a estado de gestación preñada o vacía.

El análisis estadístico inicial se efectuó mediante el test de Chi-cuadrado, odds ratio e intervalo de confianza exacto del 95% utilizando el programa Infostat®.

Para cuantificar el riesgo asociado a positividad por ELISA, se efectuó el análisis en dos etapas. En la primera, ambas variables independientes o factores de riesgo (Localización geográfica y Estado de gestación) fueron comparadas con la variable dependiente (positividad por ELISA) por medio de χ^2 . En la segunda, se efectuó una regresión logística con el diagnóstico de anaplasmosis (positivo/negativo) como variable dependiente. El método de estimación fue el de las probabilidades máximas (“maximum likelihood”) con un criterio de convergencia de 0,01 para un máximo de 10 interacciones. Sólo las variables asociadas con la variable dependiente luego del χ^2 con un $p < 0,20$ fueron ofrecidas al modelo (Hosmer y Lemeshow, 1989).

4. RESULTADOS

4.1 Detección de la enfermedad mediante técnicas serológicas

4.1.1 Ecorregión del espinal

De las 347 hembras ingresadas a frigorífico (provenientes de los departamentos Monte Caseros, Curuzú Cuatiá y Mercedes) un 30% (105 vacas) fueron positivas a CT y un 34% (117 vacas) a C-ELISA (Tabla 3).

Tabla 3: Proporción de hembras positivas *Anaplasma* por CT y C-ELISA distribuidas por departamento y estado de gestación procedentes de la ecorregión del espinal.

Departamento	Gestación	Analizados	CT Positivo		C-ELISA Positivo	
			n	%	n	%
Mercedes	Vacía	224	92	41	98	44
	Preñada	45	10	22	13	29
Curuzú Cuatiá	Vacía	47	1	2	6	13
Monte Caseros	Vacía	31	2	7	-----	-----
Totales		347	105	30	117	34

4.1.2 Ecorregión de campos y malezales

De las 384 hembras ingresadas a frigorífico (provenientes de los departamentos Santo Tomé, Ituzaingó y General Alvear) un 86% (331 vacas) fueron positivas a CT y un 73% (280 vacas) a C-ELISA (Tabla 4).

Tabla 4: Proporción de hembras positivas a *Anaplasma* por CT y C-ELISA, distribuidas por departamento y estado de gestación, procedentes de la ecorregión de campos y malezales.

Departamento	Gestación	Analizados	CT Positivo		C-ELISA Positivo	
			n	%	n	%
Santo Tomé	Vacía	210	176	84	143	68
	Preñada	110	98	89	87	79
Ituzaingó	Vacía	45	40	89	36	80
	Preñada	9	8	89	5	56
Gral. Alvear	Vacía	7	6	86	7	100
	Preñada	3	3	100	2	67
Totales		384	331	86	280	73

4.1.3 Detección de anticuerpos en Fetos

Todos los fetos muestreados en ambos frigoríficos resultaron negativos a C-ELISA (Tabla 5). Las muestras analizadas por CT mostraron una aglutinación inespecífica lo cual imposibilitó su interpretación.

Tabla 5: C-ELISA para *Anaplasma* aplicado en suero de fetos de los frigoríficos de Gdor. Virasoro y Mercedes.

Departamento	Frigorífico	Analizados	C-ELISA
			Resultado
Mercedes	Mercedes	45	N
Santo Tomé	Gdor. Virasoro	110	N
Ituzaingó		9	N
Gral. Alvear		3	N
Totales		167	

4.1.4 Brote de anaplasmosis en vacas gestantes

De las 32 hembras muestreadas que sufrieron el brote de anaplasmosis, un 62,5 % fueron positivas a CT y un 81,25% a C-ELISA. El 93,75% y 81,25% de los terneros

nacidos de estas vacas resultaron positivos a CT y C-ELISA, respectivamente (Tabla 6 y 7).

Tabla 6: Relación de los resultados a la prueba C-ELISA entre la madre y su cria.

		Vacas		
		+	-	
Terneros	+	22	4	26
	-	4	2	6
		26	6	32

Tabla 7: Relación de los resultados a la prueba CT entre la madre y su cria.

		Vacas		
		+	-	
Terneros	+	19	11	30
	-	1	1	2
		20	12	32

4.1.5 Concordancia entre las técnicas serológicas

El grado de concordancia que se observó entre las técnicas de C-ELISA y CT fue calculado sobre un n=731 ya que fue el número de muestras analizadas por las dos técnicas en paralelo. Se observó una concordancia aceptable de 78,2% entre las dos técnicas utilizadas con un *Kappa* estimado de 0,558 (Tabla 8).

Tabla 8: Concordancia entre C-ELISA y CT para la detección de *Anaplasma* spp. en muestras de suero de vacas obtenidas en dos frigoríficos en la provincia de Corrientes.

	C-ELISA						
		Positivos	%	Negativos	%	Total	%
CT	Positivos	337	46	99	14	436	60
	Negativos	60	8	235	32	295	40
	Total	397	54	334	46	731	100

4.1.6 Análisis de riesgo

Tomando en cuenta la cantidad de datos relevados se decidió evaluar mediante un estudio transversal la proporción de hembras positivas a anaplasmosis ingresadas a frigorífico, utilizando como unidad de análisis al animal muestreado, como variable dependiente la serología positiva/negativa a C-ELISA y como factores de riesgo la zona de donde provenían según el frigorífico donde se faenaron (Mercedes y Gdor. Virasoro) y el estado fisiológico en relación con el estado de gestación (preñada/vacía) (Tablas 9 y 10).

Tabla 9: Tabla de contingencia entre origen geográfico de las vacas (variable independiente) y resultado a C-ELISA para *Anaplasma* spp. (variable dependiente).

Localización geográfica	C-ELISA		
	Positivos	Negativos	Total
Gdor. Virasoro	280	104	384
Mercedes	117	230	347
Total	397	334	731

Las hipótesis planteadas fueron:

H_0 = La serología positiva a anaplasmosis es independiente de la zona de donde provienen los animales.

H_1 = La serología positiva a anaplasmosis es dependiente de la zona de donde provienen los animales.

Se observó una asociación significativa entre las dos variables con un valor de $\chi^2=112,87$ y un $p<0,0001$ por lo que es posible rechazar la hipótesis de que las variables son independientes entre si. Se obtuvo un Odds Ratio de 5,2 (IC 95% 3,75-7,17), es decir que hay 5,2 veces más probabilidades de encontrar animales positivos serológicamente a la enfermedad en la ecorregión de campos y malezales que en la ecorregión del espinal.

Tabla 10: Tabla de contingencia entre estado fisiológico de las vacas (variable independiente) y resultado a C-Elisa para *Anaplasma* spp. (variable dependiente).

Gestación	C-ELISA		
	Positivos	Negativos	Total
Preñada	107	60	167
Vacía	290	274	564
Total	397	334	731

La asociación entre el estado de gestación de las vacas y la positividad a C-Elisa también fue significativa, con un valor de $\chi^2=8,31$, un $p<0,001$ y un *Odds Ratio* de 1,68 (IC 95% 1,18-2,40).

Al existir asociación entre ambas variables independientes con la variable dependiente, se investigó la posibilidad de interacciones o confusión (Tabla 11).

Tabla 11: Regresión logística de factores de riesgo de anaplasmosis en el NEA.

VARIABLES PREDICTIVAS	B	EE	P	OR	IC 95%
Constante	-0.58	0,21	0,0053	-	-
Estado de gestación	-0,11	0,20	0,5674	0,89	0,60; 1,32
Localización geográfica	1,65	0,16	0,0001	5,18	3,75; 7,17

Deviance: 891,82, P: 0,0001. EE: error estándar, OR: odds ratio, IC: intervalo de confianza.

Al hacer la regresión logística de los factores de riesgo el estado de gestación (preñada/vacía) desaparece, debido a que el mayor porcentaje de vacas preñadas positivas se faenó en el frigorífico de Gdor. Virasoro que recibe animales procedentes de la zona de mayor prevalencia. Por lo tanto, la localización geográfica de los animales estaba actuando como un factor de confusión (Tabla 12).

Tabla 12: Tabla de contingencia entre estado fisiológico y origen geográfico de las vacas para anaplasmosis.

Gestación	Localización geográfica		
	Gdor. Virasoro	Mercedes	Total
Preñada	122	45	167
Vacía	262	302	564
Total	384	347	731

4.2 Detección de *A. marginale* mediante técnicas moleculares

4.2.1 sn-RT-PCR *msp5*

4.2.1.1 Muestras obtenidas en frigorífico

En las muestras analizadas de las vacas preñadas provenientes de los frigoríficos de Mercedes y Gdor. Virasoro, se amplificó el gen *msp5* en 132 animales (Tabla 13) con una T_m de $85,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (Figura 8) y un porcentaje de fluorescencia emitido $> 40\%$ (Figura.9).

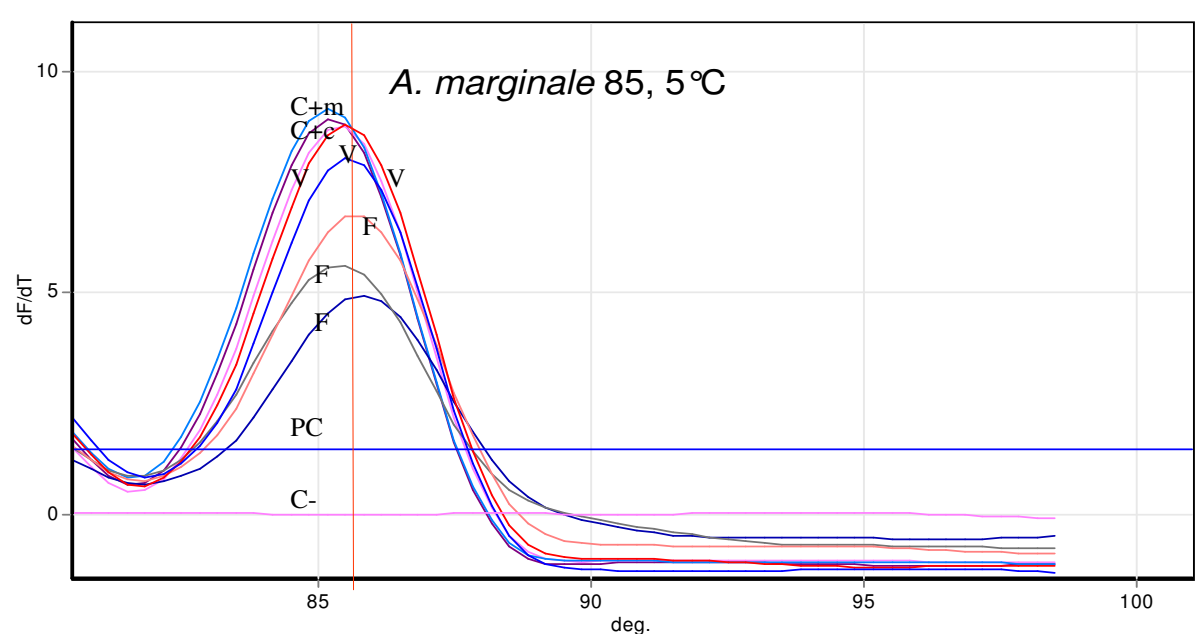
Tabla 13: Procedencia de las muestras de vacas preñadas analizadas para el diagnóstico de anaplasmosis.

Frigorífico	Vacas n	CT	C-ELISA	RT-PCR (%)
Mercedes	45	10	13	10 (2,9)
Gdor. Virasoro	122	109	94	122 (31,8)
Totales	167	119	107	132 (18,1)

En sólo 7 (5,3%) fetos del frigorífico de Gdor. Virasoro se logró amplificar un producto con la T_m esperada pero con un nivel de fluorescencia que varió entre 18 y 40% (Figuras 8 y 9). Dos de las vacas cuyos fetos resultaron positivos eran negativas en C-ELISA. Cuando se analizó el líquido amniótico, en 7 (5,3%) muestras se amplificó por sn-RT-PCR el producto esperado, pero en sus correspondientes fetos no se logró amplificar secuencia alguna (Tabla 14).

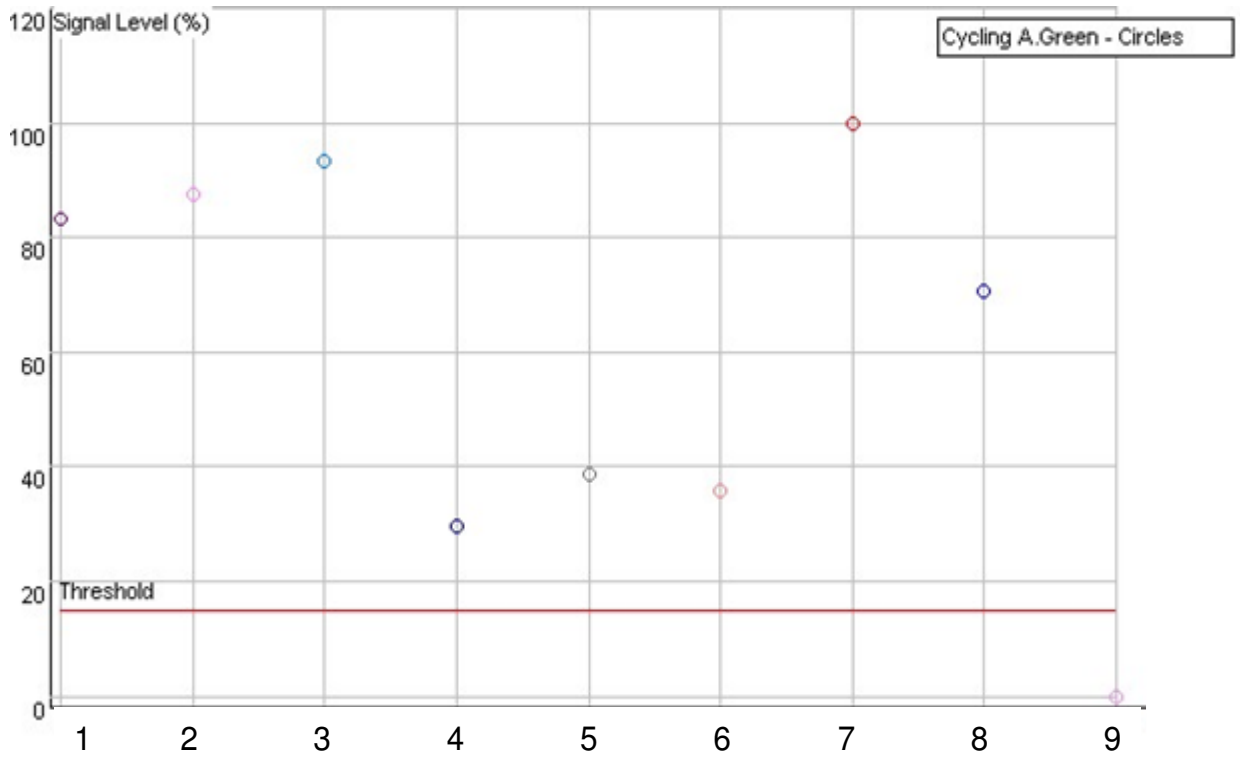
A través de la subinoculación de sangre de los fetos en terneros esplenectomizados no se logró reproducir anaplasmosis.

Figura 8: Temperatura de melting (T_m) de los productos amplificados del gen *msp5* de *Anaplasma* spp. por sn-RT-PCR a partir de muestras de sangre en 3 vacas y sus correspondientes fetos.



V: Vacas; F: Fetos; C+m: Control positivo *A. marginale*; C+c: Control positivo *A. centrale*; C-: Control negativo; PC: Punto de corte

Figura 9: Porcentaje de fluorescencia emitido de los productos amplificados del gen *msp5* de *Anaplasma* spp. por sn-RT-PCR a partir de muestras de sangre de las 3 vacas y sus correspondientes fetos.



Muestra N°
1-3: Vacas; 4-6: Terneros; 7: Control positivo *A. marginale*; 8: Control positivo *A. centrale*; 9: Control negativo

Tabla 14: sn-RT-PCR y C-ELISA basados en el gen *msp5* de *Anaplasma* spp. y su proteína MSP5, en muestras de sangre, líquido amniótico y suero de las vacas y fetos entre el 2° y 3° mes de gestación, obtenidas en los frigoríficos.

Muestras		Vacas			Fetos			
ID	Frigorífico	RT-PCR		C-ELISA %I	RT-PCR	C-ELISA %I	Medida (cm)*	Edad de Gestación (Tercio)
		Sangre	Líquido Amniótico	Suero	Sangre	Suero		
25	Gdor. Virasoro	Pos	N	50	Pos	11	30	2
13		Pos	N	10	Pos	-17	54	2
15		Pos	N	59	Pos	-22	23	2
21		Pos	N	53	Pos	-12	39	2
23		Pos	N	49	Pos	-11	80	3
40		Pos	N	29	Pos	-8	30	2
41		Pos	N	23	Pos	-4	41	2
1		Pos	Pos	48	N	2	31	2
10		Pos	Pos	57	N	-1	29	2
7		Pos	Pos	53	N	-2	58	3
8		Pos	Pos	59	N	3	40	2
33		Pos	Pos	18	N	-9	41	2
31		Pos	Pos	80	N	-8	27	2
50		Pos	Pos	35	N	-11	43	2

N: Negativo, Pos: Positivo, * Longitud occipito-coccigia de los fetos. Límite 2°-3° tercio gestación = 55 cm (Roberts, 1979). C-ELISA Pos ≥ 28 %I

4.2.1.2 Brote de anaplasmosis en vacas gestantes

En las 32 vacas muestreadas después del brote de anaplasmosis se amplificó por sn-RT-PCR un producto con una T_m de $85,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y un nivel de fluorescencia $\geq 40\%$. En ocho terneros (25%) durante su primera semana de vida también se obtuvo un producto con la T_m esperada, pero con un nivel de fluorescencia que varió entre 18 y 40% (Figuras 10 y 11).

Figura 10: Temperatura de melting (T_m) de los productos amplificados del gen *msp5* por sn-RT-PCR a partir de muestras de sangre de las vacas y sus correspondientes terneros en el brote de anaplasmosis.

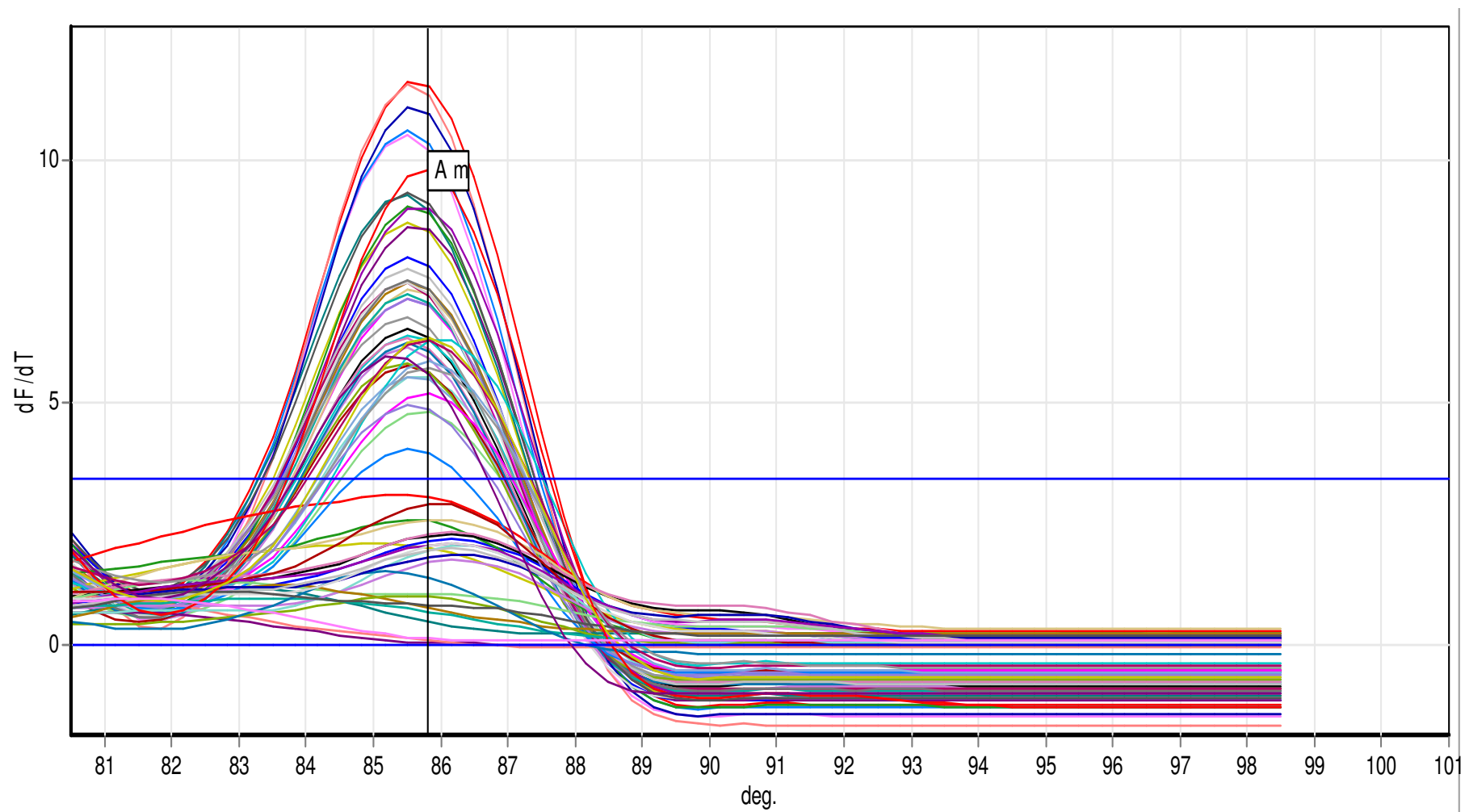
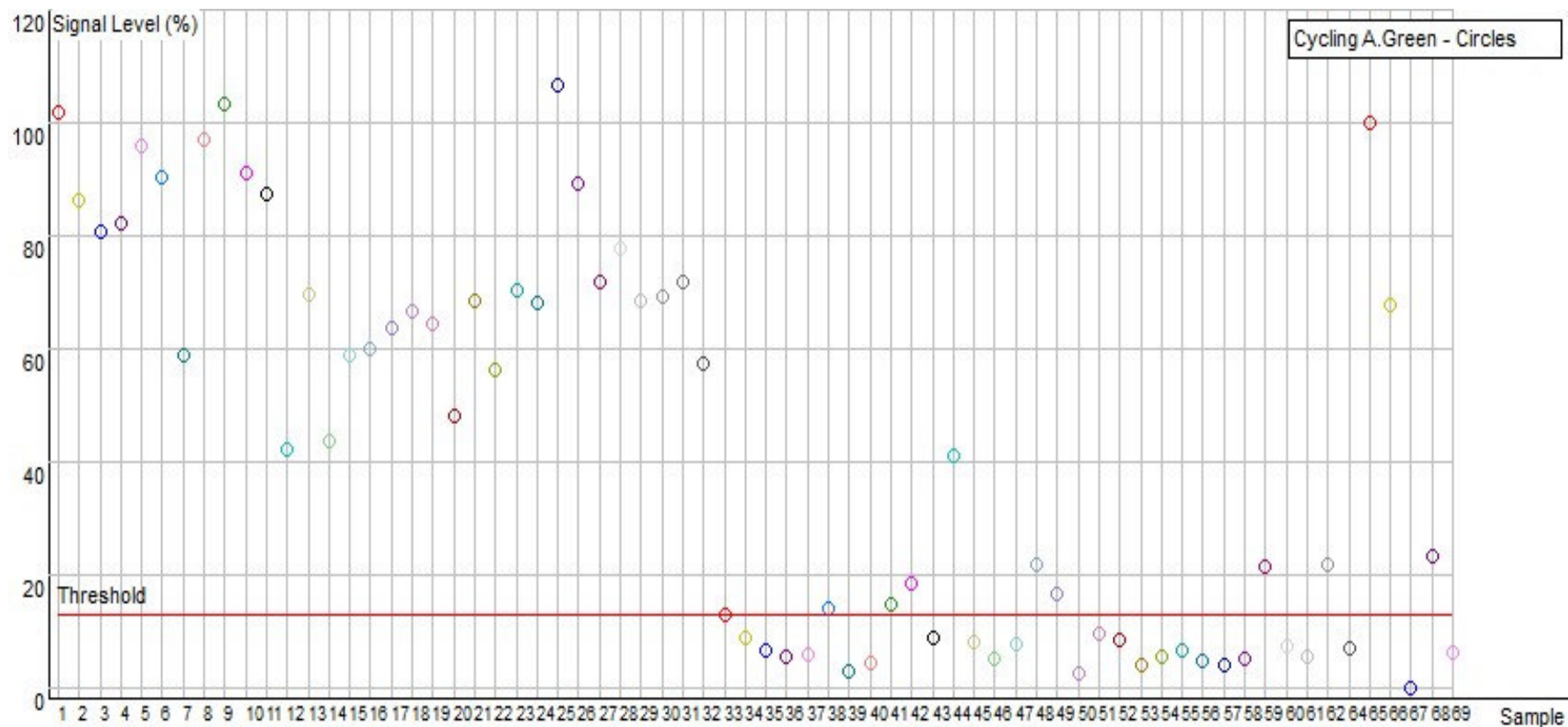


Figura 11: Porcentaje de fluorescencia emitido de los productos amplificados del gen *msp5* por sn-RT-PCR a partir de muestras de sangre de las vacas y sus correspondientes terneros después del brote de anaplasmosis.



1-32: Vacas; 33-64: Terneros; 65: Control positivo *A. marginale*; 66: Control positivo *A. centrale*; 68: Control positivo *A. marginale* 1/1000; 67 y 69: Controles negativos

De los ocho terneros positivos a *Anaplasma* spp. por sn-RT-PCR, cuatro fueron negativos a C-ELISA, tres tenían un título de anticuerpos bajo (29% I, 39% I y 44% I) y solamente uno fue positivo con un 92 % I (Tabla 15).

Tabla 15: sn-RT-PCR y C-ELISA basados en el gen *msp5* y su proteína MSP5, en las vacas afectadas en el brote de anaplasmosis y en sus respectivos terneros.

Identificación	Madres			Terneros		
	RT-PCR Sangre	C-ELISA (Suero)		RT-PCR Sangre	C-ELISA (Suero)	
		Resultado	%I		Resultado	%I
34	Pos	N	25	Pos	N	-1
6610	Pos	Pos	85	Pos	N	10
26	Pos	Pos	58	Pos	Pos	39
5832	Pos	N	14	Pos	N	19
6254	Pos	N	26	Pos	Pos	29
6264	Pos	Pos	58	Pos	N	23
5880	Pos	N	22	Pos	Pos	44
6574	Pos	Pos	87	Pos	Pos	92

Mediante la subinoculación de sangre de los terneros en 6 terneros esplenectomizados no se logró reproducir la anaplasmosis.

4.2.1.3 Evaluación de PCR en terneros infectados experimentalmente con *A. marginale*

En el ternero esplenectomizado se detectó ADN de *A. marginale* por sn-PCR a partir del día 5 PI y en el normal a partir del día 10 PI. En extendidos de sangre, el período prepatente fue de 23 y 27 días en el ternero esplenectomizado y normal, respectivamente. Luego de comprobada presencia de *A. marginale*, cuando la parasitemia alcanzó el 5-10%, ambos animales fueron tratados con oxitetraciclina.

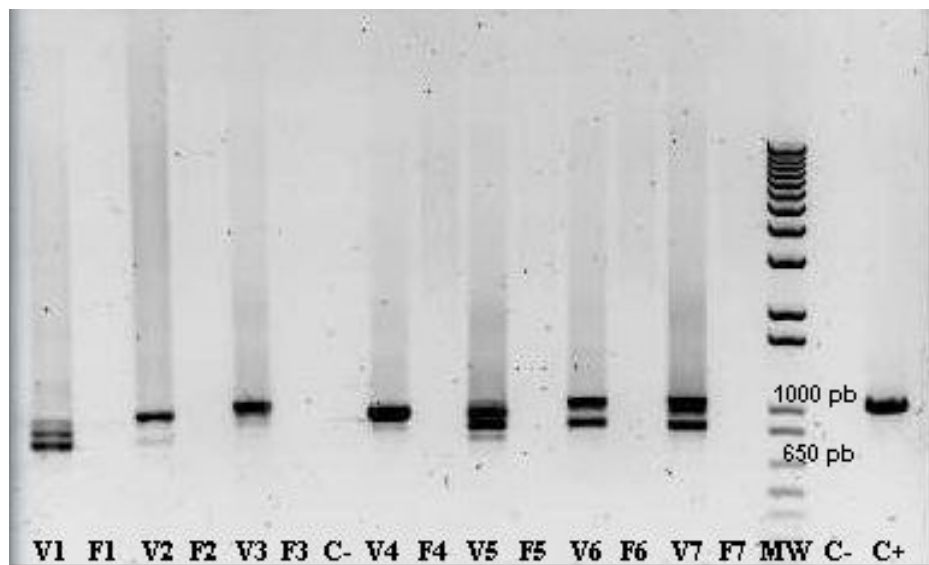
4.2.2 PCR *msp1*

4.2.2.1 Tipificación molecular

4.2.2.1.1 Muestras obtenidas en frigorífico

El análisis del gen *msp1 α* fue realizado en las muestras provenientes de las 7 vacas y de sus respectivos fetos que habían resultado positivos a *Anaplasma* spp. por sn-RT-PCR *msp5*. La amplificación del gen *msp1 α* se logró en las 7 vacas por PCR (Figura 12) y en 2 de los fetos por sn-PCR. (Figura 13).

Figura 12: PCR para el marcador genotípico *msp1 α* de *A. marginale* en 7 vacas y sus respectivos fetos.



Las vacas (V) y los fetos (F) respectivos se identifican con el mismo número y están analizados en columnas contiguas. Control negativo (C-), Control positivo (C+) y Control de Peso Molecular (MW) de 1Kb (Invitrogen®)

Figura 13: Marcador genotípico *msp1α* de *A. marginale* en las dos vacas del frigorífico de Gdor. Virasoro cuyos fetos resultaron positivos a sn-PCR.

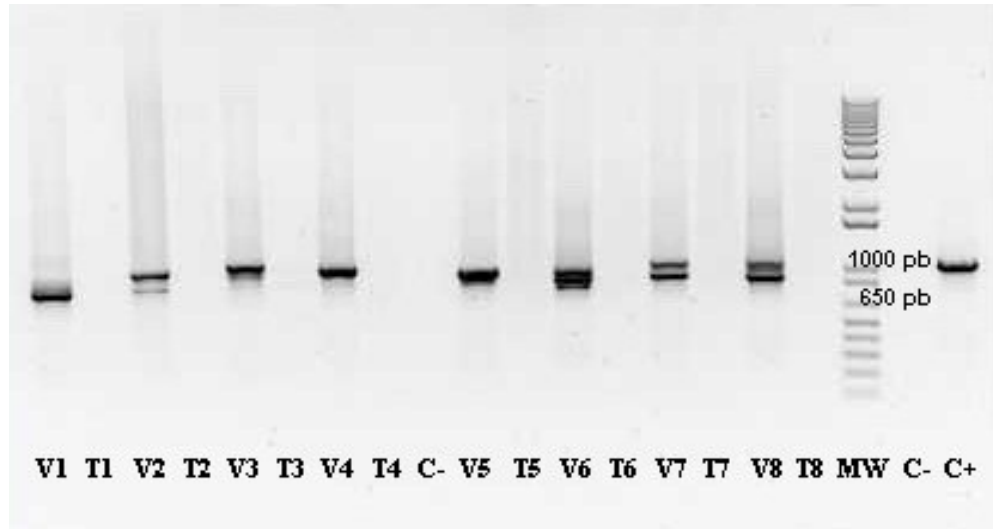


Las vacas (V) y los terneros (T) respectivos se identifican con el mismo número y están analizados en columnas contiguas. Control negativo (C-), Control positivo (C+) y Control de Peso Molecular (MW) de 1Kb (Invitrogen®)

4.2.2.1.2 Brote de anaplasmosis en vacas gestantes

El análisis del gen *msp1α* fue realizado en las muestras provenientes de las 8 vacas y sus respectivos terneros que habían resultado positivos a *Anaplasma* spp. mediante análisis del gen *msp5*. La amplificación del gen *msp1α* se logró en las 8 vacas mediante PCR y en 5 terneros por sn-PCR. Se amplificaron diferentes fragmentos únicos dobles y triples (Figura 14).

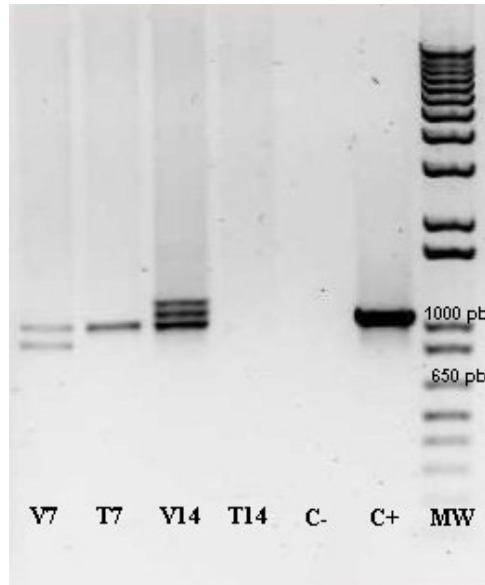
Figura 14: PCR para el marcador genotípico *msp1a* de *A. marginale* en 8 vacas y sus respectivos terneros.



Las vacas (V) y los terneros (T) respectivos se identifican con el mismo número y están analizados en columnas contiguas. Control negativo (C-), Control positivo (C+) y Control de Peso Molecular (MW) de 1Kb (Invitrogen®)

La figura 15 muestra la sn-PCR para el gen *msp1a* en dos muestras de los animales involucrados en el brote, donde se puede ver para la vaca 7 (V7) dos fragmentos amplificados y para su correspondiente ternero (T7) un sólo fragmento; también muestra la amplificación de tres fragmentos para la vaca 14 (V14) cuyo ternero (T14) fue negativo.

Figura 15: Amplificación de fragmentos del gen *msp1α* en los bovinos involucrados en el brote de anaplasmosis.



Las vacas (V) y los terneros (T) respectivos se identifican con el mismo número y están analizados en columnas contiguas. Control negativo (C-), Control positivo (C+) y Control de Peso Molecular (MW) de 1Kb (Invitrogen®)

4.2.2.1.3 Determinación de variantes genotípicas de *A. marginale* en vacas gestantes involucradas en el brote de anaplasmosis

A partir de los productos de sn-PCR se analizaron 9 secuencias de 8 bovinos y solamente en 3 casos el producto fue clonado para determinar los genotipos presentes (Tabla 16). Para una mejor interpretación de los genotipos, identificados por un sistema mixto (alfa numérico y griego) según el número de repeticiones en *tandem*, para este trabajo se denominaron arbitrariamente G1 a G9.

Tabla 16: Genotipos de *A. marginale* identificados en bovinos involucrados en el brote de anaplasmosis.

Genotipos	Estructura de Repeticiones en Tandem de <i>msp1a</i>
G1	F-M-M
G2	B-B-B-M
G3	α - β - β
G4	15- β - β - β -31
G5	Γ
G6	18-18-F-M-M
G7	13-18-18-13-18
G8	τ -11-10-15
G9	α - β - Γ

De todos los genotipos obtenidos el G2 (B-B-B-M), el G3 (α - β - β) y el G7 (13-18-18-13-18) estaban presentes en más de un animal. En sólo dos casos se lograron obtener secuencias legibles en paralelo (vaca-ternero) del gen *msp1a*. En la Tabla 17 se resumen los distintos genotipos de *A. marginale* presentes en los animales donde fue posible secuenciar.

Tabla 17: Genotipos de *A. marginale* encontrados en las vacas y en sus respectivos terneros.

Vacas	Genotipos	Terneros	Genotipos
1	G9	1	G3
7	G2; G3	7	G2
15	G1; G2; G4; G5; G6	15	----
17	G7; G8	17	----
2	*	2	G7
5	*	5	G7

* No se pudo obtener la secuencia a partir de las muestras analizadas de las madres

---- Los terneros fueron negativos

5. DISCUSIÓN

La anaplasmosis es un problema relevante en áreas ganaderas tropicales y subtropicales del mundo, y es una de las enfermedades que más pérdidas económicas causa en el noreste argentino (Vanzini y Ramirez, 1994). Existe un interés creciente por comprender los factores asociados que intervienen en la subsistencia y transmisión de la misma en el ecosistema de la región.

La transmisión de la anaplasmosis se produce mayoritariamente por iatrogenia (Abdala *et al.*, 1992; Kessler, 2001; Baumgartner, 2005), insectos hematófagos (Piercy, 1956; Potgieter *et al.*, 1981; Hawkins *et al.*, 1982; Hornok *et al.*, 2008) y garrapatas (Kahn, 2007), aunque también es posible su transmisión directa por vía transplacentaria. Este tipo de transmisión ha sido comprobada en forma experimental (Zaugg, 1985).

Otros autores también han sugerido el traspaso transplacentario mediante visualización de *A. marginale* en extendidos de sangre, presencia de anticuerpos y/o detección de ADN específico (Bird, 1973; Fowler y Swift, 1975; Swift y Paumer, 1976; Paine y Miller, 1977; Norton *et al.*, 1983; Potgieter y Van Rensburg, 1987; Salaberria y Pino, 1988; Ribeiro *et al.*, 1995; Bock *et al.* 2003; Rey Valeirón *et al.*, 2003; Calderón Gonçalves *et al.*, 2005; Añez-Rojas *et al.*, 2010), generando ciertas controversias en cuanto a su importancia epidemiológica en distintos países, pero en ninguno de los casos se intentó reproducir la enfermedad.

Una proporción mayor al 73% de las vacas faenadas en la ecorregión de campos y malezales (Gdor. Virasoro), tenían anticuerpos contra *Anaplasma* spp., mientras que en la ecorregión del espinal (Mercedes) también se detectaron anticuerpos contra *Anaplasma* en una proporción considerable (~34%).

Entre las dos regiones estudiadas se encontró diferencia significativa ($p < 0,0001$) con un riesgo de infección 5,2 veces mayor en la ecorregión de campos y malezales, lo cual podría estar asociado a diversos factores como edad, raza, iatrogenia, densidad de insectos hematófagos y garrapatas.

A pesar de las diferencias encontradas entre la ecorregión del espinal (donde hay control de garrapatas) y la ecorregión de campos y malezales (donde no hay control de garrapatas) no es posible asociar a ésta como un factor importante en la transmisión de la enfermedad, debido a que no se analizaron los demás factores asociados a la misma.

El rol de *R. microplus* en la transmisión genera ciertas contradicciones. Algunos reportes consideran a esta garrapata como un vector biológico importante de la enfermedad (Ribeiro y Lima, 1996; Kessler, 2001), con transmisión de *A. marginale* por vía transovárica (López Valencia y Vizcaino Gerdtz, 1992; Shimada *et al.*, 2004). Otros aseguran que solamente actúa como un vector mecánico (Connell y Hall, 1972; Leatch, 1973; Thompson y Roa, 1978, Kocan *et al.*, 2003; Kocan *et al.*, 2010), con menor importancia de la que se le atribuye (de Ríos *et al.*, 1990; Coronado, 2001), sosteniendo que solamente los machos de *R. microplus* pueden ser importantes en la transmisión en condiciones naturales (Kocan *et al.*, 2003; Potgieter y Stoltz, 2004). Sin embargo no se conoce con qué frecuencia los machos de *R. microplus* pueden pasar de un animal a otro bajo estas condiciones.

Todos los fetos muestreados en frigorífico resultaron negativos a C-ELISA. En un trabajo similar hecho en Brasil encontraron un 2,1 % de positivos sobre 97 fetos muestreados (Ribeiro *et al.*, 1995). La técnica de CT que también se utilizó en este estudio en fetos presentó aglutinación atípica que imposibilitó su interpretación, incluso

inactivando los sueros, por lo que se concluyó que no es adecuada para el procesamiento de sueros fetales.

En 132 vacas preñadas provenientes de frigorífico se amplificó ADN mediante sn-RT-PCR *msp5*, con una T_m de $85,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ coincidente con la de *A. marginale*, y valores entre 40% y 100% de fluorescencia comparables con los controles provenientes de bovinos infectados natural y experimentalmente. En contraste en los siete fetos en los que también se detectó ADN de *A. marginale* la señal de fluorescencia fue débil excepto en un sólo caso donde alcanzó el 40%. Este hallazgo confirma la transferencia de *A. marginale* de la madre al feto, pero no da cuenta de su viabilidad, la que no pudo ser demostrada por la subinoculación de sangre en terneros esplenectomizados. Cinco madres de esos fetos resultaron positivas y dos negativas a C-ELISA. El nivel de anticuerpos circulantes en animales portadores crónicos de *A. marginale* puede reducirse a niveles no detectables por esta técnica lo cual explicaría los dos resultados negativos (Knowles *et al.*, 1996), aunque en la prueba de CT las dos madres resultaron positivas. Estas diferencias serológicas se deberían a las diferencias entre sensibilidad y especificidad de las pruebas (Molloy *et al.*, 1999)

En el líquido amniótico de siete vacas también se detectó ADN de *A. marginale*, situación que podría deberse a una contaminación del mismo con sangre de la vaca en el momento de la evisceración durante la faena ya que los correspondientes fetos resultaron negativos a C-ELISA, sn-RT-PCR y a la inoculación de sangre en terneros esplenectomizados. Si bien la prueba de PCR-*msp5* no discrimina eficientemente *A. marginale* de *A. centrale*, se puede inferir la presencia de *A. marginale*. La demanda de vacuna en general no proviene de esa zona pero la introducción de bovinos vacunados puede ocurrir. Como era de esperar en esta zona hubo una predominancia de portadores

sanos de *A. marginale*. Todas las madres positivas a PCR *msp5* que presentaron fetos positivos fueron positivas a PCR cuando se utilizó el gen *msp1a* que es específico para *A. marginale* (Shkap *et al.*, 2002; Herndon *et al.*, 2010), pero solamente en dos de las siete muestras de los fetos se logró amplificar el gen *msp1a*, debido probablemente a la menor eficiencia de la PCR para amplificar un producto de mayor tamaño, aunque no se puede descartar el polimorfismo genético. Tampoco hay estudios donde se demuestre diferencias de sensibilidad de sn-RT-PCR y n-PCR entre los genes *msp5* y *msp1a*.

Para el caso del brote de anaplasmosis, confirmado por microscopía directa y parámetros clínicos, la actividad de *A. marginale* estuvo reflejada en las 32 vacas preñadas que resultaron positivas mediante sn-RT-PCR. El 81% mostró un nivel de fluorescencia entre 61 y 110 % y el 19 % restante entre 40 y 60 % de señal respecto del valor de fluorescencia resultante del control de *A. marginale*, proveniente de un animal con anaplasmosis aguda. No todas las muestras de suero fueron positivas, el 63% fue detectado por CT y el 81% por C-ELISA. Este resultado era esperado en un brote de anaplasmosis donde ocurren nuevas infecciones en corto tiempo, y las pruebas serológicas resultan negativas durante el período de incubación de la enfermedad. Knowles *et al.* (1996), demostró que C-ELISA era capaz de detectar anticuerpos contra *A. marginale* a los 16 días post-inoculación y por períodos mayores a 4 años después de una sola infección experimental. Para CT la sero-conversión en animales infectados con *A. marginale* ocurre a los $30 \pm 7,6$ días PI (Echaide *et al.*, 1989).

Los 32 terneros nacidos entre 3 y 5 meses después de ocurrido el brote fueron analizados durante la primera semana de vida; el 94% fue positivo por CT mientras que el 81% por C-ELISA, por lo que es probable que los anticuerpos fueran adquiridos a través del calostro. Sin embargo en la primera semana a través de sn-RT-PCR del gen

msp5 se identificó *A. marginale* en las muestras de sangre de ocho terneros (25%), pero al igual que lo observado en los fetos del frigorífico los niveles de fluorescencia fueron menores a los registrados en las madres, en un ternero fue del 40% y en los siete restantes la señal de fluorescencia varió entre 10 y 22%. El hallazgo del gen *msp5* en los terneros podría estar relacionado con la transmisión vertical de *A. marginale* vía calostro (Baumgartner *et al.*, 1993), que no fue evaluada en este trabajo. Cuatro de las vacas cuyos terneros resultaron positivos a sn-RT-PCR fueron negativas a C-ELISA, pero no se determinó la presencia de anticuerpos en el calostro. En el periparto, los Ac se transfieren al calostro y en muchos casos los niveles en suero sanguíneo suelen bajar a niveles no detectables por las pruebas serológicas (Barrington y Parish, 2004).

En los terneros (esplenectomizado y normal) inoculados experimentalmente se detectó *A. marginale*, por n-PCR, a partir de los días 5 y 10 PI respectivamente, por lo que se asume que los terneros positivos a RT-PCR durante la primera semana de vida podrían haber adquirido *A. marginale* por vía transplacentaria. Sin embargo la anaplasmosis tampoco se logró reproducir mediante la inoculación de su sangre en terneros esplenectomizados. Resultados similares obtuvieron Añez-Rojas *et al.* (2010) quienes identificaron un 40% de terneros PCR positivos nacidos de vacas con anaplasmosis crónica, mientras que Ribeiro *et al.* (1995) trabajando con vacas infectadas experimentalmente en el último tercio de la gestación, observaron un 36% de terneros serológicamente positivo antes de la ingesta del calostro, pero en ninguno de los dos casos se evaluó la viabilidad del agente. Martínez *et al.* (2012) demostraron un 2% de transmisión transplacentaria de *A. marginale* mediante PCR en muestras de terneros recién nacidos, antes de la ingesta de calostro, sin embargo tampoco se intentó reproducir la enfermedad.

Estos resultados demuestran que este tipo de transmisión no sería epidemiológicamente importante en las condiciones del ecosistema de la región y no concuerdan con los resultados obtenidos por Salaberria y Pino (1988) y Rey Valeirón *et al.* (2003) que observaron un 86,4% y 100% de transmisión transplacentaria, respectivamente, aunque en ese trabajo tampoco intentaron reproducir la enfermedad.

Las técnicas de laboratorio utilizadas por estos autores pueden ser cuestionadas. El extendido de sangre teñido con Giemsa, no es una técnica confiable para detección de animales portadores o con bajas parasitemias (Aubry y Geale, 2011) y es necesario tener personal capacitado para diagnosticarlo en fetos debido a que se pueden confundir con corpúsculos de Howel-Jolly (restos de cromatina que se tiñen de color violeta en glóbulos rojos inmaduros). En el caso de evaluarse mediante técnicas serológicas en terneros, se necesita tener un estricto cuidado para que los mismos no hayan ingerido calostro previo al momento de tomar las muestras. Los métodos moleculares son una buena herramienta para un diagnóstico valedero y altamente sensible para la detección del agente infeccioso (Añez-Rojas *et al.*, 2010), aunque ninguno de estos métodos convalida la transmisión vertical del organismo viable.

La genotipificación de *A. marginale* mediante la secuenciación del gen *msp1a*, indicó la presencia de múltiples genotipos. Al menos 9 genotipos se identificaron en este brote de anaplasmosis a partir del análisis de sólo 8 animales positivos. Esto demuestra una diversidad de genotipos de *A. marginale* en la región, y confirman los hallazgos previos en el NE de Argentina (Zimmer *et al.*, 2010). En sólo dos casos se pudo analizar el genotipo de la madre y el de su ternero. En el caso 1 el genotipo encontrado en el ternero (G3) fue diferente al de su madre (G9), aunque no se puede descartar que la madre hubiera sido portadora de más de un genotipo o que el ternero

podiera haberse infectado después del parto. En el caso 7 la madre era portadora de dos genotipos G2 y G3, mientras que en el ternero sólo se detectó el G2, a diferencia del primer caso este resultado indicaría que el G2 sería el predominante o el de mayor afinidad por el feto transmitido *in utero*. Hubo dos terneros en lo que se detectó el G7, pero el gen *msp1a* no pudo ser secuenciado en las muestras de sus madres. El número de casos evaluados fue muy limitado y no permitió sacar conclusiones. Hubert *et al.* (1975) menciona una posible relación entre la tasa de transmisión vertical y la variabilidad genética de las cepas de *A. marginale* con diferente afinidad por el feto. La variabilidad genética estaría asociada a la capacidad de infección y transmisión por garrapatas. Las cepas Idaho, Virginia y Washington son capaces de ser transmitidas por las garrapatas *Dermacentor*, mientras que esto no ha sido logrado con las cepas Illinois y Florida (Smith *et al.*, 1986; Kocan *et al.*, 1996).

6. CONCLUSIONES

Se logró demostrar la transmisión transplacentaria de *A. marginale* en el 5,2% de los fetos de hembras portadoras crónicas, aunque no se logró reproducir la enfermedad luego de realizar inoculaciones experimentales de la sangre en terneros esplenectomizados.

La ocurrencia de transmisión vertical de *A. marginale* es más probable cuando la madre cursa con una infección a partir del segundo tercio de la gestación. El 25% de los terneros nacidos de hembras positivas involucradas en el brote de anaplasmosis resultaron positivos a PCR durante la primera semana de vida. Si bien tampoco se logró reproducir la enfermedad, debería considerarse que si los terneros estaban incubando la anaplasmosis la relación parasitemia/volumen inoculado no era suficiente. Tampoco puede descartarse que la transmisión vertical haya ocurrido via calostro, ya que las muestras se obtuvieron dentro de la primera semana de vida.

No fue posible determinar asociaciones entre variabilidad genética de cepas de *A. marginale* y afinidad por el feto luego de secuenciar el gen *m脾1α*. El número de muestras fue insuficiente.

7. BIBLIOGRAFIA

- ABDALA, A.A.; MANGOLD, A.J. y DE ECHAIDE, S.T. (1992). Transmisión experimental de *Anaplasma marginale* por palpación rectal. Vet. Arg. 9: 683-685.
- AGUIRRE, D.H.; GAIDO, A.B.; VIÑABAL, A.E.; DE ECHAIDE, S.T. y GUGLIELMONE, A.A. (1994). Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different levels of rickettsaemia. Parasite 1: 405-407.
- AGUSTYN, N.J. y BIGALKE, R.D. (1974). *Anaplasma* infection in a giraffe. J. S. Afr. Vet. Assoc. 45: 229.
- ALLEMAN, A.R. y BARBET, A.F. (1996). Evaluation of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 3 (MSP3) as a Diagnostic Test Antigen. J. Clin. Microbiol. 34: 270-276.
- 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.
- AMERAULT, T.E. y ROBY, T.O. (1968). A Rapid Card Agglutination Test for Bovine Anaplasmosis. J. A. V. M. A. 153: 1828-1834.
- AMERAULT, T.E.; ROSE, J.E. y ROBY, T.O. (1972). Modified card agglutination test for bovine anaplasmosis: evaluation with serum and plasma for experimental

and natural cases of anaplasmosis. Proc. 76th Annu. Met. U.S. Anim. Health Assoc. p. 736-734.

- AMERAULT, T.E.; MAZZOLA, V. y ROBY, T.P. (1973). Gram-staining characteristics of *Anaplasma marginale*. Am. J. Vet. Res., 34: 552-555.
- ANZIANI, O.S.; HADANI, A.; FORD, A.C.; GUGLIELMONE, A.A.; BERMÚDEZ, A.C.; MANGOLD, A.J.; SUÁREZ, C.M. y TARABLA, H.A. (1981). Observaciones de campo y laboratorio sobre la inoculación de bovinos Holando Argentino con una cepa de *Anaplasma marginale* modificada y atenuada. Gac. Vet. 43:962-974.
- ANZIANI, O.S. y ABDALA, A. (1986). Administración de una oxitetraciclina de larga acción a bovinos portadores crónicos de *Anaplasma marginale*. Therios. 8:209-213.
- AÑEZ-ROJAS, N.; ROMERO, O.; VALBUENA, H.; CRISANTE, G.; ROJAS, A.; BOLÍVAR, A.M. y AÑEZ, N. (2010). Detección de transmisión transplacentaria de *Anaplasma marginale* en bovinos asintomáticos. Revista Científica, FCV-LUZ. 20: 377-382.
- AUBRY, P. y GEALE, W.D. (2011). A Review of Bovine Anaplasmosis. Transbound. Emerg. Dis. 58: 1-30.
- AUSUBEL, M.F.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A. y STRUHL, K. (1994). Current Protocols *in*: Molecular Biology (New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience).
- BAKER, N.F.; OSEBOLD, J.W. y CHRISTENSEN, J.F. (1961). Erythrocyte survival in experimental anaplasmosis. Am. J. Vet. Res. 22: 590-596.

- 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.
- BARBET, A.F.; BLENTLINGER, R.; JOOYOUNG, Y.I.; LUNDGREN, A.M.; BLOUIN, E.F. y KOCAN, K.M. (1999). Comparison of Surface Proteins of *Anaplasma marginale* Grown in Tick Cell Culture, Tick Salivary Glands, and Cattle. *Infect. Immun.* 67: 102-107.
- BARBET, A.F.; JOOYOUNG YI; LUNDGREN, A.; MCEWEN, B.R.; BLOUIN, E.F. y KOCAN, K.M. (2001). Antigenic Variation of *Anaplasma marginale*: Major Surface protein 2 Diversity during Cyclic Transmission between Ticks and Cattle. *Infect. Immun.* 69: 3057-3066.
- BARRINGTON, G.M. y PARISH, S.M. (2004). Inmunología neonatal bovina. *En: Clínicas Veterinarias de Norteamérica. Inmunología.* Roth, J. A. (ed). Editorial Inter-Médica S.A.I.C.I. p. 1-13.
- BAUMGARTNER, W.; STÖGER, J. y MARKTL, W. (1993). Demonstration of the oral path of infection with *Anaplasma marginale* in calves. *Vet. Rec.* 133: 64-66.
- BAUMGARTNER, W. (2005). Anaplasmosis bovina. *En: Medicina interna y cirugía del bovino/Gerrit Dirksen; Hans-Dieter Gründer y Matthaeus Stöber.* Vol 1. 4ta. ed. Editorial Inter-Médica S.A.I.C.I. p. 199-200.
- BAUTISTA-GRIFAS, C.R. (1996). La respuesta inmune celular en anaplasmosis bovina. *En: Ciencia Veterinaria.* Vol. 7 Ed. Moreno Chan R. Editorial: UNAM. p. 315-329.
- BIRD, J.E. (1973). Neonatal anaplasmosis in calf. *J.S. Afr. Vet. Assoc.* 44: 69-70.

- BOCK, R.E. y DE VOS, A.J. (2001). Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Aust. Vet. J.* 79: 832-839.
- BOCK, R.E.; DE VOS, A.J.; KINGSTON, T.G. y CARTER, P.D. (2003). Assessment of a low virulence Australian isolate of *Anaplasma marginale* for pathogenicity, immunogenicity and transmissibility by *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* 118: 121-131.
- BOWIE, M.V.; DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K.M.; BLOUIN, E.F. y BARBET, A.F. (2002). Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. *Gene.* 282: 95-102.
- BOYNTON, W.H. y WOODS G.M. (1933). Deer as carrier of anaplasmosis. *Science.* 78: 559-560.
- BOYNTON, W.H. y WOODS G.M. (1940). Anaplasmosis among deer in the natural state. *Science.* 91: 168.
- BRION, A. (1943). A new equine disease: Anaplasmosis and its causal parasite, *Anaplasma equi*. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 217: 709-710.
- BROCKLESBY, D.W. y VIDLER, B.O. (1966). Haematozoa found in wild members of the order artiodactyla in East Africa. *Bull. Epizoot. Dis Afr.* 14: 285-299.
- BROWN, W.C.; SHKAP, V.; ZHU, D.; MCGUIRE, T.C.; TUO, W.; MACELWAIN, T.F. y PALMER, G.H. (1998). CD4+ T-Lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infect. Immun.* 66: 5406-5413.
- BROWN, W.C. (2012). Adaptive immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation: Implications for bacterial persistence. *Comp. Immunol. Microb.* 35: 241-252.

- BUNDZA, A. y SAMAGH, B.S. (1982). Acute Anaplasmosis in Imported Cattle. *Can. Vet. J.* 23: 337-339.
- BURRIDGE, M.J. (1975). The role of wild mammals in the epidemiology of bovine theileriosis in East Africa. *J. Wildl. Dis.* 11: 68-74.
- CALDERON GONÇALVES, R.; PESSOA GOMEZ DA SILVA, D.; BIAGIO CHIACCHIO, S.; SECORUN BORGES, A.; MARTINS AMORIM, R.; PEDONE BANDARRA, Ê. y KIOMI TAKAHIRA, R. (2005). Anaplasmosse Neonatal em Bezerro. *Veterinária Notícias, Uberlândia.* 11: 95-98.
- CARELLI, G.; DECARO, N.; LORUSSO, A.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; MARI, V.; CECI, L. y BUONAVOGLIA, C. (2007). Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. *Vet. Microbiol.* 124: 107-114.
- CARPANO, M. (1934). L'infezione da *Anaplasma* del tipo *marginale* dei bufali in Egitto. *Clin. Vet. (Milan)* 57: 589-592.
- CHRISTENSEN, J.F.; OSEBOLD, J.W. y ROSEN, M.N. (1958). Infection an antibody response in deer experimentally infected with *Anaplasma marginale* from bovine carriers. *J. A. V. M. A.* 132: 289-292.
- COAN, M.E.; STILLER, D. y SCHOELAR, G.B. (1989). Persistence of *Anaplasma marginale* infectivity and tick survival in intrastadially infected *Dermacentor andersoni* held in the field. Proc. of the 8th National Veterinary Hemoparasite Disease Conference, St. Louis. MO, p 161-176.
- COETZEE, J.F.; APLEY, M.D.; KOCAN, K.M.; RURANGIRWA, F.R. y VAN DONKERSGOED, J. (2005). Comparison of three oxitetracycline regimens for

the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infections in beef cattle. Vet. Parasitol. 127: 61-73.

- COETZEE, J.F. y APLEY, M.D. (2006). Efficacy of enrofloxacin against severe experimental *Anaplasma marginale* infections in splenectomized calves. Vet. Ther. 7: 319-328.
- COETZEE, J.F.; APLEY, M.D. y KOCAN, K.M. (2006a). Comparison of the efficacy of enrofloxacin, imidocarb, and oxytetracycline for clearance of persistent *Anaplasma marginale* infections in cattle. Vet. Ther. 7: 347-360.
- COETZEE, J.F.; APLEY, M.D.; KOCAN, K.M. y JONES, D.E. (2006b). Flow cytometric evaluation of selected antimicrobial efficacy for clearance of *Anaplasma marginale* in short-term erythrocyte cultures. J. Vet. Pharmacol. Ther. 29: 173-183.
- COETZEE, J.F.; KOCAN, K.M.; HIGGINS, J.J.; APLEY, M.D. y JONES, D.E. (2009). Ultrastructural and fluorochromatic changes of *Anaplasma marginale* exposed to oxytetracycline, imidocarb and enrofloxacin in short-term erythrocyte cultures. Vet. Microbiol. 136: 45-53.
- CONNELL, M. y HALL, W.T.K. (1972). Transmission of *Anaplasma marginale* by the cattle tick *Boophilus microplus*. Aust. Vet. J. 48: 477.
- CORONADO, A. (2001). Is *Boophilus microplus* the main vector of *Anaplasma marginale*? Technical note. Revista Científica, FCV-LUZ. 11: 408-411.
- DALGLIESH, R.J. y STEWART, N.P. (1983). The use of tick transmission by *Boophilus microplus* to isolate pure strains of *Babesia bobis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* from cattle with mixed infections. Vet. Parasitol. 13: 317-323.

- DECARO, N.; CARELLI, G.; LORUSSO, E.; LUCENTE, M.S.; GRECO, G.; LORUSSO, A.; RADOGNA, A.; CECI, L. y BUONAVOGLIA, C. (2008). Duplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection and quantification of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale*. J. Vet. Diagn. Invest. 20: 606-611.
- DE LA FUENTE, J.; GARCIA GARCIA, J.E.; BLOUIN, E.F. y KOCAN, K.M. (2001). Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. Int. J. Parasitol. 31: 145-153.
- DE LA FUENTE, J. y KOCAN, K.M. (2001). Expression of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 2 Variants in Persistently Infected Ticks. Infect. Immun. 69: 5151-5156.
- DE LA FUENTE, J.; LEW, A.; LUTZ, H.; MELI, M.L.; HOFMANN-LEHMANN, R.; SHKAP, V.; MOLAD, T.; MANGOLD, A.J.; ALMAZÁN, C.; NARANJO, V.; GORTAZAR, C.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; GARCIA-PEREZ, A.L.; BARRAL, M.; OPORTO, B.; CECI, L.; CARELLI, G.; BLOUIN, E.F. y KOCAN, K.M. (2005). Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. Anim. Health. Res. Rev. 6: 75-89.
- DE LA FUENTE, J.; RUYBAL, P.; MTSALI, M.S.; NARANJO, V.; SHUQING, L.; MANGOLD, A.J.; RODRÍGUEZ, S.D.; JIMÉNEZ, R.; VICENTE, J.; MORETTA, R.; TORINA, A.; ALMAZÁN, C.; MBATI, P.M.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; FARBER, M.; ROSARIO-CRUZ, R.; GORTAZAR, C. y

- KOCAN, K.M., (2007). Analysis of World Strains of *Anaplasma marginale* using Major Surface Protein 1^a Repeat Sequences. *Vet. Microbiol.* 119: 382-390.
- DE VOS, A.J. (1992). Distribution, economic importance and control measures for Babesia and Anaplasma. T.T. Dolan, Editor, Recent Developments in the Control of Anaplasmosis, Babesiosis and Cowdriosis: Proceedings of a Workshop held at ILRAD, May 13-15, 1991. The International Laboratory for Research on Animal Diseases, Nairobi (1992) p. 3-12.
 - DIKMANS, G. (1950). The transmission of anaplasmosis. *Am. J. Vet. Res.* 11: 5-16.
 - DONATIEN, A y LESTOQUARD, F. (1930) Les anaplasmoses des ruminants. *Rev. Vet.* 82: 125-139.
 - DONOVAN-MYHAND, J.; HART, L.T.; LIU, C.; OHRBERG, C. y SEGER, C.L. (1984). A rapid staining procedure for *Anaplasma marginale* in bovine erythrocytes. *Am. J. Vet. Res.* 45: 2143-2144.
 - DUMLER J.S., BARBET A.F., BEKKER C.P., DASCH G.A., PALMER G.H., RAY S.C., RIKIHISA Y. y 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 five new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 2145–2165.
 - ECHAIDE, S.T. DE; RÍOS L.G. DE y AGUIRRE, D.H. (1989). Evaluación de un antígeno de *Anaplasma marginale* para la prueba de aglutinación en placa. V Reunión Anual Asoc. Arg. Vet. Lab. Diag., Río Cuarto, Córdoba, p 143-152.

- ERIKS, I.S.; PALMER, G.H.; MCGUIRE, T.C. y BARBET, A.F. (1989). Detection and quantitation of *Anaplasma marginale* in carrier cattle using a nucleic acid probe. J. Clin. Microbiol. 27: 279-284.
- ERIKS, I.S.; STILLER, D.; y PALMER, G.H. (1993). Impact of Persistent *Anaplasma marginale* Rickettsemia on Tick Infection and Transmission. J. Clin. Microbiol. 31: 2091-2096.
- ERP, E. y FAHRNEY, D. (1975). Exit of *Anaplasma marginale* from bovine red blood cells. Am. J. Vet. Res. 36: 707-709.
- EWING, S.A. (1981). The transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. In Proceedings of the 7th National Anaplasmosis Conference, Mississippi State University, MS, USA. p. 395-423
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (1984). Ticks and ticks-borne disease control. A Practical Field Manual. Vol II p 395-397.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) (1987). Garrapatas que parasitan el ganado. *En*: El control de las garrapatas y las enfermedades que transmiten. Manual Práctico de Campo. Vol I p 5-53.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) (1988). El tratamiento de las enfermedades de los bovinos transmitidas por garrapatas. *En*: El control de las garrapatas y las enfermedades que transmiten. Manual Práctico de Campo. Vol II p. 427-440.
- FIGUEROA, J.V.; CHIEVES, L.P.; JOHNSON, G.S. y BUENING, G.M. (1993). Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. Vet. Parasitol. 50: 69-81.

- FOWLER, D. y SWIFT, B. (1975). Abortion in cow inoculated with *Anaplasma marginale*. *Theriogenology*. 4: 59-67.
- FRANCIS, D.H.; KINDEN, D.A. y BUENING, G.M. (1979). Characterization of the Inclusion Limiting Membrane of *Anaplasma marginale* by Immunoferritin Labeling. *Am. J. Vet. Res.* 40: 777-782.
- FRENCH, D.M.; MACELWAIN, T.F.; MACGUIRE, T.C. y PALMER, G.H. (1998). Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. *Infect. Immun.* 66: 1200-1207.
- FRENCH, D.M.; BROWN, W.C. y PALMER, G.H. (1999). Emergence of *Anaplasma marginale* Antigenic Variants during Persistent Rickettsemia. *Infect. Immun.* 67: 5834-5840.
- FUTSE, J.E.; UETI, M.W.; KNOWLES, J.R. y PALMER, G.H. (2003). Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: Retention of Vector Competence in the absence of Vector-Pathogen Interaction. *J. Clin. Microbiol.* 41: 3829-3834.
- GAIDO, A.B.; VIÑABAL, A.E.; AGUIRRE, S.T.; DE ECHAIDE, S.T. y GIGLIELMONE, A.A. (1995). Transmission of *Anaplasma marginale* by the three-host tick *Amblyomma neumanni* Under laboratory conditions. *Folia Parasitologica* 42: 72.
- GALE, K.R.; LEATCH, G.; DE VOS, A.J. y JORGENSEN, W.K (1996). *Anaplasma marginale*: Effect of Challenge of Cattle with Varying Doses of Infected Erythrocytes. *Int. J. Parasitol.* 26: 1417-1420.

- GALE, K.R.; DIMMOCK, C.M.; GARTSIDE, M. y LEATCH, G. (1996a). *Anaplasma marginale*: Detection of carrier cattle by PCR-ELISA. Int. J. Parasitol. 26:1103-1109.
- GARNERO, O. y PERUSIA, O. (2002). Manual de anestésias y cirugías del bovino. Ed. Imprenta San Cayetano. Esperanza-Sta. Fe-Argentina. 125 p.
- GAUTAM, O.P.; SHARMA, R.D. y SINGH, B. (1970). Anaplasmosis II: Clinical cases of anaplasmosis in cattle, buffaloes, and sheep. Indian Vet. J. 47: 1012-1019.
- GE, N.; KOCAN, K.; BLOUIN, E.; y MURPHY, G. (1996). Developmental studies of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) infected as adults by using nonradioactive in situ hybridization and microscopy. J. Med. Entomol. 33: 911-920.
- GIARDINA, S.; BRETANA, A. y MARQUEZ, Q. (1983). Ultrastructural aspects of intraerythrocytic development of a Venezuelan strain of *Anaplasma marginale*. Tropenmed. Parasit. 34: 7-10.
- GINZINGER, D.G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. Exp. Hematol. 30: 503-512.
- GONCALVES RUIZ, P.M.; FRICHE PASSOS, L.M. y BARBOSA RIBEIRO, M.F. (2005). Lack of infectivity of a Brazilian *Anaplasma marginale* isolate from *Boophilus microplus* ticks. Vet. Parasitol. 128: 325-331.
- GROBOV, O. F. (1961). O vospriimchivosti losya k Anaplazman krupnogo rogotogo skota. Veterinariya (Mosc.). 38: 50-51.
- GUBBELS, J.M.; DE VOS, A.P.; VAN DER WEIDE, M.; VISERA, J.; SCHOOLS, L.M.; DE VRIES, E. y JONGEJAN, F. (1999). Simultaneous Detection of

Bovine *Theileria* and *Babesia* Species by Reverse Line Blot Hybridization. J. Clin. Microbiol. 37: 1782-1789.

- GUGLIELMONE, A.A. (1994). Epidemiología y prevención de los hemoparásitos (*Babesia* y *Anaplasma*) en la Argentina. En: Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Ed. por A. Nari y C. Fiel. HEMISFERIO SUR. p. 461-476.
- GUGLIELMONE, A.A. (1995). Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. Vet. Parasitol. 57: 109-119.
- GUGLIELMONE, A.A.; ANZIANI, O.S.; MANGOLD, A.J.; VOLPOGNI, M.M. y VOGEL, A. (1996). Enrofloxacin to control *Anaplasma marginale* infections. Ann. NY Acad. Sci. 791: 471-472.
- HAWKINS, J.A.; LOVE, J.N. y HIDALGO, R.J. (1982). Mechanical transmission of anaplasmosis by tabanids (Diptera: *Tabanidae*). Am. J. Vet. Res. 43: 732-73
- HERNDON, D.R.; PALMER, G.H.; SHKAP, V.; KNOWLES, D.P. Jr. y BRAYTON, K.A. (2010). Complete Genome Sequence of *Anaplasma marginale* subsp. *centrale*. J. Bacteriol. 192: 397-380.
- HORNK, S.; FÖLDVARI, G.; ELEK, V.; NARANJO, V.; FARKAS, R. y DE LA FUENTE, J. (2008). Molecular identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial endosymbionts in blood-sucking flies (Diptera: *Tabanidae*, *Muscidae*) and hard ticks (Acari: *Ixodidae*). Vet. Parasitol. 154: 354-359.
- HOSMER, D.W. y LEMESHOW, S. (1989). Applied Logistic Regression. John Wiley & Sons. Inc. New York. 307p.
- HOWARTH, J.A.; ROBY, T.O.; AMERAULT, T.E. y MCNEAL (1969). Prevalence of *Anaplasma marginale* infection in Californian deer as measured by calf

inoculation and serologic techniques. Proc. 73rd Annu. Meet. U.S. Anim. Health Assoc. p. 136-147.

- HOWE, D.L.; HEPWORTH, W.G.; BLUNT, F.M. y THOMAS, G.M. (1964). Anaplasmosis in big game animals: Experimental infections and evaluation of serologic tests. Am. J. Vet. Res. 25: 1271-1275.
- HOWE, D.L. y HEPWORTH, W.G. (1965). Anaplasmosis in big game animals: Test on wild populations in Wyoming. Am. J. Vet. Res. 26: 1114-1120.
- HOWELL, D.E.; STILES, G.W. y MOE, L.H. (1941). The hereditary transmission of anaplasmosis by *Dermacentor andersoni* Stiles. Am. J. Vet. Res. 2: 165-166.
- HUBBERT, W.T. (1975). Parasitic infection of the perinate: a review. Theriogenology. 3: 43-63.
- HUNGERFORD, L.L. y SMITH, R.D. (1997). Variation in seroprevalence and host factors for bovine anaplasmosis in Illinois. Vet. Res. Commun, 21: 9-18.
- IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura) (1989). Técnicas para el Diagnóstico de la Babesiosis y Anaplasmosis Bovinas. Salud Animal: Publicación científica N°8. San José, Costa Rica. p. 39-42.
- JACOBSON, R.H.; WORLEY, D.E. y HAWKINS, W.W. (1977). Studies on pronghorn antelope (*Antilocapra Americana*) as reservoirs of anaplasmosis in Montana. J. Wildl. Dis. 13: 323-326.
- JONES, E.W. y BROCK, W.E. (1966). Anaplasmosis bovina. Correlaciones clínico-patológicas. Proc. 5th Congr. Panam. Med. Vet. Zoot., Caracas, Venezuela, p. 254-260
- JONGEJAN, F. y UILENBERG, G. (2004). The global importance of ticks. Parasitology 129:1-12.

- JONSSON, N.N. y REID S.W.J, (2000). Global Climate Change and Vector Borne Diseases. *Vet. J.* 160: 87-89.
- JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C. y PALMER, N. (1991). Anaplasmosis. *En: Patología de los animales domésticos. Vol III. 3ra ed. española. Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L. p. 178-179.*
- KAHN, C.M. (2007). Anaplasmosis. *En: Manual Merck de Veterinaria. Vol I.6ta. ed. española. (Edición especial 50º aniversario) Editorial Océano. p. 18-20.*
- KESSLER, R.H., (2001.) Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. *Pesq. Vet. Bras.* 21: 177-179.
- KNOWLES, D.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; PALMER, G.; MCGUIRE, T.; STILLER, D. y MCELWAIN, T. (1996). Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2225-2230.
- KOCAN, K.M.; TEEL, K.D.; y HAIR, J.A. (1980a). Demonstration of *Anaplasma marginale* Theiler in ticks by tick transmission animal inoculation and fluorescent antibody studies. *Am. J. Vet. Res.* 41: 183-186.
- KOCAN, K.M.; HAIR, J.A. y EWING, S.A. (1980b). Ultrastructure of *Anaplasma marginale* Theiler in *Dermacentor andersoni* Stiles and *Dermacentor variabilis* (Say). *Am. J. Vet. Res.* 41: 1966-1975.
- KOCAN, K.M.; HAIR, J.A.; EWING, S.A.; y STRATTON, L.G. (1981). Transmission of *Anaplasma marginale* Theiler by *Dermacentor andersoni* Stiles and *Dermacentor variabilis* (Say). *Am. J. Vet. Res.* 42: 15-18.

- KOCAN, K.M.; GOFF, W.L.; STILLER, D.; CLAYPOOL, P.L.; EDWARD, W.; EWING, S.A.; HAIR, J.A.; y BARRON, S.J. (1992a) Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible calves. J. Med. Etmol. 29: 657-668.
- KOCAN, K.M.; STILLER, D.; GOFF, W.L.; CLAYPOOL, P.L.; EDWARDS, W.; EWING, S.A.; MCGUIRE T.C.; HAIR, J.A. y BARRON, S.J. (1992b) Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from infected to susceptible cattle. Am. J. Vet. Res. 53: 499-507.
- KOCAN, K.M.; BLOUIN, E.F.; PALMER, G.H.; ERIKS, I.S. y EDWARDS W.L. (1996). Strategies to Interrupt the Development of *Anaplasma marginale* in Its Tick Vector. The Effect of Bovine-Derived Antibodies. Ann. NY. Acad. Sci. 791: 157-165.
- KOCAN, K.M.; BLOUIN, E.F. y BARBET, A.F. (2000). Anaplasmosis control: past, present and future. Ann. NY. Acad. Sci. 916: 501-509.
- KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J.; GUGLIELMONE A.A. y MELENDEZ, R.D. (2003). Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. Clin. Microbiol. Rev. 16: 698-712.
- KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E.F.; y GARCÍA-GARCÍA, J.C. (2004). *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. Parasitology. 129: 285-300.
- KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E.F.; COETZEE, J.F. y EWING, S.A. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. Vet. Parasitol. 167: 95-107.

- KREIER, J.P. y RISTIC, M. (1963). Anaplasmosis. X. Morphologic Characteristics of the Parasites Present in the Blood of Calves Infected with the Oregon Strain of *Anaplasma marginale*. Am. J. Vet. Res. 24: 676-687.
- KREIER, J.P. y RISTIC, M. (1963b). Anaplasmosis VII. Experimental *Anaplasma ovis* infection in white-tailed deer (*Dama virginiana*). Am. J. Vet. Res. 24: 567-572.
- KUTTLER, K.L. (1965). Serological survey of anaplasmosis incidence in East Africa, using the complement-fixation test. Bull. Epizoot. Dis Afr. 13: 257-262.
- KUTTLER, K.L.; ROBINSON, R.M. y ROGERS, W.P. (1967). Exacerbations of Latent Erythrocytic Infections in Deer Following Splenectomy. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 31: 317-319.
- KUTTLER, K.L.; ADAMS L.G. y ZARAZA OROSCO, H. (1970). Estudio epizootiologico del *Anaplasma marginale* y del *Trypanosoma theileri* en Colombia. Revista ICA. 5: 127-148.
- KUTTLER, K.L. (1981a). Infection of splenectomized calves with *Anaplasma ovis*. Am. J. Vet. Res. 42: 2094-2096.
- KUTTLER, K.L. (1984a). Anaplasma infections in wilds and domestics ruminants: a review. J. Wildl. Dis. 20: 12-20.
- KUTTLER, K.L.; ZAUGG, J.L. y JOHNSON, L.W. (1984b). Serologic and clinical responses of premunized, vaccinated and previously infected cattle to challenge exposure by two different *Anaplasma marginale*. Am. J. Vet. Res. 45: 2223-2226.

- LANCASTER, J.L. Jr.; ROBERTS, H.; LEWIS, L.; DINKINS, L y DE VANEY, J. (1968). Review of anaplasmosis transmission trials with the white-tailed deer. *In* Proc. 5th Nat. Anaplasmosis Conf., Stillwater, Oklahoma, p 197-215.
- LEATCH, G. (1973). Preliminary studies on the transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*. *Aust. Vet. J.* 49: 16-19.
- LEW, A.E; BOCK, R.E; MINCHIN, C.M. y MASAKA, S. (2002). A msp 1 alpha polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. *Vet. Microbiol.* 86: 325-335.
- LOHR, K.F. y MEYER, H. (1973). Game anaplasmosis: The isolation of *Anaplasma* organism from antelope. *Z. Tropenmed. Parasitol.* 24: 192-197.
- LOHR, K.F.; ROSS, J.P.J. y MEYER, H. (1974). Detection in game of fluorescent and agglutination antibodies in intraerythrocytic organism. *Tropenmed. Parasitol.* 25: 217-226.
- LOPEZ VALENCIA, G. DE J. y VLZCAINO GERDTS, O.G. (1992). Transovarian transmission of *Anaplasma marginale* by the tick *Boophilus microplus*. *Revista ICA.* 27: 437-443.
- LUTHER, G.D. (2007). History of Our Anaplasmosis Vaccine. [en línea] <<http://www.anaplasmosisvaccine.com/history.html>> [Consulta: 25 de agosto de 2011]
- MAAS, J. y BUENING, G. M. (1981a). Serologic evidence of *Anaplasma marginale* infection in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in Missouri. *J. Wildl. Dis.* 17: 45-47.
- MAAS, J. y BUENING, G.M. (1981b). Characterization of *Anaplasma marginale* infection in splenctomized domestic goats. *Am. J. Vet. Res.* 42: 142-145.

- MAGONIGLE, R.A. y ECKBLAD, W.P. (1979). Evaluation of the anaplasmosis rapid card agglutination test for detecting experimentally infected elk. *Cornell Vet.* 69: 402-410.
- MAGONIGLE, R.A.; LINCOLN, S.D. y FRANK, F.W. (1981). *Anaplasma ovis* in Idaho sheep. *Am. J. Vet. Res.* 42: 199-201.
- MALLICK, K.P.; DWIVEDI, S.K. y MALHOTRA, M.N. (1979). Anaplasmosis in goats: Report on clinical cases. *Indian Vet. J.* 56: 693-694.
- MARTÍNEZ, I.; MARTÍNEZ, D.; THOMPSON, C.; JACOBO, R.; CIPOLINI, F.; AGUIRRE, N.; STORANI, C.M. y TORIONI DE ECHAIDE, S. (2012). Dinámica de la infección de *Anaplasma marginale* durante el parto en un rodeo de cría de la provincia de Corrientes. V Reunión Anual. Asoc. Arg. Inmun. Vet. Esperanza, Santa Fe, p 27
- MASON, C.A. y NORVAL, R.A.I. (1981). The transfer of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) from infested to uninfested cattle under field conditions. *Vet. Parasitol.* 8: 185-188.
- MATTHEWS, M. (1978). Anaplasmosis in *Siberian ibex*. *J. Zoo. Anim. Med.* 9: 148
- MEEUS, P.F.M. y BARBET, A.F. (2001). Ingenious gene generation. *Trends Microbiol.* 9: 353-355.
- MOLLOY, J.B.; BOWLES, P.M.; KNOWLES, D.P.; MCELWAIN, T.F.; BOCK, R.E.; KINGSTON, T.G.; BLIGHT, G.W. y DALGLIESH, R.J. (1999). Comparison of a comparative inhibition ELISA and the card agglutination test for detection of antibodies to *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* in cattle. *Aust. Vet. J.* 77: 245-249.

- NEITZ, W.O. y DUTOIT, P.J. (1932). Bovine anaplasmosis: A method of obtaining pure strains of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* by transmission through antelope. 18th Rept. Dir. Vet. Serv. Anim. Ind. Union of S. Afr. p 3-20.
- NEITZ, W.O. (1935). Bovine anaplasmosis: The transmission of *Anaplasma marginale* to a black wildebeest (*Connochaetes gnu*). Vet. Sci Onderstepoort J. Anim. Ind. 5: 9-11.
- NEITZ, W.O. (1939). Ovine anaplasmosis: The transmission of *Anaplasma ovis* and *Eperythrozoon ovis* to blesbuck (*Damaliscus albifrons*). Vet. Sci. Onderstepoort J. Anim. Ind. 13: 9-16.
- NORTON, J.M.; PARKER, R.J. y FORBES-FAULKNER, J.C. (1983.) Neonatal anaplasmosis in a calf. Aust.Vet. J. 60: 348.
- NUÑEZ, J. (1994). GARRAPATA. Taxonomia y ciclo biologico del *Boophilus microplus*. En: Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Ed. por A. Nari y C. Fiel. HEMISFERIO SUR p 289-299.
- OBERLE, S.M.; PALMER, G.H. y BARBET, A.F. (1993). Expression and Immune Recognition of the Conserved MSP4 Outer Membrane Protein of *Anaplasma marginale*. Infect. Immun. 61: 5245-5251.
- OIE (World Organisation for Animal Health). (2008). Chapter 2.4.1 Bovine Anaplasmosis. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6th Ed, p. 599-610.
- OIE (Código Sanitario para los Animales Terrestres). (2010). Capítulo 11.1. Anaplasmosis Bovina. [en línea] <http://web.oie.int/esp/normes/mcode/es_chapitre_1.11.1.pdf> [Consulta 25 de agosto de 2011).

- OIE (World Organisation for Animal Health). (2012). Chapter 2.4.1 Bovine Anaplasmosis. *In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, xxth Ed, p. 1-12.
- OSEBOLD, J.W.; CHRISTENSEN, J.F.; LONGHURST, W.M. y ROSEN, M.N. (1959). Latent *Anaplasma marginale* infection in wild deer demonstrated by calf inoculations. *Cornell Vet.* 49: 97-115.
- OTIM, C.; WILSON, A.J. y CAMPELL, R.S.F. (1980). A comparative study of experimental anaplasmosis in *Bos indicus* and *Bos Taurus* cattle. *Aust. Vet. J.* 56: 262-266.
- PAINE, G.D. y MILLER, A.S. (1977). Anaplasmosis in a newborn calf. *Vet. Rec.* 100: 58.
- PALMER, G.R.; BARBET, A.F.; MUSOKE, A.J.; KATENDE, J.M.; RURANGIRWA, F.; SHKAP, V.; PIPANO, E.; DAVIS, W.C. y MCGUIRE, T.C. (1988). Recognition of conserved surface protein epitopes on *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale* isolates from Israel, Kenia and Unites States. *Int. J. Parasitol.* 18: 33-38.
- PALMER, G.H.; EID, G.; BARBET, A.F.; MCGUIRE, T.C. y MCELWAIN, T.F. (1994). The Immunoprotective *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 2 Is Encoded by a Polymorphic Multigene Family. *Infect. Immun.* 62: 1808-1816.
- PALMER, G.H. y MCELWAIN, T.F. (1995). Molecular basis for vaccine development against Anaplasmosis and Babesiosis. *Vet. Parasit.* 57: 233-253.

- PALMER, G.H.; RURANGIRWA, F.R.; KOCAN, K.M. y BROWN, W.C. (1999). Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Prasitology Today*. 15: 281-286.
- PALMER, G.H.; BROWN, W.C. y RURANGIRWA, F.R. (2000). Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Microbes Infect.* 2: 167-176.
- PHILIP, C.B. (1957). Family IV. Anaplasmataceae Philip fam. nov. *In: Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology*. 7th Ed. Eds. R.S. Breed, E.G.D. Murray and N.R. Smith. Williams and Wilkins Co. Baltimore, Maryland. USA, p. 980-984.
- PIERCY, P.L. (1956). Transmission of Anaplasmosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 64: 40-48.
- POST, G. y THOMAS, G.M. (1961). A study of anaplasmosis in elk. *JAVMA* 139: 357-358.
- POTGIETER, F.T. (1979). Epizootiology and control of anaplasmosis in South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 50: 367-372.
- POTGIETER, F.T. y VAN RENSBURG, L. (1980). Research communication isolation of *Anaplasma marginale* from *Rhipicephalus simus* males. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 47: 285-286.
- POTGIETER, F.T.; SUTHERLAND, B. y BIGGS, H.C. (1981). Attempts to transmit *Anaplasma marginale* with *Hippobosca rufipes* and *Stomoxys calcitrans*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 48:119-122.

- PORTGIETER, F.T.; KOCAN, K.M.; McNEW, R.W. y EWING, S.A. (1983).
Demostración de colonias de *Anaplasma marginale* en el midgut de *Rhipicephalus simus*. Am. J. Vet. Res. 44: 2256-2261.
- POTGIETER, F.T. y VAN RENSBURG, L. (1987). The persistence of colostral *Anaplasma marginale* antibodies and incidence of *in utero* transmission of *Anaplasma marginale* infections in calves under laboratory conditions. Onderstepoort J. Vet. Res. 54:557-560.
- POTGIETER, F.T. y STOLTSZ W.H. (2004.) Bovine anaplasmosis. In: Infectious Diseases of Livestock. Vol I 2nd edition. Oxford University Press Southern Africa. p. 594-616.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. y HINCHCLIFF, K.W. (2002). Enfermedades causadas por Rickettsias. En: Medicina Veterinaria. Vol II. 9na ed. española. McGraw-Hill – Interamericana de España, S. A. U. p. 1495-1500.
- REARTES, D. (2010). Situación al 2010 de la ganadería argentina. Programa Nacional de Carnes, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. p 7-13.
- REINBOLD, J.B.; COETZEE, J.F.; HOLLIS, L.C.; NICKELL, J.S.; RIEGEL, C.; OLSON K.C. y GANTA, R.R. (2010). The efficacy of three chlortetracycline regimens in the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infection. Vet. Microbiol. 145: 69-75.
- RENSHAW, H.W.; VAUGHN, H.W.; MAGONIGLE, R.A.; DAVIS, W.C.; STAUBER, E.H. y FRANK, F.W. (1977). Evaluation of free roaming mule deer as carriers of anaplasmosis in an area of Idaho where anaplasmosis is enzootic. J. A. V. M. A. 170: 334-339.

- REY VALEIRON C.; ASO P.M.; Coronado A. (2003). Prevalencia de *Anaplasma marginale* y anticuerpos específicos en becerros neonatos. *Acta Cient. Venez.* 54: 121-126.
- RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D.; GUIMARÃES, A.M.; SCATAMBURLO, M.A. y MARTINS, N.E. (1995.) Transmissão congênita da anaplasmosose bovina, *Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.* 47: 297-304.
- RIBEIRO, M.F.B. y LIMA, J.D. (1996). Morphology and development of *Anaplasma marginale* in midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* 61: 31-39.
- RÍOS, (L.G. de); AGUIRRE, D.H. y GAIDO, A.B. (1990). Infection naturelle par *Anaplasma marginale* chez deux troupeaux de bovines avec différents niveaux d'infestation par la tique *Boophilus microplus*. *Revue Élev. Méd. Vét. Pays Trop.* 43: 447-452.
- RISTIC, M. (1960). Anaplasmosis. *Adv. Vet. Sci.* 6: 111-192
- RISTIC, M. (1981). Anaplasmosis. *In: Disease of cattle in the thropics. Current topics in Veterinary Medicine and Animal Science.* Martinus Nijhoff Publisher. The Hague. Netherlands. 6: 327-344
- RISTIC, M. y CARSON, C.A. (1977). Methods of immunoprophylaxis against bovine Anaplasmosis with emphasis on the use of the attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. *In: Immunity to Blood Parasites in Animals and Man.* Eds. L. H. Miller; J. A. Pino; J. J. MaKelvery Jr. Plenum Press (New York and London) p. 151-188.
- RISTIC, M. y WATRACH, A.M. (1961). Studies in Anaplasmosis. II. Electron Microscopy of *Anaplasma marginale* in Deer. *Am. J. Vet. Res.* 22: 109-116.

- RISTIC, M. y WATRACH, A.M. (1963). Anaplasmosis. VI. Studies and a Hipotesis Concerning the Cycle of Development of the Causative Agent. Am. J. Vet. Res. 24: 267-277.
- ROBERTS, H.H. y LANCASTER, J.L. (1963). Determining susceptibility of white-tailed deer to anaplasmosis. Arkansas Farm. Res. 12: 1
- ROBERTS, S.J. (1979). Diagnóstico de preñez. En: Obstetricia Veterinaria y Patología de la Reproducción. Primera edición en castellano. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires. p 21
- RODRÍGUEZ CAMARILLO, S.D.; GARCÍA ORTÍZ, M.A.; ABOYTES TORRES, R.; CANTÓ ALARCÓN, G.J. y BARIGYE, R. (2003-2004). Inmunología e Inmunoprofilaxis de la Anaplasmosis Bovina. En: Ciencia Veterinaria. Vol. 9. Ed. Moreno Chan R. Editorial: UNAM. p 124-164.
- RODRIGUEZ VIVAS, R.I. y DOMINGUEZ ALPIZAR, J.L. (1998). Grupos entomológicos de importancia veterinaria en Yucatán, México. Rev. Biomed 9: 26-37.
- ROMANO, A. (1994). GARRAPATA. Epidemiología y control de *Boophilus microplus* en Argentina. En: Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Ed. por A. Nari y C. Fiel. Hemisferio Sur. p 301-317.
- SALABERRIA, F.F. y PINO, R. (1988). Transmisión vertical de *Anaplasma marginale* en bovinos afectados durante el período final de la gestación. Rev. Cub. Cienc.Vet. 19: 179-182.
- SAMISH, M.; PIPANO, A.; y HADANI, A. (1993). Intrastadial and interstadial transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus annulatus* ticks in cattle. Am. J. Vet. Res. 54: 411-414.

- SCHNITTGER, L.; YIN, H.; QI, B.; GUBBELS, M.J.; BEYER, D.; JONGEJAN, S.N.F. y AHMED, J.S. (2004). Simultaneous detection and differentiation of Theileria and Babesia parasites infecting small ruminants by reverse line blotting. Parasitol. Res. 92: 189-196.
- SCHOOLS, L.M.; VAN DE POL, I.; RIJKEMA, S.G.T. y SCHOT, C.S. (1999). Detection and Identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato and *Bartonella* Species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. J. Clin. Microbiol. 37: 2215-2222.
- SCOLES, G.A.; BROCE, A.B.; LYSYK, T.J. y PALMER, G.H. (2005). Relative Efficiency of Biological Transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) Compared with Mechanical Transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). J. Med. Entomol. 42: 668-675.
- SCOLES, G.A.; MILLER, J.A. y FOIL, L.D. (2008). Comparison of the Efficiency of Biological Transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: Ixodidae) with Mechanical Transmission by the Horse Fly, *Tabanus fuscicostatus* Hine (Diptera: Muscidae). J. Med. Entomol. 45: 109-114.
- SENASA. (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) (2006). Manual de Anaplasmosis y Babesiosis. [en línea] <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=874&io=3414> [Consulta 18 de Noviembre de 2011]
- SHARMA, S.P. (1988). Non-specific immunization against *Anaplasma* infection by using *Mycobacterium phlei*. Indian J. Vet. Med. 8: 125-127.

- SHKAP, V.; MOLAD, T.; FISH, L. y PALMER, G.H. (2002). Detection of the *Anaplasma centrale* vaccine strain and specific differentiation from *Anaplasma marginale* in vaccinated and infected cattle. Parasitol Res. 88: 546-552.
- SHIMADA, M.K.; YAMAMURA, M.H.; KAWASAKI, P.M.; TAMEKUNI, K.; IGARASHI, M.; VIDOTTO, O.; y VIDOTTO, M.C. (2004). Detection of *Anaplasma marginale* DNA in Larve of *Boophilus microplus* Ticks by Polymerase Chain Reaction. Ann. NY. Acad. Sci. 1026: 95-102.
- SIMPSON, F.; KLING, J.M. y LOVE, J.N. (1967). Morphologic and Histochemical Nature of *Anaplasma marginale*. Am. J. Vet. Res. 28: 1055-1065.
- SINGH, A. y GILL, G.S. (1977). A note on the prevalence of subclinical anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) in three herds of cattle and buffaloes in Punjab State. Indian J. Anim. Sci. 47: 224-226.
- SMITH T. y KILBORNE F.L. (1893). Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or Southern cattle fever. USDA Bureau of Anim Bull. 1:1-301.
- SMITH, R.D.; WOOLF, A.; HUNGERFORD, L.L. y SUNDBERG, J.P. (1982). Serologic evidence of *Anaplasma marginale* infection in Illinois white-tailed deer. J. A. V. M. A. 181: 1254-1256.
- SMITH, R.D.; LEVY, M.G.; KUHLENSCHMIDT, M.S.; ADAMS, J.H.; RZECHULA, D.L.; HARDT, T.A. y KOCAN, K.M. (1986). Isolate of *Anaplasma marginale* not transmitted by ticks. Am. J. Vet. Res. 47:127-129.
- SPÄTH, E.J.A. (1994). Estimacion de las pérdidas económicas directas producidas por la garrapata *Boophilus microplus* y las enfermedades asociadas. Therios. 23: 454-468.

- SPLITTER, E.J.; ANTHONY, H.D. y TWIEHAUSE, M.J. (1956). *Anaplasma ovis* in the United States: Experimental studies with sheep and goats. Am. J. Vet. Res. 17: 487-491.
- STICH, R.W.; KOCAN, K.M.; PALMER, G.H.; EWING, S.A.; HAIR, J.A.; y BARRON, S.J. (1989). Transstadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentor variabilis*. Am. J. Vet. Res. 50: 1377-1380.
- STILLER, D.L.; JOHNSON, W. y KUTTLER, K.L. (1983). Experimental transmission of *Anaplasma marginale* Theiler by males of *Dermacentor albipictus* (Packard) and *Dermacentor occidentalis* Marx (Acari: Ixodidae). Proceedings of the 87th Annual Meeting of the U.S. Animal Health Association. p. 59-65.
- STILLER, D.L.; KOCAN, K.M.; EDWARDS, W.; EWING, S.A. y BARRON, J.A. (1989). Detection of colonies of *Anaplasma marginale* in salivary glands of three *Dermacentor* spp. infected as nymphus or adults. Am. J. Vet. Res. 50: 1381-1385.
- SWIFT, B.L. y PAUMER, R.J. (1976). Vertical transmission of *Anaplasma marginale* in cattle. Theriogenology. 10:515-519.
- SWIFT, B.L. y PAUMER, R.J. (1978). Bovine fetal anoxia observed in pregnant beef heifers experimentally inoculated with *Anaplasma marginale*. Theriogenology. 10:395-403.
- TEBELE, N.; MCGUIRE, T.C. y PALMER, G.H. (1991). Induction of Protective Immunity by Using *Anaplasma marginale* Initial Body Membranes. Infect. Immun. 59:3199-3204.

- THE CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH (2007). Información sobre las enfermedades de los animales. *Rhipicephalus microplus*. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Garrapata del ganado del sur, garrapata del ganado bovino. [en línea] <<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/rhipicephalus-microplus.pdf>> [Consulta 18 de Noviembre de 2011]
- THEILER, A. (1910). “*Anaplasma marginale*”. The marginal points in the blood of cattle suffering from specific disease. Govt. Vet. Bacteriol. Transvaal. South Africa. p 6-64.
- THEILER, A. (1911). Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. In 1st Report of the Director of Veterinary Research. Department of Agriculture of the Union of South Africa. p 7-46.
- THOMAS, S.E.; WILSON, D.E. y MASON, T.E. (1982). *Babesia*, *Theileria*, and *Anaplasma* spp. Infecting sable antelope, *Hippotragus niger* (Harris, 1938) in Southern Africa. Onderstepoort J. Vet. Res. 49: 163-166.
- THOMPSON, K.C. y ROA, J.C. (1978). Transmisión de *Anaplasma marginale* por la garrapata *Boophilus microplus*. Rev. Inst. Colombiano Agrop. 13: 131-134.
- TORIONI DE ECHAIDE, S.; KNOWLES, D.P.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H.; SUAREZ, C.E. y MCELWAIN, T.F. (1998). Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. J. Clin. Microbiol. 36: 777-782.
- TORIONI, S. Y ECHAIDE, I. (2003). Sitio argentino de producción animal. Anaplasmosis de los bovinos. [en línea] <<http://www.produccionbovina.com/>>

[sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/parasitarias_bovinos/40-anaplasmosis_bovinos.htm](#)> [Consulta 22 de septiembre de 2011].

- TRUEBLOOD, M.S.; SWIFT, B.L. y BEAR, P.D. (1971). Bovine fetal response to *Anaplasma marginale*. Am. J. Vet. Res. 32: 1089-1090.
- UILENBRG, G.; VAN VORSTENBOSCH, C.J.A.H.V. y PERIE, N. M. (1979). Blood parasites of sheep in the Netherlands I: *Anaplasma mesaeterum* (*Rickettsiales anaplasmataceae*). Vet. Q. 1: 14-22.
- VANZINI, V.R. y RAMÍREZ, L.M. (1989). Separación de *Anaplasma centrale* de *Eperythrozoon wenyoni* y *Eperythrozoon teganodes*. Rev. Med. Vet. 70: 92-94.
- VANZINI, V.R. y RAMÍREZ, L.M. (1994). Babesiosis y Anaplasmosis Bovina. Diagnóstico, Epidemiología y Control. RIA. 25: 137-190.
- VANZINI, V.R. y RAMÍREZ, L.M. (1994b). Esterilización de bovinos portadores crónicos de *Anaplasma marginale* con una oxitetraciclina de larga acción. Memorias del VII Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias. Buenos Aires. 8-11 de noviembre de 1994. p 352.
- VIDOTTO, M.C.; MCGUIRE, T.C.; MCELWAIN, T.F.; PALMER, G.H. y KNOWLES, JR. D.P. (1994). Intermolecular Relationship of Major Surface Proteins of *Anaplasma marginale*. Infect. Immun. 62: 2940-2946.
- VISSER, E.S.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H.; DAVIS, W.C.; SHKAP, V.; PIPANO, E. y KNOWLES, JR. D.P. (1992). The *Anaplasma marginale* msp5 Gene Encodes a 19-Kilodalton Protein Conserved in All Recognized *Anaplasma* Species. Infect. Immun. 60: 5139-5144.
- WALKER, D.H. y J.S. DUMLER. (1996). Emergence of the ehrlichioses as human health problems. Emerg. Infect. Dis. 2: 18-29.

- WILSON, A.J.; PARKER, R. y TRUEMAN, K.F. (1980). Susceptibility of *Bos indicus* crossbreed and *Bos taurus* cattle to *Anaplasma marginale* infection. Trop. Anim. Health Prod. 12: 90-94.
- ZAUGG, J.L. y KUTTLER, K.L. (1984). Bovine anaplasmosis *in utero* transmission and the immunologic significance of ingested colostral antibodies. Am. J. Vet. Res., 45:440-443.
- ZAUGG, J.L. y KUTTLER, K.L. (1985). *Anaplasma marginale* infections in American bison: experimental infection and serologic study. Am. J. Vet. Res. 46:438-441.
- ZAUGG, J.L. (1985). Bovine anaplasmosis: Transplacental transmission as it relates to stage of gestation. Am. J. Vet. Res. 46:570-572.
- ZAUGG, J.L. (1986). Experimental anaplasmosis in American Bison: persistence of infections of *Anaplasma marginale* and non-susceptibility to *A. ovis*. J. Wildl. Dis. 22:169-172.
- ZAUGG, J.L.; STILLER, D.; COAN, M.E. y LINCOLN, S.D. (1986). Transmission of *Anaplasma marginale* Theiler by males of *Dermacentor andersoni*, Stiles fed on an Idaho field infected, chronic carrier cow. Am J. Vet. Res. 47:2269-2271.
- ZIMMER, P.A.; RUYBAL, P.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; SPÄTH, E.; PEREZ, A. y FARBER, M. (2010). Variabilidad genética de *A. marginale* en el noroeste de Entre Ríos. XVIII Reunión Anual. Asoc. Arg. Vet. Lab. Diag., Mercedes, Corrientes. p. 92
- ZIVKOVIC, Z.; NIJHOF, A.M.; DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K.M. y JONGEJAN, F. (2007). Experimental transmission of *Anaplasma marginale* by male *Dermacentor reticulatus*. BMC Vet. Res. 3:1-6.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	
Recolección de muestras de figorífico	Enero 2008
	Febrero 2008
	Marzo 2008
	Abril 2008
	Mayo 2008
	Junio 2008
	Julio 2008
	Agosto 2008
	Septiembre 2008
	Octubre 2008
	Noviembre 2008
	Diciembre 2008

ACTIVIDAD		
Recolección de muestras de figorífico	Enero 2009	
	Febrero 2009	
	Marzo 2009	
	Abril 2009	
	Mayo 2009	
	Junio 2009	
	Julio 2009	
	Agosto 2009	
	Septiembre 2009	
	Octubre 2009	
	Noviembre 2009	
	Diciembre 2009	

ACTIVIDAD		
Recolección de muestras de figorífico	Enero 2010	
	Febrero 2010	
	Marzo 2010	
	Abril 2010	
	Mayo 2010	
	Junio 2010	
	Julio 2010	
	Agosto 2010	
	Septiembre 2010	
	Octubre 2010	
	Noviembre 2010	
	Diciembre 2010	

Procesamiento de muestras	

