

**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA ENTRE
AISLAMIENTOS DE *Anaplasma marginale* EN UN ÁREA
ENDÉMICA DEL NORDESTE ARGENTINO**

Patricia Andrea Zimmer

Trabajo de tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al

Título de ***MAGISTER SCIENTIAE en SANIDAD ANIMAL***

Área de Sanidad Animal

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL
PLATA**

Balcarce, Argentina
Noviembre, 2009

**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA ENTRE
AISLAMIENTOS DE *Anaplasma marginale* EN UN ÁREA
ENDÉMICA DEL NORDESTE ARGENTINO**

Patricia Andrea Zimmer

.....
Ernesto Späth, MV Ph.D.
Director de Tesis

.....
Marisa Farber, Ph.D.
Co-Directora de Tesis

.....
Susana Torioni de Echaide, MV, Ms Sci. Vet.
Asesor

**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA ENTRE
AISLAMIENTOS DE *Anaplasma marginale* EN UN ÁREA
ENDÉMICA DEL NORDESTE ARGENTINO**

Patricia Andrea Zimmer

Aprobada por:

.....

Evaluador Externo

DEDICATORIA

A Juan Martín y Facundo, que estuvieron conmigo de principio a fin.

AGRADECIMIENTOS

A todos los integrantes del grupo de sanidad animal de la EEA Mercedes, en especial a mi directora de beca Dra. María Graciela Draghi y a Chela, por su apoyo incondicional en lo laboral y personal.

Al grupo de Inmunología de EEA Rafaela, en especial a la Dra. Susana Torioni de Echaide por sus enseñanzas, paciencia y su constante apoyo, y a la MV Nerina Aguirre.

Al grupo de hemoparásitos del Instituto de Biotecnología de INTA Castelar, en especial a la Dra. Marisa Farber y Dra. Paula Ruybal, por su apoyo en un área totalmente desconocida para mí.

A mi director de tesis, Dr. Ernesto Späth, por su apoyo en todas las actividades y decisiones tomadas a lo largo de toda la maestría, quien siempre supo orientarme.

Al Dr. Andrés Perez, por su disponibilidad y ayuda en el análisis estadístico.

A mis compañeros y amigos de posgrado, en especial al Roma, Lili, Mechi, Juli, Aranchis, Julia, Luciana, Nico, Felipe, Joaquín, Marita, Leandro, Pancho, Laura, Adri, Garro, Carlitos, Pablo, José con quienes compartí dos muy buenos años de mi vida.

A mis padres y hermanos, que desde la distancia siempre me apoyaron y confiaron en mi.

A Facundo, Juan Martín y Lupe, que forman parte de mi pequeña gran familia, que a pesar de las distancias siempre supimos estar cerca.

INDICE GENERAL

	Pág.
Índice de Tablas	ix
Índice de Figuras	xi
Índice de Apéndice	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xv
1. Introducción	1
2. Revisión bibliográfica	3
2.1. Anaplasmosis bovina	3
2.1.1. <i>Anaplasma marginale</i>	3
2.1.2. Patogenia	4
2.1.3. Signos clínicos	4
2.2. Epidemiología	5
2.2.1. Transmisión	5
2.2.2. Distribución geográfica	8
2.2.3. Distribución de la garrapatas <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	8
2.2.4. Estabilidad enzoótica	10
2.2.5. Fuente de infección y reservorio	12
2.2.6. Efecto de la edad	12
2.2.7. Efecto de la raza	13
2.3. Proteínas principales de superficie	13
2.3.1. MSP1	13
2.3.2. MSP2	14
2.3.3. MSP3	14
2.3.4. MSP4	14
2.3.5. MSP5	14
2.4. Diversidad Genética MSP1a	15
2.4.1. Diversidad Genética MSP1a en Argentina	17
2.5. Técnicas de diagnóstico	20
2.6. Tratamiento	21
2.7. Control	22
3. Materiales y métodos	23
3.1. Selección de establecimientos	23

3.2. Selección y muestreo de bovinos	24
3.3. Encuesta	26
3.4. Diagnóstico serológico de anticuerpos contra <i>Anaplasma spp.</i>	26
3.4.1. c-ELISA	26
3.5. Determinación de estatus epidemiológico de los establecimientos estudiados con respecto a <i>A. marginale</i>	28
3.6. Criterio para selección de muestras a ser analizadas por técnicas Moleculares	29
3.7. Técnicas moleculares	29
3.7.1. Extracción de ADN (Higuchi, R., 1989)	29
3.7.2. PCR <i>mSP5</i>	29
3.7.3. RLBH (Reverse Line Blot Hybridization)	30
3.7.3.1. PCR semianidada	30
3.7.3.1.1 Primer paso	30
3.7.3.1.2. Segundo paso	31
3.7.3.2. Hibridación del producto amplificado	32
3.7.4. Tipificación molecular de <i>A. marginale</i>	33
3.7.5. Amplificación del gen <i>mSP1α</i>	33
3.8. Secuenciación de <i>mSP1α</i>	34
3.9. Secuencia de análisis y técnicas utilizadas	34
3.10. Concordancia (<i>Kappa</i>)	35
3.11. Análisis estadístico	36
4. Resultados	38
4.1. Encuesta	38
4.2. Serológico	38
4.2.1. Estatus epidemiológico de <i>A. marginale</i>	40
4.3. Detección molecular de <i>A. marginale</i>	42
4.4. Tipificación molecular	44
4.4.1. Determinación de variantes genotípicas de <i>A. marginale</i> en los departamentos de Feliciano y La Paz	45
4.4.2. Análisis de la variación polimórfica	48
4.4.3. Variación polimórfica intra- establecimiento, en el departamento de Feliciano	49
4.5. Detección simultanea de hemoparásitos	50
4.6. Concordancia entre técnicas utilizadas en el diagnóstico	51

4.7. Otros hallazgos	52
5. Discusión	54
5.1. Caracterización epidemiológica	54
5.2. Análisis de la diversidad de los aislamientos de <i>A. marginale</i>	60
5.3. Diversidad genética intra-establecimiento, en el departamento de Feliciano	61
6. Conclusiones	63
7. Bibliografía	64
8. Apéndice	74

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructuras de repeticiones en tándem de MSP1a, número de repeticiones, lugar de origen, identificación del aislamiento y número e GenBank, para las genotipos detectados en Europa, Asia, África, América y Australia (De la Fuente, <i>et al.</i> , 2007).	16
Tabla 2. Nombre del aislamiento, N° de GenBank, Localidad y provincia de origen, nivel de infestación de <i>R. (B.) microplus</i> , genotipos y número de repeticiones en tándem, de los aislamientos de <i>A. marginale</i> realizados en seis provincias argentinas (Ruybal, <i>et al.</i> , 2009).	18
Tabla 3. Secuencias de los primers utilizados en la técnica de RLBH, con sus referencias bibliográficas.	32
Tabla 4. Tabla de contingencia 2x2 que ordena las dos variables seleccionadas (establecimientos y secuencias) y sus cuatro combinaciones posibles.	36
Tabla 5. Proporción de establecimientos y de terneros positivos a <i>Anaplasma spp.</i> mediante la técnica de c-ELISA, en tres departamentos del NO de la provincia de Entre Ríos.	39
Tabla 6. Estatus epidemiológico de anaplasmosis bovina en 10 establecimientos del NO de Entre Ríos. Tasa de inoculación (h) y tasa de infección (I) en terneros de 195 días de edad promedio obtenida a través del modelo matemático de Mahoney y Ross (1972).	41
Tabla 7. Número de terneros positivos y negativos a PCR <i>msp5 Anaplasma marginale</i> en los establecimientos de tres departamentos del NO de Entre Ríos seleccionados para el análisis molecular.	42
Tabla 8. Estatus epidemiológico de anaplasmosis bovina en el NO de Entre Ríos, considerando las muestras positivas a PCR <i>msp5</i> y negativas a c-ELISA en cinco establecimientos.	44

Tabla 9. Establecimientos y terneros de los tres departamentos del NO de Entre Ríos caracterizados según el genotipo de <i>A. marginale</i> identificado	45
Tabla 10. Genotipos de los aislamientos de <i>A. marginale</i> identificados en los cinco establecimientos analizados de los departamentos de Feliciano y La Paz	46
Tabla 11. Dos nuevos bloques de secuencias repetitivas de aislamientos de <i>A. marginale</i> en los departamentos de Feliciano y La Paz. Se utilizó la denominación de aminoácidos de una letra a fin de facilitar la comparación entre los bloques. Los asteriscos indican la identidad en los diferentes gaps y posiciones aminoacídicas con respecto al bloque de referencia (A).	47
Tabla 10. Genotipos de <i>A. marginale</i> encontrados en los cinco establecimientos de Feliciano y La Paz.	48
Tabla 13. Tabla de 2 x 2 con las cuatro combinaciones posibles entre los dos atributos seleccionados para el análisis de las variantes polimórficas.	49
Tabla 14. Genotipos, estructuras de repeticiones en tándem de MSP1 α y número de bloques detectados en muestras del establecimiento 07/30 del departamento de Feliciano.	50
Tabla 15. Resultados obtenidos para <i>A. marginale</i> en los 6 establecimientos de los departamentos de Feliciano y La Paz analizados mediante RLBH.	48
Tabla 16. Concordancia entre el c-ELISA y PCR <i>msp5</i> a partir de 291 muestras procesadas en paralelo	51
Tabla 17. Concordancia entre el c-ELISA y la RLBH a partir de 87 muestras procesadas en paralelo	52
Tabla 18. Concordancia entre la RLBH y PCR <i>msp5</i> a partir de 72 muestras procesadas en paralelo	52

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Zonificación de la distribución en la Argentina de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Fuente: SENASA, cortesía Dr. C. Mattos) 10
- Figura 2.** Área de ocurrencia de brotes de anaplasmosis en la Argentina. Fuente: Späth, *et al.*, 1994 23
- Figura 3.** Distribución espacial de los 49 establecimientos estudiados en el NO de la provincia de Entre Ríos, discriminados por el número total cabezas en el momento de la toma de muestras. 25
- Figura 4.** Secuencia de las técnicas de laboratorio utilizadas en el análisis de las muestras de sangre y suero obtenidas en los 49 establecimientos de tres departamentos del NO de la provincia de Entre Ríos 35
- Figura 5.** Porcentaje de establecimientos positivos a *Anaplasma spp.* mediante c-ELISA en tres departamentos del NO de la provincia de Entre Ríos 39
- Figura 6.** Distribución de la proporción de terneros de 195 días de edad promedio, serológicamente positivos a *A. marginale* (c-ELISA) en diez establecimientos del NO de Entre Ríos 40
- Figura 7.** Visualización de los productos de PCR *msp5* en un gel de agarosa. El control positivo y las muestras positivas se evidencian con una banda de 345 pb. 43
- Figura 8.** Visualización del tamaño de los productos de PCR de nueve muestras, control positivo, marcador de peso molecular (MW) y control negativo utilizando el marcador genotípico *msp1α*. El tamaño de las bandas observadas se encontró entre los 650 pb y 1100 pb. 44
- Figura 9.** Ubicación geográfica de los cinco establecimientos en lo que se

determinaron las variaciones polimórficas y su diferenciación según el número de genotipos encontrados para *A. marginale* en cada establecimiento. 45

Figura 10. Visualización de los resultados obtenidos para *Anaplasma spp.* en la membrana de RLBH. 51

Figura 11. Visualización de la membrana de RLBH y de los resultados obtenidos en el análisis de los géneros *Anaplasma/Ehrlichia* y *Babesia/Theileria*. 53

INDICE DE APENDICE

I.	Encuesta	71
II.	Citrato de Sodio Dihidratado	72
III.	Buffer lisis	72
IV.	Buffer PNBD	72
V.	Diseño de la membrana ISOGEN	72
VI.	Relación entre la tasa de inoculación y porcentaje de animales infectados (FAO 1984)	74
VII.	Bloques de secuencias repetitivas pertenecientes a diferentes aislamientos de <i>A. marginale</i> provenientes de América, Europa, Asia, África y Australia (De la Fuente <i>et al.</i> , 2007). Se utilizó la denominación de aminoácidos de una letra a fin de facilitar la comparación entre los bloques. Los asteriscos indican la identidad en los diferentes gaps y posiciones aminoacídicas con respecto al bloque de referencia (A). Los bloques 48 a 53 no se encuentran reportados en la bibliografía y fueron descriptos en aislamientos provenientes de Corrientes y Salta, Argentina (Ruybal, <i>et al.</i> , en prensa).	74
VIII.	Atributos (secuencias y establecimientos) y formación de los 210 pares de comparaciones.	77

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue conocer las variantes genotípicas de *Anaplasma marginale*, en rodeos bovinos en una región del noroeste de Entre Ríos con antecedentes de ocurrencia de casos clínicos de anaplasmosis. A partir de un estudio observacional se obtuvieron muestras (sangre y suero) de terneros de cuatro a ocho meses de edad, de 49 establecimientos de los departamentos de Feliciano, Federal y La Paz (n=989). Las muestras de sueros se procesaron mediante la prueba de c-ELISA y según su resultado se determinó el estatus epidemiológico de anaplasmosis para cada rodeo (Mahoney; Ross, 1972). Mediante una selección de muestras por conveniencia se analizaron por PCR *msp5* y RLBH 291 y 87 muestras de sangre respectivamente. Se evaluaron las variantes genotípicas del marcador molecular *msp1α* de *A. marginale* que presenta diferencias nucleotídicas en el número de repeticiones en tandem y en el tipo de bloque. Se determinó la variabilidad intra e inter-predio (OR). Se determinó que sólo 10 de los 49 rodeos analizados resultaron positivos a *Anaplasma* spp, y todos se encontraban en inestabilidad enzoótica, con alto o bajo riesgo de de ocurrencia de brotes de anaplasmosis. El 3,7 % (37/989), de los terneros resultó positivo en c-ELISA, mientras que de las muestras seleccionadas el 13,7 % (40/291) y el 39 % (34/87) fueron positivas en PCR *msp5* y RLBH respectivamente. Las tres técnicas mostraron muy buena concordancia ($K \geq 0,8$). Se encontraron ocho genotipos diferentes en los establecimientos de la Paz y Feliciano, de los cuales, cinco genotipos y dos bloques se describieron por primera vez en este trabajo. La variabilidad intra e inter establecimiento tuvo un Odds Ratio: 12,4 (IC 95% 5,9-25,67) y una asociación significativa (X^2 46,3; $p < 0,0001$), lo que indica que los genotipos que pertenecen al mismo establecimiento tienen mayor probabilidad de incluir secuencias iguales y la diversidad genotípica de los aislamientos no tendría una distribución al azar, sino por el contrario estaría agrupada por establecimientos. Las diferentes técnicas diagnósticas aplicadas estratégicamente, la recopilación de antecedentes y el conocimiento de la diversidad genotípica de *A. marginale* proporcionaron nueva información sobre la epidemiología de la anaplasmosis bovina en el NO de Entre Ríos.

Palabras Claves: *Anaplasma marginale*, variabilidad genética, c-ELISA, PCR, RLBH, marcador molecular, repeticiones en tandem, Odds Ratio.

ABSTRACT

The objective of this work was to study the genetic diversity of *A. marginale* in beef cattle herds in the North West of Entre Rios, province where clinical cases of anaplasmosis has frequently been reported. To establish the epidemiological status of each herd, samples from 49 cattle farms, located in 3 districts (n=989) were obtained and analyzed using c-ELISA. Convenient samples were selected to analyze blood samples using PCR $msp5$ (n=291) and RLBH (n=87). The $msp1\alpha$ gene of *A. marginale*, selected as molecular marker, was analyzed based on nucleotide differences in the number of repetitions in tandem and in the block type. The genetic variability in and between herds was also evaluated (odds ratio).

Ten of 49 herds (20,4%) resulted positive to *Anaplasma* spp. and were under enzootic instability with either high or low risk of occurrence of anaplasmosis outbreaks; 3.7 % (37/989) of calves were positive to c-ELISA, meanwhile on the selected blood samples 13.7 % (40/291) and 39% (39/87) were positives to PCR $msp5$ and RLBH respectively. The three techniques showed a high concord ($K \geq 0.8$). Eight different genotypes were identified in La Paz and Feliciano districts, five of the genotypes and two of the blocks were described for the first time in Argentina. The odds ratio in and between herds was 12.4 (IC 95% 5.999-25.67) with significant association ($X^2 46.3$; $p < 0.0001$), pointing out that genotypes identified in each herd, had higher probabilities to include identical sequences. The *A. marginale* genetic diversity would not be randomly distributed; on the contrary it would be restricted to each herd. The conclusion of this work is that the combination of different diagnostic techniques and the knowledge of *A. marginale* genetic diversity provided solid information on the epidemiology of the bovine anaplasmosis in the NW of Entre Rios, and allowed to establish the needed to implement preventive measures in this region.

Passwords: *Anaplasma marginale*, genetic variability, c-ELISA, PCR, RLBH, molecular markers, repetitions in tandem, Odds Ratio.

1. INTRODUCCION

La anaplasmosis bovina es una enfermedad infecciosa de curso agudo a crónico causada por la bacteria *Anaplasma marginale*, generalmente produce aumento de temperatura, anemia y disminución en la producción. Esta enfermedad produce importantes pérdidas económicas ya sea por disminución en la producción, costos de tratamiento o por producir la muerte de los animales (Losos, 1986; Kocan, *et al.*, 2003).

La anaplasmosis se encuentra distribuida en todo el mundo, teniendo mayor impacto económico en los países tropicales y subtropicales, debido a que está fuertemente vinculada con la presencia de varios géneros de garrapatas. En nuestro país su presencia se extiende más allá de los límites naturales de la garrapata común del ganado bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Esta garrapata tiene mayor distribución geográfica e importancia económica, existiendo reportes de casos clínicos de *A. marginale* más allá del paralelo 33° de latitud Sur, indicando que en nuestro país existiría más de un transmisor de *A. marginale* (Vanzini; Ramírez, 1994).

A. marginale se caracteriza por tener una gran proporción de su genoma destinado a la codificación de proteínas de membrana (Brayton, *et al.*, 2005), dentro de las cuales se han descrito cinco proteínas mayoritarias denominadas MSPs (de su sigla en inglés Major Surface Protein, MSP1 a MSP5), (Tebele, *et al.*, 1991). Estas proteínas interactúan con el sistema inmunitario del hospedador, pudiendo ser utilizadas con fines diagnósticos y/o para conocer más acerca de la variabilidad genética entre aislamientos de diferentes regiones.

Para el diagnóstico existen varias técnicas puestas a punto, las que pueden detectar directa o indirectamente al agente. En los últimos años el diagnóstico molecular e inmunológico ha tenido un gran avance, permitiendo detectar la presencia de la bacteria en muestras de sangre a través de la amplificación del gen que codifica para una de las proteínas de membrana (PCR del gen *msp5*), o bien detectar anticuerpos contra ella (c-ELISA) (Torioni de Echaide, *et al.*, 1998).

En cuanto a la prevención y control de la anaplasmosis, actualmente en Argentina se utilizan vacunas vivas de *A. centrale*, el cual brinda inmunidad cruzada a *A. marginale* (Guglielmone, 1980). Hasta el momento no se utilizan vacunas inactivadas o genéticamente modificadas. En los últimos años, con el avance de las técnicas moleculares que permiten identificar los genes que permiten distinguir los genotipos que caracterizan a los diferentes aislamientos y su asociación con distintas

regiones geográficas, se ha podido orientar las investigaciones hacia la búsqueda de alternativas que mejoren el diagnóstico y control de esta enfermedad. El gen *msp1α* que codifica para la proteína MSP1a, está siendo utilizado a nivel mundial (De la Fuente *et al.*, 2007) y en nuestro país como marcador genotípico (Ruybal, *et al.*, 2009).

A futuro la caracterización de nuestro país en regiones por los genotipos que presenten, nos permitiría poder trabajar de forma diferencial tanto en la prevención como en el diagnóstico de la enfermedad, mejorando los conocimientos epidemiológicos y conociendo más acerca de la dinámica de la enfermedad, permitiendo mejorar las medidas de manejo y control de la enfermedad.

Hipótesis:

La variación genética detectada entre los aislamientos de *A. marginale* provenientes de cada establecimiento es similar a la variación genética detectada entre los aislamientos de diferentes establecimientos.

Objetivo General

Conocer las variantes genotípicas de *A. marginale*, en rodeos bovinos de una región endémica, con antecedentes de ocurrencia de casos clínicos de anaplasmosis e indemne de la garrapata del bovino *R. microplus*.

Objetivos específicos

- 1) Establecer el estatus de infección de anaplasmosis en rodeos bovinos del Noroeste de Entre Ríos.
- 2) Identificar animales infectados con *A. marginale*, en los diferentes rodeos analizados, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la técnica de hibridación reversa de ADN (RLBH).
- 3) Establecer los genotipos de *A. marginale* (*msp1α*) con mayor prevalencia y su distribución en la región.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Anaplasmosis Bovina

La anaplasmosis es una enfermedad infecciosa anemizante causada por *Anaplasma marginale*, que afecta a los bovinos. Durante su fase aguda produce fiebre, pérdida de peso, disminución de la producción de leche y con frecuencia puede producir la muerte (Losos, 1986; Kocan, *et al.*, 2003).

2.1.1. *Anaplasma marginale*

En un principio *A. marginale* no fue considerada como un agente infeccioso particular, sino más bien como un estadio del ciclo de *Babesia bigemina* (Smith; Kilborne, 1893), años más tarde Theiler (1910) lo clasificó en un género nuevo de protozoo por dos razones: la ausencia de citoplasma y la similitud en algunos síntomas con otros protozoarios. Esta teoría después de varios años fue refutada, debido a que poseía similitudes en morfología y fisiología con agentes del orden Rickettsiales, se lo ubicó en la familia IV del orden Rickettsiales denominándose Anaplasmataceae (Philip, 1957). Amerault *et al.* (1973) demostraron que *A. marginale* es Gram negativo. Actualmente, y a través del análisis filogenético del fragmento 16S del ARN ribosomal, se la clasificó como una bacteria del genogrupo II de las Ehrlichias. Dumler *et al.* (2001) agruparon en la familia Anaplasmataceae a todas las especies del género *Ehrlichia*, *Cowdria*, *Wolbachia*, *Neorickettsia*, *Aegyptianella* y *Anaplasma*. También se incluyeron en el género *Anaplasma* a *Ehrlichia phagocytophila*, *E. equis*, *E. bovis*, *E. platys* y *E. granulocítica* (esta última produce afecciones en seres humanos).

Anaplasma centrale, fue descrita por primera vez por Theiler en 1911, en Sudáfrica. Este agente se caracteriza por su ubicación central o subcentral y por producir signos clínicos moderados en bovinos adultos. Fue introducido al país por Peviani en 1951, utilizándolo para inmunizar bovinos en las provincias de Salta y Buenos Aires. Fue re-aislado por Vanzini y colaboradores (1984) en la provincia de Corrientes. Actualmente se sigue utilizando *A. centrale* en una vacuna viva, debido a que posee antígenos de membrana comunes a *A. marginale* y proporcionando inmunidad cruzada.

2.1.2. Patogenia

El ingreso de *A. marginale* se produce comúnmente a través de la piel por medio de un elemento animado o inanimado que destruya la solución de continuidad de esta barrera, puede ser por medio de picaduras de artrópodos a través de su aparato bucal y/o por medio de material quirúrgico, agujas u otros elementos que intervengan en el contacto sanguíneo entre un portador del agente y un individuo no infectado. Otra vía de ingreso podría ser a través de la placenta que dependiendo de la presentación del cuadro clínico (agudo o crónico) y de la etapa de la gestación en el cual se encuentra el animal podría pasar al torrente sanguíneo del feto (Zaugg, 1985), ésta vía de transmisión y otras posibles, deberían seguir siendo estudiadas para evaluar su impacto epidemiológico.

Una vez en el huésped *A. marginale* puede encontrarse en tres estados según su tamaño y característica: como cuerpo marginal clásico, cuerpo inicial y corpúsculo de inclusión. Cuando *A. marginale* ingresa al torrente sanguíneo se encuentra como cuerpo inclusión, en dichos estadios se produce la colonización de los glóbulos rojos maduros por un proceso de endocitosis. Una vez que el cuerpo de inclusión ingresa al eritrocito continúa con un proceso de división celular por fisión binaria dando lugar a los corpúsculos iniciales que son liberados al torrente sanguíneo los que están capacitados para invadir nuevos glóbulos rojos. Los glóbulos rojos infectados sufren alteraciones a nivel de la membrana celular (ingreso y egreso de los microorganismos) y son reconocidos por el Sistema Retículo Endotelial (S.R.E.) el cual los metaboliza y elimina (Baker *et al.*, 1961). Los glóbulos rojos serían destruidos fuera de los vasos sanguíneos (hemólisis extravascular) por la acción del S.R.E. lo que explicaría la marcada anemia y la ausencia de hemoglobinuria.

2.1.3. Signos clínicos

El periodo de incubación de la anaplasmosis bovina, es de aproximadamente de 3 a 4 semanas, dependiendo de la cantidad del microorganismos que ingrese al hospedador (Ristic, 1968, en: Vanzini; Ramírez, 1994).

Es común observar: incremento de temperatura rectal progresiva que supera los 40,5 C°, anemia pronunciada con una caída muy marcada del volumen globular (inferior al 10 %), ictericia, coprostasia, orina de color oscuro por el aumento de los pigmentos biliares (sin hemoglobinuria), anorexia y depresión (Vanzini; Ramírez, 1994).

2.2. Epidemiología

La anaplasmosis es una enfermedad considerada importante económicamente por las pérdidas productivas que ocasiona (Späth, 1986), debido a la muerte de los animales, disminución en la producción de carne y leche, por aborto en hembras gestantes, costos de tratamiento y control de la enfermedad (Späth, *et al.*, 1990; Kocan, *et al.*, 2003).

2.2.1. Transmisión

La transmisión de la anaplasmosis es un tema importante en la epidemiología de ésta enfermedad, hay una gran variedad de transmisores reconocidos en el mundo, algunos actúan como vectores ya que en ellos se cumple parte del ciclo biológico, otros son transmisores mecánicos que actúan como medio de transporte de la sangre de un animal que presente el agente a uno que no lo posee (iatrogénica) y además la transmisión transplacentaria.

En muchos países a la anaplasmosis, se la vincula íntimamente con la babesiosis en el denominado “complejo tristeza”, por la similitud de las manifestaciones clínicas, sin embargo en zonas libres de garrapatas, la transmisión iatrogénica es de fundamental importancia en relación a los brotes de la enfermedad. Las garrapatas desempeñan un papel muy importante en la transmisión de la anaplasmosis bovina, sin embargo éste aspecto debe ser cuidadosamente tratado teniendo en cuenta el género de las mismas. En nuestro país la garrapata con mayor impacto productivo y la más difundida en zonas ganaderas es *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887), ésta es una garrapata de la familia Ixodidae que se caracteriza por tener un ciclo monoxeno (un huésped) cumpliendo todas sus mudas en el mismo animal, las larvas que nacen en el suelo encuentran un bovino para parasitar y en él se alimentan de 6-8 días pasando al estadio de ninfa, en 7-9 días mudan a adultos diferenciándose en machos y hembras. Los machos pueden permanecer en el huésped por 70 días copulando y alimentándose, en cambio las hembras después de la cópula y una vez ingurgitadas se desprenden del huésped para depositar los huevos en el suelo (Guglielmone, *et al.*, 2006). Si bien esta característica limita la transmisión, existen publicaciones que involucran a *R. microplus* como un posible transmisor de *A. marginale* y actualmente existen algunas controversias con respecto a este tema. Aguirre *et al.* (1994) observaron transmisión en ninfas de *R. (Boophilus) microplus* ingurgitadas con sangre de animales con un porcentaje superior al 0,3% de parasitemia. Un trabajo realizado por el grupo de salud

animal de Instituto Nacional de Tecnología (INTA) de Salta, utilizando animales infestados con dos niveles de garrapatas (*R. microplus*) sugieren que la transmisión por garrapatas puede tener menor importancia de la que se le atribuye en esta zona del país, estos y otros autores sugieren que existen varios factores que son importantes tener en cuenta cuando se habla de la transmisión de *A. marginale* y que la transmisión por *R. microplus* parece ser un punto que no tendría tanta importancia en la actualidad (de Rios, *et al.*, 1990; Coronado, 2001). Ibeiro y Lima (1996) observaron en hembras ingurgitadas de *R. microplus*, desarrollo de colonias de *A. marginale* en células intestinales. En un estudio realizado con *A. marginale* con apéndice, se infectaron dos terneros esplenectomizados, en los mismos se depositaron larvas de *R. microplus*, para su alimentación. Una vez que alcanzaron el estado de ninfas y machos adultos, fueron depositados en animales susceptibles a *A. marginale*, en los cuales no se observaron signos de la enfermedad. La observación microscópica de las células intestinales y glándulas salivales no reveló presencia de *A. marginale* con apéndice, sugiriendo que *R. microplus* no es un vector biológico de *A. marginale* (Gonçalves Ruiz, *et al.*, 2005). Hasta el momento en Argentina se ha detectado la presencia de 22 especies de *Amblyomma*, de las cuales 13 fueron asociadas a animales domésticos, 10 vinculadas con el hombre y otras asociadas a una gran variedad de animales silvestres (Gugliemone; Nava, 2006). La transmisión de *A. marginale* fue probada en *A. neumanni* (garrapata de tres huéspedes) bajo condiciones de laboratorio (Gaido, *et al.*, 1995). Nava y colaboradores (2009), demostraron una amplia distribución de *A. neumanni* en zonas ganaderas tradicionales, además garrapatas de mismo género como *A. cajennense* y *A. parvum* que están adaptadas a bovinos podría cumplir un rol presente o futuro en la transmisión de *A. marginale*. Actualmente la única garrapata del género *Dermacentor* registrada en nuestro país es *D. nitens*, que se encuentra implicada en la transmisión de *Babesia caballi*.

En América del Norte las garrapatas del género *Dermacentor spp.* son las de mayor importancia y existen diversos estudios que así lo sostienen, hasta el momento no existen evidencias de la presencia de *D. andersoni* en bovinos en nuestro país. Kocan *et al.* (1981) demostraron la transmisión transestadial en garrapatas *D. andersoni* y *D. variabilis*, así mismo se comprobó la transmisión intraestadial en machos de *D. occidentalis* y *D. albipictus* (Stiller, *et al.*, 1983). La transmisión intraestadial de *A. marginale* también fue comprobada en machos de garrapatas *D. andersoni* alimentadas con sangre de vacas portadoras, infectadas naturalmente

(Zaugg, *et al.*, 1986). Varios estudios evidenciaron la presencia de *A. marginale* en diferentes células de *Dermacentor spp.*, Stiller *et al.* (1989) observaron características morfológicas de las colonias de *A. marginale* en células de glándulas salivales de *D. andersoni*, *D. variabilis* y *D. occidentales*. Kocan *et al.* (1980) observaron *A. marginale* en células del epitelio intestinal de garrapatas en estado de ninfas y adultas de *D. andersoni* y *D. variabilis*. También se comprobó la capacidad de transmisión de *D. reticulatus* a partir de animales crónicamente infectados (Zivkovic, *et al.*, 2007). Futse *et al.* (2003) pudieron observar que la transmisión de *A. marginale* era posible en garrapatas de zonas templadas (*D. andersoni*) y en garrapatas de zonas tropicales (*R. microplus*) logrando la transmisión de dos aislamientos diferentes (St. Marie y Puerto Rico) en cada una de ellas, e identificando al agente en las glándulas salivales de las garrapatas.

Estudios en *Rhipicephalus simus* observaron la presencia de algunas colonias de *A. marginale* con matriz densa rodeadas de pequeñas partículas electro densas en células de glándulas salivales (Potgieter, *et al.*, 1983).

Smith *et al.* (1986) encontraron que la transmisión podía darse sin garrapatas tras un experimento que utilizó como vector garrapatas del género *D. variabilis* y para la infección sangre de animales con aislamientos e identificación de *A. marginale* con apéndice. Después del desafío, se observó que en los animales inoculados no fueron detectados *A. marginale* con apéndice, pero si *A. marginale* sin apéndice, sugiriendo la presencia de otro tipo de vector y/o transmisor capaces de transmitir *A. marginale* proveniente de otra fuente de infección ajena a la experimental.

Son varios los transmisores que pueden estar involucrados en la transmisión mecánica de *A. marginale*, *Stomoxys calcitrans* transmitió exitosamente éste agente partiendo de animales esplenectomizados e infectados y que presentaban un cuadro agudo (Potgieter, *et al.*, 1981). Algunas especies de *Tabanus* pueden actuar como transmisores si existe contacto sanguíneo mediante el aparato bucal entre un animal enfermo-agudo y uno sano, en el lapso de dos horas (Hawkins, *et al.*, 1982). Si bien se ha demostrado que garrapatas del género *Dermacentor* son mucho más eficaces en la transmisión de *A. marginale*, en Argentina no ha sido descripta aún especies asociadas a los bovinos, por ende se debe tener presente a estos agentes como transmisores potenciales de importancia (Scoles, *et al.*, 2005; 2008).

La transmisión transplacentaria, ocurre *in utero*, principalmente cuando la madre se infecta en el último tercio de la gestación presentando un cuadro agudo de la enfermedad (Briton, *et.al*, 1976; Ribeiro, *et. al*, 1995). En este caso la gestación

puede tener dos desenlaces posibles, que la gestación siga su curso normal y nazca un ternero normal pero infectado o bien que el cuadro agudo que se desarrolle en la madre sea muy violento y produzca el aborto por el aumento de la temperatura corporal e hipoxia fetal. También ha sido demostrada la transmisión en crías de vacas portadoras crónicas (Zaugg; Kuttler, 1984; Potgieter; Van Rensburg, 1987), aunque el mecanismo preciso de la transmisión y la importancia epidemiológica que éste tipo de transmisión pueda tener son discutidos (Ribeiro, *et al.*, 1995).

La transmisión iatrogénica, a través de elementos punzo cortantes con los cuales normalmente se realizan maniobras quirúrgicas o de manejo en los bovinos (agujas, descornadores, castradores, etc) es una posible fuente de transmisión (Kocan *et al.*, 2003).

La transmisión de *A. marginale* es un tema importante en la epidemiología de la enfermedad y hasta que no se compruebe la existencia de la transmisión transovárica en *R. microplus* y su impacto en la transmisión, en Argentina se deberá seguir investigando sobre otros posibles vectores con mayor importancia epidemiológica, ya que la presencia de anaplasmosis en nuestro país se extiende a zonas donde la garrapata común del ganado (*R. microplus*) se encuentra erradicada, sur de Entre Ríos (34° latitud Sur), Santa Fe (32° latitud Sur) y Córdoba (31° latitud Sur) lugares donde se observan casos clínicos (Vanzini; Ramírez, 1994).

2.2.2. Distribución geográfica

A. marginale se encuentre distribuida en los seis continentes y tiene preferencia por las zonas tropicales y subtropicales (Kocan, *et al.*, 2000), se ha reportado en la gran mayoría de los países de América Central y Sudamérica, siendo coincidente casi en su totalidad con la distribución de la babesiosis (Guglielmone, 1995). La anaplasmosis es considerada una enfermedad de declaración obligatoria por la OIE (http://www.oie.int/esp/maladies/es_classification2008.htm) y es endémica en Argentina, extendiéndose al sur del paralelo 33°S. Esta región es considerada libre de garrapatas (Guglielmone; Mangold, 1994).

2.2.3. Distribución de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

En nuestro país el Servicio Nacional de Sanidad y calidad Agroalimentaria (SENASA), cuenta con un Programa Nacional de Garrapatas. La regionalización del país en cuatro zonas (zona de control, zona de erradicación, zona indemne y zona

indemne natural), se realizó según las características ecológicas que permiten o no el desarrollo de *R. microplus* y la normativa vigente para dicha región.

Zona de control: Se define al territorio del país ecológicamente apto para la evolución del ciclo biológico del *R. microplus*, donde las actividades de lucha serán voluntarias, y sin existir la obligatoriedad de la erradicación se adopten medidas sanitarias tendientes a garantizar un nivel mínimo de saneamientos.

Superficie Aproximada: 74196800 has.

Nº de Cabezas 9500000

Zona de erradicación: Se define la zona del territorio del país apto para la evolución del ciclo biológico de *R. microplus*, donde los establecimientos se encuentran bajo cuarentena local y zonal en proceso de limpieza obligatoria, auditados por el estado.

Superficie Aproximada: 4358359 has.

Nº de Cabezas: 2108030.

Zona indemne: Se define al territorio del país ecológicamente libre de la presencia del parásito o aquel apto para la evolución del ciclo biológico de *R. microplus*, donde se haya ejecutado y comprobado su erradicación en todos los establecimientos y/o exista un porcentaje menor al 1% de establecimientos interdictados, en proceso de limpieza fiscalizados por SENASA.

Superficie: 29140200 has.

Nº de Cabezas: 12000000.

Zona naturalmente indemne: Se define al territorio no apto para la evolución del ciclo biológico de *R. microplus* y ecológicamente libre de garrapatas (figura 1).



Figura 1: Zonificación de la distribución en la Argentina de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Fuente: SENASA, cortesía Dr. C. Mattos).

2.2.4. Estabilidad enzoótica

La estabilidad enzoótica de un rodeo bovino se logra cuando la población completa es inmune, esto se debe a la exposición natural temprana a *A. marginale*, existiendo una gran difusión del microorganismo en el rodeo pero sin presencia de casos clínicos. La inestabilidad enzoótica se da en rodeos donde parte de los animales no se exponen al agente en edad temprana, pero si cuando son adultos, provocando la aparición de casos clínicos o brotes. La interpretación de estos conceptos es de gran importancia para la predicción de brotes y de esta forma poder controlar de la mejor manera posible el rodeo según el estado de estabilidad o inestabilidad en la que se encuentre (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1984). Este

concepto se comenzó a utilizar como una de las formas de predecir brotes de la enfermedad, bajo determinadas condiciones.

Mahoney y Ross (1972) adaptaron un modelo matemático de simulación de la malaria a la babesiosis, años después se comenzó a generalizar su utilización en trabajos de babesiosis (Mahoney, 1974; Ross; Mahoney, 1974; Späth *et al.*, 1987). Debido a que la anaplasmosis y la babesiosis comparten algunos factores importantes en la epidemiología, como pueden ser la resistencia natural durante los primeros meses de vida y la inmunidad después de la primo infección, no se encontró obstáculo para comenzar a utilizar este modelo en la anaplasmosis.

En este modelo se definen conceptos básicos para establecer la situación epizootiológica de la babesiosis a un grupo de animales y que serán de utilidad para los fines del presente trabajo:

- Tasa de Infección (I): Porcentaje o proporción de animales infectados en el rodeo (a través de análisis serológico).
- Tasa de Inoculación (h): Probabilidad promedio diaria de que un animal sea infectado con *A. marginale*.
- Edad (t): Edad de los animales expresada en días
- e: Antilogaritmo Natural
- ln: Logaritmo Natural o Neperiano

En el modelo de Mahoney y Ross (1972) se puede obtener tanto el valor de "h" como de "I" con sendas fórmulas, $I = 1 - e^{-h \cdot t}$ o $h = -\ln(1 - I)/t$, siempre y cuando se disponga de los resultados serológicos del rodeo lo que permitirá estimar el valor de "h" a la edad de nueve meses. A partir de allí se puede hacer inferencia sobre la probabilidad o no de que ocurra un brote de anaplasmosis en el rodeo. Mahoney (1972) definió como estabilidad enzoótica (EE) a los rodeos con un $h \geq 0,005$ (lo que equivaldría a que más del 75 % de los animales hubieran tomado contacto con *A. marginale*) y a inestabilidad enzoótica (IE) a los que tengan un h entre 0,005-0,0005, interpretándose que en ese rodeo entre un 12% y 75% de los animales no estuvo expuesto antes de los nueve meses de edad a *A. marginale*. Si en cambio un rodeo cuenta con un $h \leq 0,0005$ (< 12% de los animales en contacto) se considera en una situación de riesgo mínimo de contraer la enfermedad a menos que cambien ciertas condiciones como pueden ser el número de transmisores y/o vectores.

2.2.5. Fuente de infección y reservorio

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 hasta el momento se reconocen al animal enfermo (agudo) y al animal crónicamente infectado como los encargados de cumplir dicho rol.

Después de una presentación de un cuadro agudo, los animales afectados pueden transformarse en portadores crónicos que se caracterizan por tener niveles mínimos de *A. marginale* difíciles de detectar microscópicamente. Los aumentos de niveles de *A. marginale* se denominan ciclos, y ocurre cada 4-6 semanas, aumentando aproximadamente de 10^3 a 10^6 eritrocitos infectados por ml en cada ciclo, estos pueden ocurrir durante toda la vida del animal infectado (Kieser, *et al.*, 1990; Eriks, *et al.*, 1993). Durante cada una de estas ricketsemias existen variaciones en los antígenos de membrana de *A. marginale*, este mecanismo le permitiría continuar persistiendo por tiempo indeterminado en un animal (crónicamente) y no poder ser eliminado por el sistema inmunitario, permitiendo de este modo en cada nuevo ciclo la invasión y multiplicación en los glóbulos rojos (Kieser, *et al.*, 1990).

En general los animales con estas características podrían ser identificados utilizando técnicas de laboratorio que permitan detectar el ADN del agente en niveles muy bajos (Eriks, *et al.*, 1989) ya que la identificación microscópica del microorganismo no es posible. De esta manera se podrán eliminar a los animales portadores ("carriers") si nos encontramos en una zona donde la enfermedad tiene baja prevalencia o bien identificarlos y mantenerlos en el rodeo si se trata de una zona endémica como parte de la población inmune.

2.2.6. Efecto de la edad

Al igual que en la mayoría de las enfermedades el efecto de la edad es un factor epidemiológicamente importante para el desarrollo de la enfermedad. En este caso en particular la importancia radica en que la exposición temprana a *A. marginale* (antes del año de vida) es un factor determinante para la ocurrencia o no de casos clínicos cuando estos animales lleguen a la edad adulta.

Estudios realizados por Rogers, *et al.* (1978) en el Sur de Queensland, (Australia) pudieron observar en condiciones naturales que el porcentaje más alto (54,8 %) de casos clínicos de anaplasmosis se presentaban en animales adultos, siendo llamativamente inferior en animales menores de un año (6,8 %). A su vez Späth

(1986) en un estudio realizado en el valle de Lerma pudo observar un porcentaje superior de casos de anaplasmosis y babesiosis en animales con más de dos años.

2.2.7. Efecto de la raza

Debido a las grandes diferencias existentes entre las razas de origen *Bos indicus* y *Bos taurus*, se podría estimar que aquellas también existan en cuanto a la infección de *A. marginale*. Varios autores han comparado razas de estos dos orígenes y sus cruzas, y no hallaron evidencias significativas para comprobar que alguna de las dos tiene algún tipo de resistencia innata a la infección de *A. marginale* (Wilson, *et al.*, 1980; Bock, *et al.*, 1999). Otros autores pudieron observar una menor reacción a la infección por parte de los animales de origen *B. indicus*, pero esta no fueron significativas (Otim, *et al.*, 1980).

2.3. Proteínas principales de superficie

El genoma de *A. marginale* es pequeño y circular, cuenta con 1.2 - 1.6 Mb (Meeus; Barbet, 2001). El hecho de no contar con un gran tamaño genómico no es una limitante ya que posee una expresión amplia 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 y para la prevención de la anaplasmosis bovina. (Barbet *et al.*, 1999).

2.3.1. 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 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 de hospedador y también durante la transmisión por garrapatas como *D. variabilis* (Bowie, *et al.*, 2002).

2.3.2. 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; 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*.

2.3.3. MSP3

Esta proteína está codificada por una familia multigénica, su peso es de aproximadamente 86 kDa (Palmer; 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 (Alleman; Barbet, 1996).

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

2.3.5. 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 en 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).

2.4. Diversidad genética MSP1a

La secuenciación de un fragmento de la región 5' del gen *mSP1a* fue utilizada para obtener información sobre la diversidad genotípica de la Proteína Principal de Membrana alfa de los diferentes aislamientos de *A. marginale*. Las variaciones en el número de repeticiones en tándem en la porción amino terminal de la proteína MSP1a, se utiliza para caracterizar los diferentes aislamientos por su diversidad.

A nivel mundial hay descritas 85 repeticiones diferentes, a partir de diversos aislamientos de Europa, Asia, África, Australia, Estados Unidos y Latinoamérica (tabla 1). Los diferentes genotipos son identificados con el nombre del lugar del aislamiento, el país al que pertenecen y además con un código de ingreso al banco común de datos donde se registran los aislamientos (De la Fuente *et al.*, 2007).

Tabla 1: Estructuras de repeticiones en tándem de MSP1a, número de repeticiones, lugar de origen, identificación del aislamiento y número de GenBank, para los genotipos de *A. marginale* detectados en Europa, Asia, África, América y Australia (De la Fuente, et al., 2007)

Aislamiento de <i>A. marginale</i>	País de Origen	Nº de GenBank	Estructura de Repeticiones en tándem <i>msp1a</i>	Nº de Repeticiones												
Parana 3	Brazil	AY998121	<table border="1"><tr><td>τ</td><td>10</td><td>15</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Σ</td><td>B</td><td>Q</td><td>B</td><td>C</td><td></td></tr></table>	τ	10	15				Σ	B	Q	B	C		3
τ	10	15														
Σ	B	Q	B	C												
Virasoro	Argentina	AF428094	<table border="1"><tr><td>B</td><td>B</td><td>M</td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	B	B	M				5						
B	B	M														
Salta	Argentina	AF428093	<table border="1"><tr><td>F</td><td>M</td><td>M</td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	F	M	M				3						
F	M	M														
Entre Rios 1	Argentina	DQ833249	<table border="1"><tr><td>F</td><td>M</td><td>M</td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	F	M	M				3						
F	M	M														
Entre Rios 2	Argentina	DQ833250	<table border="1"><tr><td>F</td><td>M</td><td>M</td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	F	M	M				3						
F	M	M														
Entre Rios 3	Argentina	DQ833251	<table border="1"><tr><td>F</td><td>M</td><td>M</td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	F	M	M				3						
F	M	M														
Entre Rios 4	Argentina	DQ833252	<table border="1"><tr><td>F</td><td>M</td><td>M</td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	F	M	M				3						
F	M	M														
Santa Fe 37	Argentina	DQ833253	<table border="1"><tr><td>α</td><td>β</td><td>β</td><td>β</td><td>Γ</td><td></td></tr></table>	α	β	β	β	Γ		5						
α	β	β	β	Γ												
Santa Fe 43	Argentina	DQ833254	<table border="1"><tr><td>α</td><td>β</td><td>β</td><td>β</td><td>Γ</td><td></td></tr></table>	α	β	β	β	Γ		5						
α	β	β	β	Γ												
Santa Fe 50	Argentina	DQ833255	<table border="1"><tr><td>α</td><td>β</td><td>β</td><td>β</td><td>Γ</td><td></td></tr></table>	α	β	β	β	Γ		5						
α	β	β	β	Γ												
Santa Fe 59	Argentina	DQ833256	<table border="1"><tr><td>α</td><td>β</td><td>β</td><td>β</td><td>Γ</td><td></td></tr></table>	α	β	β	β	Γ		5						
α	β	β	β	Γ												
Santa Fe 111	Argentina	DQ833257	<table border="1"><tr><td>B</td><td>B</td><td>M</td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	B	B	M				3						
B	B	M														
Santa Fe 473	Argentina	DQ833258	<table border="1"><tr><td>B</td><td>B</td><td>M</td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	B	B	M				3						
B	B	M														
Santa Fe 532	Argentina	DQ833259	<table border="1"><tr><td>B</td><td>B</td><td>M</td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	B	B	M				3						
B	B	M														
Santa Fe 116	Argentina	DQ833260	<table border="1"><tr><td>B</td><td>B</td><td>M</td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	B	B	M				3						
B	B	M														
Chaco 2 var1	Argentina	DQ833261	<table border="1"><tr><td>τ</td><td>22</td><td>13</td><td>18</td><td></td><td></td></tr></table>	τ	22	13	18			4						
τ	22	13	18													
Chaco 2 var2	Argentina	DQ833262	<table border="1"><tr><td>α</td><td>β</td><td>Γ</td><td>Γ</td><td>β</td><td>β</td><td>Γ</td></tr></table>	α	β	Γ	Γ	β	β	Γ	7					
α	β	Γ	Γ	β	β	Γ										
Chaco 3 var1	Argentina	DQ833263	<table border="1"><tr><td>τ</td><td>22</td><td>13</td><td>18</td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	τ	22	13	18				4					
τ	22	13	18													
Chaco 3 var2	Argentina	DQ833264	<table border="1"><tr><td>τ</td><td>11</td><td>10</td><td>10</td><td>11</td><td>10</td><td>15</td></tr></table>	τ	11	10	10	11	10	15	7					
τ	11	10	10	11	10	15										
Chaco 5	Argentina	DQ833265	<table border="1"><tr><td>τ</td><td>10</td><td>15</td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	τ	10	15				3						
τ	10	15														
Chaco 7	Argentina	DQ833266	<table border="1"><tr><td>τ</td><td>22</td><td>13</td><td>18</td><td></td><td></td></tr></table>	τ	22	13	18			4						
τ	22	13	18													
Chaco 8	Argentina	DQ833267	<table border="1"><tr><td>τ</td><td>22</td><td>13</td><td>18</td><td></td><td></td></tr></table>	τ	22	13	18			4						
τ	22	13	18													
Cordoba 1	Argentina	DQ833268	<table border="1"><tr><td>23</td><td>24</td><td>25</td><td>26</td><td>27</td><td>27</td></tr></table>	23	24	25	26	27	27	6						
23	24	25	26	27	27											
Cordoba 2	Argentina	DQ833269	<table border="1"><tr><td>23</td><td>24</td><td>25</td><td>26</td><td>27</td><td>27</td></tr></table>	23	24	25	26	27	27	6						
23	24	25	26	27	27											
Quitilipi	Argentina	DQ833270	<table border="1"><tr><td>28</td><td>29</td><td>M</td><td>29</td><td>M</td><td>F</td></tr></table>	28	29	M	29	M	F	6						
28	29	M	29	M	F											
Mercedes	Argentina	DQ833271	<table border="1"><tr><td>23</td><td>30</td><td>31</td><td>31</td><td>31</td><td></td></tr></table>	23	30	31	31	31		5						
23	30	31	31	31												
Corrientes 7	Argentina	DQ833272	<table border="1"><tr><td>α</td><td>β</td><td>β</td><td>β</td><td></td><td></td></tr></table>	α	β	β	β			4						
α	β	β	β													
Puerto Rico	Puerto Rico	AY191826	<table border="1"><tr><td>E</td><td>Φ</td><td>Φ</td><td>Φ</td><td>Φ</td><td>Φ</td></tr></table>	E	Φ	Φ	Φ	Φ	Φ	6						
E	Φ	Φ	Φ	Φ	Φ											
Havana	Cuba	AY489564	<table border="1"><tr><td>A</td><td>B</td><td>B</td><td>B</td><td>B</td><td></td></tr></table>	A	B	B	B	B		5						
A	B	B	B	B												
Israel tailed 1FM3	Israel	AF352560	<table border="1"><tr><td>1</td><td>F</td><td>M</td><td>3</td><td></td><td></td></tr></table>	1	F	M	3			4						
1	F	M	3													
Israel tailed 12M3	Israel	AY295077	<table border="1"><tr><td>1</td><td>2</td><td>M</td><td>3</td><td></td><td></td></tr></table>	1	2	M	3			4						
1	2	M	3													
Israel non-tailed	Israel	AF352559	<table border="1"><tr><td>1</td><td>4</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	1	4					2						
1	4															
Azaria	Israel	AY846869	<table border="1"><tr><td>1</td><td>F</td><td>M</td><td>3</td><td>3</td><td></td></tr></table>	1	F	M	3	3		5						
1	F	M	3	3												
Lhavot-Habasan	Israel	AY846868	<table border="1"><tr><td>M</td><td>F</td><td>F</td><td>F</td><td></td><td></td></tr></table>	M	F	F	F			4						
M	F	F	F													
Or-Haner	Israel	AY35284	<table border="1"><tr><td>M</td><td>F</td><td>F</td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	M	F	F				3						
M	F	F														
HB-A8	China	DQ811774	<table border="1"><tr><td>19</td><td>20</td><td>19</td><td>21</td><td></td><td></td></tr></table>	19	20	19	21			4						
19	20	19	21													
Italy 30	Italy	AY702926	<table border="1"><tr><td>M</td><td>M</td><td>M</td><td>Q</td><td></td><td></td></tr></table>	M	M	M	Q			4						
M	M	M	Q													
Italy 31	Italy	AY702927	<table border="1"><tr><td>M</td><td>M</td><td>M</td><td>Q</td><td></td><td></td></tr></table>	M	M	M	Q			4						
M	M	M	Q													
Italy 32	Italy	AY702928	<table border="1"><tr><td>5</td><td>Γ</td><td>Γ</td><td>Γ</td><td></td><td></td></tr></table>	5	Γ	Γ	Γ			4						
5	Γ	Γ	Γ													
Italy 16	Italy	AY702929	<table border="1"><tr><td>5</td><td>Φ</td><td>Φ</td><td>Φ</td><td></td><td></td></tr></table>	5	Φ	Φ	Φ			4						
5	Φ	Φ	Φ													
Italy 6	Italy	AY702930	<table border="1"><tr><td>Q</td><td>M</td><td>Q</td><td>Q</td><td>M</td><td></td></tr></table>	Q	M	Q	Q	M		5						
Q	M	Q	Q	M												
Italy 8	Italy	AY702931	<table border="1"><tr><td>Q</td><td>N</td><td>N</td><td>N</td><td></td><td></td></tr></table>	Q	N	N	N			4						
Q	N	N	N													
Italy 47	Italy	AY702932	<table border="1"><tr><td>6</td><td>7</td><td>7</td><td>7</td><td></td><td></td></tr></table>	6	7	7	7			4						
6	7	7	7													
Va-48	Spain	DQ811775	<table border="1"><tr><td>40</td><td>47</td><td>47</td><td>32</td><td>C</td><td>C</td></tr></table>	40	47	47	32	C	C	6						
40	47	47	32	C	C											
Australia Darwin	Australia	AF407542	<table border="1"><tr><td>8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	8						1						
8																
Australia WA	Australia	AF407545	<table border="1"><tr><td>8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	8						1						
8																
Australia F12	Australia	AF407543	<table border="1"><tr><td>8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	8						1						
8																
Australia F72	Australia	AF407544	<table border="1"><tr><td>8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	8						1						
8																
SA12	South Africa	DQ813536	<table border="1"><tr><td>34</td><td>13</td><td>4</td><td>37</td><td></td><td></td></tr></table>	34	13	4	37			4						
34	13	4	37													
SW82	South Africa	DQ813537	<table border="1"><tr><td>34</td><td>13</td><td>4</td><td>37</td><td></td><td></td></tr></table>	34	13	4	37			4						
34	13	4	37													
SW62	South Africa	DQ813538	<table border="1"><tr><td>34</td><td>13</td><td>4</td><td>37</td><td></td><td></td></tr></table>	34	13	4	37			4						
34	13	4	37													
SW162	South Africa	DQ813539	<table border="1"><tr><td>34</td><td>13</td><td>4</td><td>37</td><td></td><td></td></tr></table>	34	13	4	37			4						
34	13	4	37													
SW134	South Africa	DQ813540	<table border="1"><tr><td>34</td><td>13</td><td>4</td><td>37</td><td></td><td></td></tr></table>	34	13	4	37			4						
34	13	4	37													
SA66	South Africa	DQ813541	<table border="1"><tr><td>34</td><td>13</td><td>4</td><td>37</td><td></td><td></td></tr></table>	34	13	4	37			4						
34	13	4	37													
SA193	South Africa	DQ813542	<table border="1"><tr><td>34</td><td>4</td><td>37</td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	34	4	37				3						
34	4	37														
SW32	South Africa	DQ813543	<table border="1"><tr><td>34</td><td>13</td><td>13</td><td>37</td><td></td><td></td></tr></table>	34	13	13	37			4						
34	13	13	37													
SA14	South Africa	DQ813544	<table border="1"><tr><td>34</td><td>F</td><td>4</td><td>H</td><td></td><td></td></tr></table>	34	F	4	H			4						
34	F	4	H													
SA10	South Africa	DQ813545	<table border="1"><tr><td>33</td><td>35</td><td>35</td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	33	35	35				3						
33	35	35														
SW29	South Africa	DQ813546	<table border="1"><tr><td>3</td><td>3</td><td>38</td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	3	3	38				3						
3	3	38														
SA71	South Africa	DQ813547	<table border="1"><tr><td>3</td><td>3</td><td>38</td><td></td><td></td><td></td></tr></table>	3	3	38				3						
3	3	38														

Tabla 2: Nombre del aislamiento, N° de GenBank, localidad y provincia de origen, estatus de infestación con *R. (B.) microplus*, genotipos y número de repeticiones en tandem, de los aislamientos de *A. marginale* realizados en seis provincias argentinas (Ruybal, *et al.*, 2009).

Aislamiento de <i>A. marginale</i>	N° Genbank	Localización	Provincia	Estatus de infestación con <i>R. (B.) microplus</i>	Estructura de Repeticiones en Tandem <i>MSP1a</i>						N° de Repeticiones	
					Σ	B	Q	B	C			
Virasoro	AF428094	Virasoro	Corrientes	Infestada	Σ	B	Q	B	C			5
Salta	AF428093	Cerrillos	Salta	Infestada	B	B	M					3
Entre Ríos 1	DQ833249	La Paz	Entre Ríos	Erradicada	F	M	M					3
Entre Ríos 2	DQ833250	La Paz	Entre Ríos	Erradicada	F	M	M					3
Entre Ríos 3	DQ833251	La Paz	Entre Ríos	Erradicada	F	M	M					3
Entre Ríos 4	DQ833252	La Paz	Entre Ríos	Erradicada	F	M	M					3
Santa Fe 37	DQ833253	Venado Tuerto	Santa Fe	Libre	α	β	β	β	Γ			5
Santa Fe 43	DQ833254	Venado Tuerto	Santa Fe	Libre	α	β	β	β	Γ			5
Santa Fe 50	DQ833255	Venado Tuerto	Santa Fe	Libre	α	β	β	β	Γ			5
Santa Fe 59	DQ833256	Venado Tuerto	Santa Fe	Libre	α	β	β	β	Γ			5
Santa Fe 111	DQ833257	Pilar	Santa Fe	Erradicada	B	B	M					3
Santa Fe 473	DQ833258	Pilar	Santa Fe	Erradicada	B	B	M					3
Santa Fe 532	DQ833259	Pilar	Santa Fe	Erradicada	B	B	M					3
Santa Fe 116	DQ833260	Pilar	Santa Fe	Erradicada	B	B	M					3

Córdoba 1	DQ833261	Río Primero	Córdoba	Erradicada	23	24	25	26	27	27		6
Córdoba 2	DQ833262	Río Primero	Córdoba	Erradicada	23	24	25	26	27	27		6
Chaco 2 var1	DQ833263	Villa Ángela	Chaco	Infestada	τ	22	13	18				4
Chaco 2 var2	DQ833264	Villa Ángela	Chaco	Infestada	α	β	Γ	Γ	β	β	Γ	7
Chaco 3 var1	DQ833265	Villa Ángela	Chaco	Infestada	τ	22	13	18				4
Chaco 3 var2	DQ833266	Villa Ángela	Chaco	Infestada	τ	11	10	10	11	10	15	7
Chaco 5	DQ833267	Villa Ángela	Chaco	Infestada	τ	10	15					3
Chaco 7	DQ833268	Villa Ángela	Chaco	Infestada	τ	22	13	18				4
Chaco 8	DQ833269	Villa Ángela	Chaco	Infestada	τ	22	13	18				4
Quitilipi	DQ833270	Quitilipi	Chaco	Infestada	28	29	M	29	M	F		6
Mercedes	DQ833271	Mercedes	Corrientes	Infestada	23	30	31	31	31			5
Corrientes 7	DQ833272	Salinas	Corrientes	Infestada	α	β	β	β				4
Corrientes 2 var1	DQ833273	Salinas	Corrientes	Infestada	53	10	10					3
Corrientes 2 var2	DQ833274	Salinas	Corrientes	Infestada	48	11	10					3
Corrientes 2 var3	DQ833275	Salinas	Corrientes	Infestada	α	49	50	51	52			5
Corrientes 2 var4	DQ833276	Salinas	Corrientes	Infestada	α	β	β	β	β	Γ		6

2.5. Técnicas de diagnóstico

Para el diagnóstico de *A. marginale* existen técnicas de detección directa (detectan al agente o a su material genético) e indirectas (detectan inmunoglobulinas).

El diagnóstico directo se basa en la observación microscópica de un extendido de sangre coloreado con la tinción de Giemsa. El diagnóstico clínico de la enfermedad, se basa en la sintomatología que caracteriza a la anemia, el incremento de la temperatura, y la determinación del volumen globular (hematocrito). En general para considerar que un individuo presenta un cuadro clínico de anaplasmosis debemos tener como mínimo un 3% de parasitemia en la observación en microscopio de inmersión de 100x (este criterio es indistinto si hablamos de animales vivos o muertos) y un hematocrito menor al 20 %. Pueden existir casos en los que la parasitemia sea inferior al 3% pero el hematocrito sea menor al 10%, debido a un efecto autoinmunitario que genera una destrucción masiva de glóbulos rojos infectados (Vanzini; Ramírez, 1994).

Para el diagnóstico indirecto se han evaluado varias técnicas capaces de detectar la presencia de anticuerpos, las más conocidas son la aglutinación en placa (AP) o card test (CT), inmuno-enzimática (ELISA), inmunofluorescencia indirecta (IFI), fijación de complemento (FC), radioinmuno ensayo (RIA), y otras como aglutinación capilar, aglutinación en látex, inmunoprecipitación en gel.

La técnica de ELISA ha sido utilizada para la detección de anticuerpos de una gran diversidad de microorganismos. Para el caso de la anaplasmosis se comenzó a ensayar desde 1980, cuando Thoen *et al.*, (1980) analizaron sueros bovinos buscando anticuerpos específicos contra *A. marginale*, comparándola con el CT y la FC. Los resultados no fueron del todo satisfactorios porque se presentaron algunas incompatibilidades en el número de animales positivos y negativos encontradas por cada una de las técnicas. Años después Palmer *et al.*, (1985) comenzaron a trabajar con una proteína de 36 kDa en diferentes aislamientos de *A. marginale*. Posteriormente se comprobó que una proteína de 86 kDa era más eficaz en la detección de anticuerpos aunque estos procedieran de vacas crónicamente infectadas (Palmer, *et al.*, 1986). Los trabajos realizados con una proteína de 19 kDa (MSP5) permitieron el diseño de un ELISA de competición (Torioni de Echaide, *et al.*, 1998) que si bien no diferencia anticuerpos de *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis*, alcanza una sensibilidad de 96% y una especificidad del 95%, en éste trabajo se obtuvieron resultados muy buenos con el uso de la proteína recombinante y se pudo establecer

que esta técnica puede ser utilizada para estudios epidemiológicos, programas de erradicación y para regular internacionalmente el movimiento de animales.

Las técnicas que detectan la presencia de ADN del agente están teniendo más auge en los últimos años, ya que permite detectar animales en fases iniciales de la enfermedad donde no es posible la detección de anticuerpos y en fases crónicas donde la rickettsemia es mínima y la detección microscópica es dificultosa.

Stich *et al.*, (1991) utilizaron la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar *A. marginale* en glándulas salivales de garrapatas *D. andersoni*. Estudios realizados por Figueroa y Buening (1995) reflejaron la importancia de la utilización de esta técnica para la epidemiología y para la toma de decisiones en cuanto a medidas de control en las enfermedades transmitidas por garrapatas o insectos hematófagos. La PCR *msp5* y la PCR anidada (nPCR) presenta una excelente sensibilidad en animales persistentemente infectados y con niveles muy bajos de *A. marginale* circulante, teniendo una buena concordancia con el c-ELISA (Torioni de Echaide *et al.*, 1998).

La Técnica de Hibridización Reversa en Línea (RLBH) es una técnica desarrollada para la detección simultánea de agentes filogenéticamente relacionados, permitiendo diferenciar géneros y especies de los microorganismos detectados. Para el diagnóstico del grupo de *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). 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 mediante sondas específicas pudiendo determinar el género y la especie a la que pertenece el agente en cuestión.

Puede ser utilizada tanto para la detección en la sangre de los huéspedes que puedan presentar alguna/s patología/s o bien diferentes células de él o los transmisores de la misma/s (Georges, *et al.*, 2001; Bekker, *et al.*, 2002).

2.6. Tratamiento

El tratamiento recomendado para la anplasmosis bovina, es la antibióticoterapia, utilizando oxitetraciclinas en razón de 10-15 mg/kg (5-10%) durante 1 a 3 días o bien una dosis de 20 mg/kg si trabajamos con drogas de larga acción (LA). Otra alternativa puede ser el uso de imidocarbo con una dosis de 2,5 mg/kg a 3,5 mg/kg. La vía de administración en ambas drogas es intra muscular (Vanzini; Ramirez, 1994).

Si el objetivo es eliminar a los portadores, en general esto solo sucede en zona libres que por alguna razón ha ingresado el microorganismo, el tratamiento se puede realizar con las mismas drogas pero con algunas modificaciones en las dosis y la frecuencia de aplicación, en el caso de la oxitetraciclina (LA) ésta se utilizan tres dosis de 20 mg/kg con intervalos de 7 días. En el caso del imidocarbo la dosis para la esterilización es 2 dosis de 5 mg/kg con 14 días de intervalo (Vanzini; Ramirez, 1994).

2.7. Control

Como se hizo mención en el punto 2.2.2. de este capítulo, es muy importante tener presente el concepto de estabilidad e inestabilidad enzoótica para poder evaluar la situación en la que se encuentra cada rodeo en particular y poder tomar las medidas de control de la enfermedad.

Una vez definido el estado epidemiológico de estabilidad o inestabilidad enzoótica del rodeo, se podrá establecer las medidas preventivas a seguir. En nuestro país ante un rodeo en inestabilidad enzoótica la alternativa de control es la vacunación, de los terneros de entre los 4 y 10 meses de edad. Actualmente se utiliza una vacuna viva que contiene *A. centrale*, microorganismo menos patógeno pero que comparten algunos antígenos y confiere inmunidad cruzada para *A. marginale* (Guglielmo, 1980). Actualmente las vacunas se elaboran en las Estaciones Experimentales Agropecuarias (EEAs) del INTA Rafaela (Santa Fe) y Mercedes (Corrientes) con certificaciones del SENASA N° 93.159 y N° 98.152 respectivamente. Estas vacunas son engorrosas en su manejo, por tratarse de sangre entera que en los glóbulos rojos contienen *A. centrale*, tienen una duración máxima de 7 días entre su elaboración y su aplicación, requieren cadena de frío y deben tener garantía de estar libre de microorganismos contaminantes. A pesar de estos factores *A. centrale* actúa como un buen inmunógeno y confiere una buena inmunidad contra *A. marginale*.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Selección de establecimientos

El objetivo de este trabajo fue conocer las variantes genotípicas de *A. marginale* en el Noroeste (NO) de la provincia de Entre Ríos. Para ello se realizó un muestreo por conveniencia, no probabilístico (Thrusfield, 1995), con el propósito de maximizar las chances de hallar bovinos infectados con *A. marginale*. Se seleccionaron establecimientos ganaderos de tres departamentos del NO de Entre Ríos: Federal, Feliciano y La Paz, correspondientes a un área no infestada por la garrapata *R. (B.) microplus* (Guglielmo, 1992), pero donde *A. marginale* está presente (Späth, *et al.*, 1994; Vanzini y Ramírez, 1994) (figura 2).

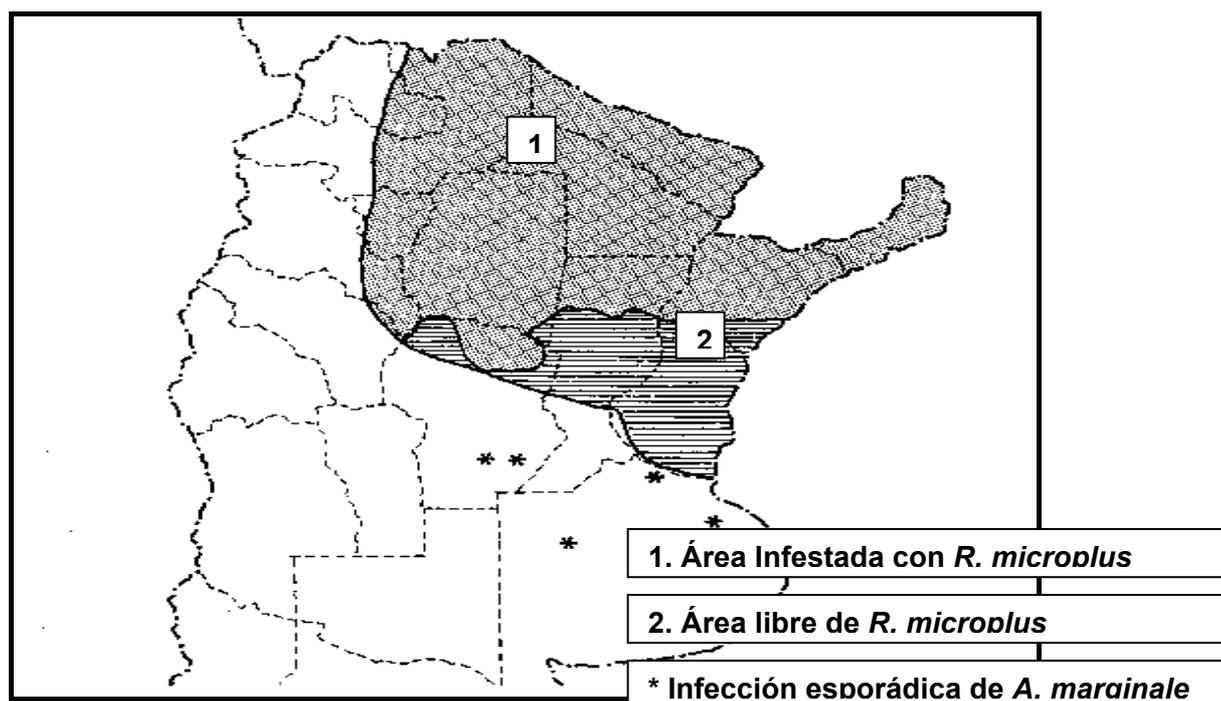


Figura 2: Área de ocurrencia de brotes de anaplasmosis en la Argentina.

Fuente: Späth, *et al.*, 1994.

Para la selección de los establecimientos se tuvo en cuenta que éstos hubieran tenido casos clínicos o brotes de anaplasmosis, o bien que se encontraran cercanos a establecimientos que los hubieran sufrido. Esta información se obtuvo a partir de

veterinarios locales o de registros de consultas de productores. de los establecimientos muestreados.

Entre octubre de 2006 y julio de 2007 se muestreó un total de 49 establecimientos: 16 pertenecientes al departamento Federal, 16 a Feliciano y 17 a La Paz. En forma simultánea se realizó una encuesta. El tamaño de los rodeos varió en un amplio rango: entre 20 y 4000 bovinos por establecimiento (Figura 5). Los rodeos muestreados se compusieron de bovinos de las razas Hereford, Aberdeen Angus, Braford, Brangus y sus cruizas con diferentes porcentajes de sangre *B. taurus* y *B. indicus*. De los 17 establecimientos que en la encuesta respondieron al ítem raza, 13 tenían su rodeo conformado con razas de origen *B. taurus* y las cuatro restantes animales con diferentes cruizas entre *B. taurus* y *B. indicus*.

3.2. Selección y muestreo de bovinos

Para poder maximizar la probabilidad de detectar al menos un animal positivo a *A. marginale* se fijó como meta obtener 24 muestras por establecimiento (rango de 14-30), tomando como parámetros una prevalencia estimada del 10% y un tamaño de la población de 80 bovinos (Win Episcopo 2.0).

$$n = \left[1 - (1 - NC)^{1/d} \right] * \left[\frac{N - d - 1}{2} \right]$$

Donde:

n: Tamaño de la muestra requerida

N: Tamaño de rodeo

d: Prevalencia estimada (10%)

NC: Nivel de confianza (0,95)

Un único establecimiento contó con solo 20 bovinos muestreados (figura 3), dado a que por razones operativas no fue posible reemplazarlo por otro con un número de cabezas superior.

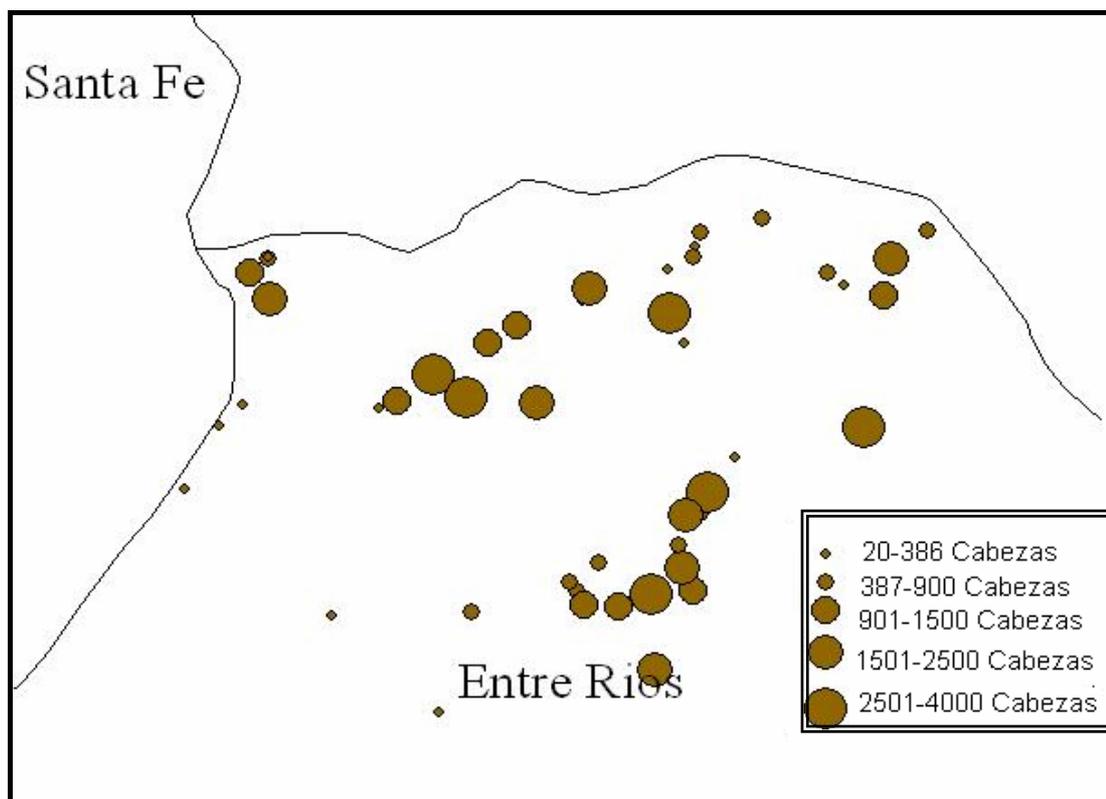


Figura 3: Distribución espacial de los 49 establecimientos estudiados en el NO de la provincia de Entre Ríos, discriminados por el número total de bovinos en el momento de la toma de muestras.

Se muestrearon terneros de 4-8 meses de edad que no hubieran sido inmunizados con vacuna conteniendo *Anaplasma spp.* y *Babesia spp.*

En todos los rodeos seleccionados se recogieron muestras de sangre con y sin anticoagulante (para obtención de suero) a través de punción de la vena yugular con aguja y jeringa descartable (una para cada ternero muestreado).

Muestras de suero: La sangre sin anticoagulante se recogió en tubos de vidrio de 10 ml. Una vez coagulada, se separaron los coágulos y los sueros fueron centrifugados a 1000xg durante 15 minutos, fraccionados y conservados a -20° C.

Muestras de sangre: La sangre con anticoagulante (1 ml 0,013 M de citrato de sodio al 3,8 %; Apéndice II) se depositó en tubos y luego de una buena homogenización se conservó a -20° C.

Se tomaron en total 989 muestras de sangre: 336 del departamento de Federal, 307 de Feliciano y 346 de La Paz.

El total de los sueros se analizaron con un ELISA de competición (c-ELISA) para: a) establecer la prevalencia intrapredio e interpredio de *Anaplasma* spp. al fin de determinar el estatus epidemiológico respecto de la anaplasmosis, y b) permitir la posterior selección de muestras y establecimientos a ser analizados por las técnicas de diagnóstico molecular.

La **Prevalencia Intrapredio** se definió como el porcentaje de terneros positivos al c-ELISA con respecto al número muestreado en cada establecimiento y la **Prevalencia Interpredio** como el porcentaje de establecimientos con por lo menos un ternero positivo al c-ELISA en relación con el total muestreado.

3.3. Encuesta

En cada establecimiento muestreado se realizó una encuesta a los propietarios o personal a fin de recabar datos generales sobre el rodeo (raza, edad de los terneros, sexo), ocurrencia o no de casos clínicos, tratamientos para control de vectores, tratamientos quimioterápicos, aplicación de medidas preventivas para anaplasmosis y métodos de diagnóstico utilizados (Apéndice I). La encuesta se realizó para recopilar datos que permitieran el análisis posterior de distintas variables vinculadas con los resultados obtenidos con las diferentes técnicas de laboratorio. Para este trabajo, así como para el muestreo, se contó con la colaboración de personal del grupo de Sanidad Animal de la EEA INTA Mercedes, Corrientes.

3.4. Diagnóstico serológico de anticuerpos contra *Anaplasma* spp.

Se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunología de la EEA INTA Rafaela, Santa Fe, mediante la técnica del c-ELISA, que posee una sensibilidad del 96% y una especificidad del 95% (Torioni de Echaide, *et al.* 1998).

3.4.1. c-ELISA

Se realizó según la descripción de 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 conjugada con peroxidasa (rMSP5-Peroxidasa) y H₂O₂-ABTS (2,2-Azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) como substrato- 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 conjugado, el AcM (AnaF16C1) no encuentra su epítopo

libre y es eliminado junto a la peroxidasa con los lavados sucesivos. Una reacción positiva se traduce en una falta de desarrollo de color.

La lectura se realizó a 450 nm en un lector de ELISA (Labsystem Multiskan RC). Los resultados obtenidos en densidad óptica (DO) se expresaron en porcentaje de inhibición (%I), en relación a un control 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). Esta reacción denominada “control de conjugado” (CC) constituye el valor de referencia del % I para los sueros problema, según la siguiente fórmula: $100 - \text{DO suero problema} \times 100 / \text{DO CC}$. Se consideró como punto de corte para diferenciar positivos y negativos un valor $\geq 28\%$ 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 de buffer Carbonato-bicarbonato 0.05 M (pH 9,6). Las placas se mantuvieron 12 hs a 25°C y luego se mantuvieron 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 0,01M y 0,05% tween-20. Luego se agregaron 50 μl de cada suero y 50 μl de PBS 0,01M -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 (H₂O₂ y ABTS) en buffer citrato 0,05M (pH=4,5) y las placas se incubaron a 28° C en agitación. A los 4 minutos se realizó la primera lectura con un filtro de 405 nm, en un sistema dinámico en donde la lectura real es realizada automáticamente cuando el CC alcanza una DO= $1,00 \pm 20\%$ con el programa SPEIA 1.03 (FAO/IAEA).

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.

3.5. Determinación del estatus epidemiológico de los establecimientos estudiados respecto de *A. marginale*.

La determinación del estatus epidemiológico se basó tanto en la definición de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1984) como en la aplicación del modelo matemático de Mahoney y Ross (1972).

La FAO considera que un rodeo es epidemiológicamente estable cuando una alta proporción de terneros (> 75 %) son inmunes naturalmente a los nueve meses de edad. Esto se cumple siempre y cuando *A. marginale* se encuentra presente en el rodeo y los animales se exponen al agente a una edad en la cual son naturalmente resistentes. La inestabilidad se produce cuando una gran proporción de animales (< 75 %) del rodeo no se expuso al agente cuando son naturalmente resistentes, por lo tanto la enfermedad ocurrirá cuando los bovinos sean adultos.

Estos conceptos y el modelo matemático fueron aplicados para *A. marginale* determinando la tasa de inoculación (I), independientemente de los transmisores de la enfermedad.

$$I = 1 - e^{-h \cdot t}$$

$$h = -1 \cdot (\ln(1 - I)) / t$$

Donde :

I: Tasa de inoculación

h: Tasa de infección

e: Antilogaritmo natural

t: Edad en días

ln: Logaritmo neperiano o natural

El modelo de Mahoney y Ross (1972) establece que:

- **Alta** $h \geq 0,005$: Estabilidad enzoótica (EE)
- **Intermedia** $h < 0,005/h > 0,0005$: Inestabilidad enzoótica (IE) Alto riesgo de ocurrencia de brotes de la enfermedad.
- **Baja** $h \leq 0,0005$: Inestabilidad enzoótica con bajo riesgo de ocurrencia de brotes de la enfermedad.

3.6. Criterios para la selección de muestras a ser analizadas por técnicas moleculares

A partir de los resultados serológicos para *Anaplasma spp.* las muestras fueron divididas en dos grupos:

Grupo positivo conformado por las muestras de los 10 establecimientos que en los distintos departamentos presentaron al menos un ternero positivo a c-ELISA (n=201 muestras).

Grupo negativo conformado por las muestras de los establecimientos sin terneros reactivos a c-ELISA, los cuales se eligieron en relación proporcional al número de rodeos seropositivos por cada departamento, y compuesto por un total de 18 establecimientos. En cada uno de éstos se seleccionaron cinco muestras al azar (n=90).

3.7. Técnicas moleculares.

La detección de *A. marginale* se realizó a partir de ADN de muestras de sangre entera. Las pruebas realizadas fueron la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridación reversa en línea (RLBH).

3.7.1. Extracción de ADN (Higuchi R., 1989)

A este fin se homogenizaron 400 µl de sangre con 800 µl de buffer lisis (0.32M Sacarosa, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM Cl₂Mg, 1% v/v Tritón X-100) (Apéndice III) y se centrifugaron 90 segundos a 13000 rpm. Se resuspendió el pellet con 800 µl y se centrifugó nuevamente. Estos lavados se realizaron hasta no visualizar hemoglobina en el sobrenadante. Luego de los lavados se resuspendió el pellet en 100 µl de buffer PNBD (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.3, 2.5mM Cl₂Mg, 0.1 mg/ml gelatina, 0.45% v/v Nonidet P40, 0.45% v/v Tween 20) (Apéndice IV) y 60 µg/ml de Proteinasa K. Los pellets resuspendidos se incubaron a 56°C durante 18 horas y posteriormente a 100°C durante 10 minutos.

3.7.2. PCR *msp5*

Para la amplificación de gen *msp5* que codifica para la proteína principal de membrana 5 (PPM), también conocida como Major Surface Protein 5 (MSP) se realizaron procedimientos y se utilizaron materiales específicos para tal fin. La preparación de la mezcla de reacción fue llevada a cabo en un cuarto previamente irradiado con luz UV y bajo campana para minimizar el riesgo de contaminaciones. La composición de la mezcla de reacción para cada muestra fue la siguiente: 10 µl buffer 5x (Promega), 2 µl dNTPs

(10mM, Promega), 0.5 µl de cada primer (20 pmol/µl) MSP5 INT FOR 5'-TACACGTGCCCTACCGACTTA-3', MSP5 EXT REV 5'- TCCTCGCCTTGCCCCTCAGA-3', 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 siendo el volumen final de reacción de 25 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 minutos a 94°C, 35 ciclos de 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 58°C y 40 segundos a 72°C con un período de extensión final de 10 minutos a 72°C .

Se utilizaron controles positivos (*A. marginale*, aislamiento Salta, experimentalmente amplificado en bovinos) y controles negativos (*B. bigemina* aislamiento S3P, *B. bovis* aislamiento M2P, agua libre de DNAsas y RNAsas).

Luego del ciclado las muestras fueron corridas en un gel de agarosa al 2% y los productos visualizados mediante la tinción con Bromuro de Etidio (Promega)

3.7.3. RLBH (Reverse Line Blot Hybridization)

Esta técnica está basada en la amplificación de ADN mediante PCR y/o PCR anidada o semianidada de muestras de sangre, y la identificación específica mediante una sonda de ADN marcada. Se amplificó un fragmento del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S. RLBH fue utilizada para a detección simultánea de varios agentes presentes en una muestra. Se comenzó con un ensayo de PCR al que se acopla una hibridación en una membrana comercial diseñada con 2 sondas de ADN que permiten identificar géneros *Anaplasma/Ehrlichia* y *Babesia/Theileria* y 36 sondas específicas (Apéndice V) que permiten diferenciar 36 especies diferentes pertenecientes a éstos géneros (Schouls *et al.*, 1999; Gubbels *et al.*, 1999).

Para llevar a cabo esta técnica fueron seleccionadas 44 muestras de 3 establecimientos del departamento de Feliciano y 43 muestras de 3 establecimientos de La Paz.

3.7.3.1. PCR semianidada

3.7.3.1.1. Primer paso

Para cada reacción se utilizaron: 2.5 µl Buffer 10x (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl, Invitrogen), 2 µl de dNTPs (10mM, Promega), 1.5 µl de Cl₂Mg (50mM, Invitrogen), 1 µl de cada set de primers externos EHR-F/EHR-R ó RLB-F/RLB-R2 , 0.125 µl de Taq polimerasa (5U/µl, Invitrogen), 11.875 µl de agua libre de DNAsas y RNAsas, y 5 µl de la muestra de ADN siendo el volumen final de reacción de 25 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 minutos a 94°C, 10 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 50°C y 1 minuto a 72°C con un período de extensión final de 5 minutos a 72°C.

Se utilizaron controles positivos (*A. marginale*, aislamiento Salta, experimentalmente amplificado en bovinos, *B. bigemina* aislamiento S3P, *B. bovis* aislamiento M2P) y negativo (agua libre de DNAsas y RNAsas).

3.7.3.1.2. Segundo paso

Para el segundo paso se partió del material obtenido en el primer paso utilizándolo como ADN templado. Para cada muestra la mezcla de reacción fue la siguiente: 5 µl Buffer 10x (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl, Invitrogen), 4 µl de dNTPs (10mM, Promega), 3 µl de Cl₂Mg (50mM, Invitrogen), 2 µl de cada set de primers internos EHR-Fint/EHR-R ó RLB-Fint/RLB-R2 (tabla 3), 0.25 µl Taq polimerasa (5U/µl, Invitrogen), 31.75 µl de agua libre de DNAsas y RNAsas, y 2 µl de los productos de PCR obtenidos del primer paso siendo el volumen final de reacción de 50 µl.

El protocolo de ciclado fue el siguiente: 3 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C con un período de extensión final de 10 minutos a 72°C

Tabla 3: Secuencias de los Primers utilizados en la técnica de RLBH, con sus respectivas referencias bibliográficas.

Primer	Secuencia	Tm (°C)	Referencia bibliográfica
RLB-F	5'-GAGGTAGTGACAAGAAATAACAATA-3'	50.7	Gubbels, <i>et al.</i> , 1999
RLB-Fint	Biotina-5'-GACAAGAAATAACAATACRGGGC-3'	53.1	Schnittger, <i>et al.</i> , 2004
RLB-R2	Biotina-5'-CTAAGAATTTACCTCTGACAGT-3'	52.2	Georges, <i>et al.</i> , 2001
HER-F	5'-AGAGTTGGATCMTGGYT CAG-3'	54.3	Bekker, <i>et al.</i> , 2002
HER-Fint	Biotina-5'-GGCTCAGAACGAACGCTG-3'	56.5	Lab. Hemoparásitos IB
HER-R	Biotina- 5'-CGGGATCCCCAGTTTGCCGGGACTTYTTCT-3'	56.5	Bekker, <i>et al.</i> , 2002

3.7.3.2. Hibridación del producto amplificado

A partir de 40 µl de los productos de PCR obtenidos en el punto 3.7.3.1.2., se llevó a cabo la incubación de cada muestra con 150 µl de SSPE 2x (20mM Na₂HPO₄*2H₂O, 0.36M NaCl, 2mM EDTA pH 7.4) en presencia de SDS 0,1% a 100°C durante 10 minutos para desnaturalizar el ADN. Luego de dicha incubación las muestras fueron colocadas inmediatamente en hielo con el fin de evitar la renaturalización de los productos de PCR.

Por otro lado, se lavó la membrana (ISOGEN) a temperatura ambiente en 250 ml de SSPE 2x/SDS 0,1% en agitación durante 5 minutos, se colocó en el minibloter extrayendo el buffer residual de cada una de las ranuras y se cargaron 150 µl de las muestras en cada una de ellas. La hibridización se llevó a cabo a 42°C. Al cabo de 1 hora se aspiraron las muestras de las ranuras, se retiró la membrana del minibloter y se realizaron dos lavados con 250 ml de buffer SSPE 2x/SDS 0,5% en agitación durante 10 minutos a 52°C y 42°C respectivamente. Se llevó a cabo una incubación con estreptavidina peroxidasa

(Calbiochem, 1:4000 en buffer SSPE 2x/SDS 0,5%) a 42°C durante 30 minutos en agitación. Luego de la incubación con el conjugado se realizaron 2 lavados con 250 ml de SSPE 2x/SDS 0,5% durante 10 minutos a 42°C y en agitación. Debido a que el SDS interfiere en el proceso de revelado de la membrana se lavó 2 veces con 250 ml de buffer SSPE 2x durante 5 minutos en agitación y a temperatura ambiente.

Finalmente, se incubó la membrana con el reactivo quimioluminiscente (ECL, Amersham Biosciences) durante 1 minuto en oscuridad y se la expuso a un film (Hyperfilm ECL, Amersham) durante 5 minutos en oscuridad.

3.7.4. Tipificación molecular de *A. marginale*

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 tándem de 1 a 10 veces. En función de esta característica y a la fuerte presión de selección bajo la que se encuentra por el sistema inmunitarios del huésped es que esta proteína resulta en un valioso marcador de diversidad genotípica de *A. marginale*.

Para la amplificación de gen *msp1 α* que codifica para la proteína principal de membrana 1 a, se realizaron procedimientos y se utilizaron materiales específicos para tal fin.

3.7.5. Amplificación del Gen *msp1a*

A partir de ADN purificado se realizó la PCR-*msp1 α* utilizando para cada reacción, 5 μ l de buffer 10x (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl, Invitrogen), 4 μ l de dNTPs (10mM, Promega), 3 μ l Cl_2Mg (50mM, Invitrogen), 1 μ l de cada primer (20 pmol/ μ l) MSP1a1 5'-ACCTCCGAGTAGTCTACCTTCGTT-3', MSP1a2 5'-TGCATAAGCACGAGTCGTATGGAG-5', 0.25 μ l Taq polimerasa (5U/ μ l Invitrogen), 31.75 μ l de agua libre de DNAsas y RNAsas y 5 μ l de la muestra de ADN siendo el volumen final de reacción de 50 μ l.

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 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 59°C y 1 minuto a 72°C con un período de extensión final de 10 minutos a 72°C.

Se utilizaron controles, positivo (*A. marginale*, aislamiento Salta, experimentalmente amplificado en bovinos) y negativo (agua libre de DNAsas y RNAsas).

Luego del ciclado las muestras fueron corridas en un gel de agarosa al 1% y los productos visualizados mediante la tinción con 0,025 M Bromuro de Etidio (Promega)

3.8. Secuenciación de *msp1α*

Las muestras positivas para *msp1a* fueron secuenciadas utilizando el Dye Terminador 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 (SourceForge Project).

3.9. Secuencia de análisis y técnicas utilizadas

Las diferentes técnicas utilizadas no fueron realizadas en simultáneo, la técnica de c-ELISA fue utilizada como tamiz para el análisis del total de las muestras de suero (n=989), a partir de ésta técnica se conformaron dos grupos, positivos (n=206) y negativos (n=85) a dicha técnica. A las muestras de sangre de estos dos grupos se les realizó PCR *msp5* (n=291), y a partir de allí se seleccionaron muestras para realizar RLBH (n=87), y además PCR *msp1*(n=41) a las muestras positivas, de las cuales fueron secuenciadas gran parte de las positivas (n=21). En la Figura 4 se esquematiza la secuencia de los análisis realizados.

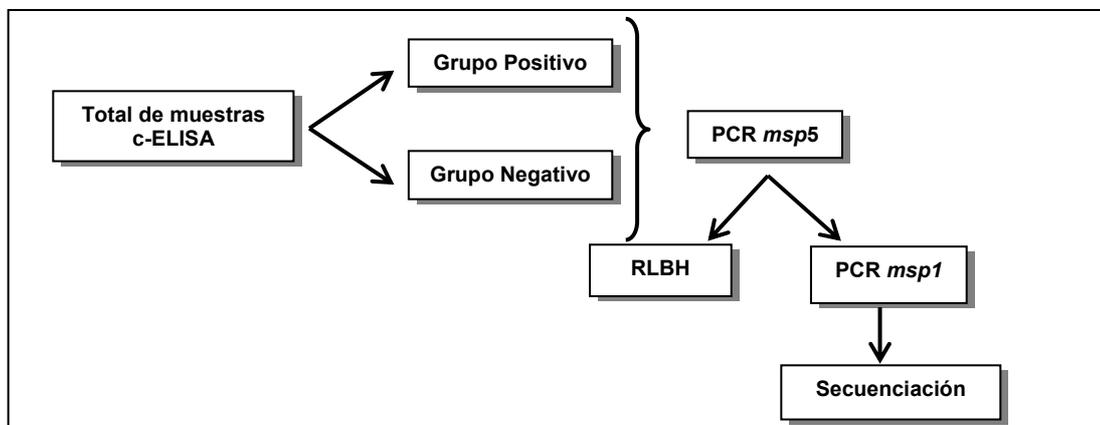


Figura 4: Secuencia de las técnicas de laboratorio utilizadas en el análisis de las muestras de suero y sangre obtenidas en 49 establecimientos de tres departamentos del NO de la provincia de Entre Ríos.

3.10. Concordancia (Kappa)

La concordancia o conformidad entre dos técnicas diagnósticas es conocida también como Kappa de Cohen (Norman y Streiner, 2000). Es una medida de asociación entre técnicas de diagnóstico que estima su grado de concordancia permitiendo, cuando ella es buena, la selección de la más conveniente en función de costos, complejidad, tiempo y equipamiento que demanda su realización, etc.

La concordancia entre dos técnicas se obtiene con la siguiente fórmula:

$$Kappa: \frac{\frac{a + b}{N} - \frac{Ea + Eb}{N}}{1 - \left(\frac{Ea + Eb}{N} \right)}$$

A partir del valor obtenido a partir de la fórmula del *Kappa* se pueden establecer varios niveles de concordancia:

- *Kappa* 1: Concordancia perfecta.
- *Kappa* 0: No existe concordancia.
- *Kappa* entre 0,4-0,5: Concordancia moderada.
- *Kappa* entre 0,5-0,6: Concordancia aceptable.
- *Kappa* entre 0,6-0,8: Concordancia buena.
- *Kappa* superior a 0,8: Concordancia muy buena.

El Kappa se utilizó para medir la concordancia entre las tres técnicas utilizadas con fin diagnóstico. Las comparaciones se realizaron entre; c-ELISA/PCR *msp5*, c-ELISA/RLBH y entre PCR *msp5*/RLBH.

3.11. Análisis estadístico

Serología: Con los datos obtenidos con el c- ELISA se calculó la prevalencia interpredio e intrapredio expresadas en porcentajes.

Secuencias: Para evaluar el grado de asociación entre las variantes polimórficas detectadas y los establecimientos de los cuales provenían, se analizaron las secuencias y su procedencia.

A partir de las secuencias obtenidas se realizó la comparación de todas y cada una de ellas, formando pares de secuencias, teniendo en cuenta dos variables, **similitud o diferencia de secuencias y pertenencia o no al mismo establecimiento**. Se utilizó un análisis no paramétrico, agrupando los datos en una tabla de contingencia de 2 x 2 (tabla 4) para un estudio de tipo transversal porque el trabajo se realizó en un momento concreto de tiempo.

El grado de asociación entre las dos variables seleccionadas (secuencias y establecimientos) se calculó mediante el OR (odds ratio o razón de las proporciones) con el programa Win Episcope 2.0.

Tabla 4: Tabla de contingencia 2x2 que ordena las dos variables seleccionadas (establecimientos y secuencias) y sus cuatro combinaciones posibles.

		Establecimientos		
		Iguales	Diferentes	Total
Secuencias	Iguales	A	B	A + B
	Diferentes	C	D	C + D
	Total	A + C	B + D	T

$$OR: \frac{A/C}{B/D} = \frac{A*D}{B*C}$$

Interpretación del Odds Ratio:

- **OR = 1** no existe asociación entre un factor y el evento analizado.
- **OR > 1** la asociación es positiva, hay agrupamiento.
- **OR < 1** la asociación es negativa, hay sobre dispersión.

4. RESULTADOS

4.1. De la Encuesta

El principal objetivo de la encuesta fue para caracterizar a los establecimientos y de los rodeos muestreados (ver apéndice I), para un posterior análisis de posibles factores de riesgo. Pese a ser confeccionada en forma sencilla y práctica, un alto porcentaje de establecimientos no se contaban al momento de toma de muestras con propietario/personal que pudieran dar respuesta idónea a los ítems de la encuesta. Por ende la mayoría de los datos recabados se utilizaron solo de forma descriptiva (nombre y ubicación geográfica del establecimiento, propietario, número de cabezas, edad de los terneros, raza y tipo de actividad ganadera).

La falta de respuestas a varios ítems en más de la mitad de las encuestas fue el factor limitante para utilizar en un análisis posterior los datos recogidos.

La edad promedio de los terneros pertenecientes a establecimientos con reactores serológicos a *Anaplasma spp.* fue de 195 días.

4.2. Serológicos

Los resultados de la serología indicaron exposición previa a *A. marginale* en la población bovina de los tres departamentos del NO de la provincia de Entre Ríos en que se trabajó. El 20,4 % de los establecimientos estudiados tuvieron al menos un ternero con anticuerpos circulantes contra *Anaplasma spp.*, mientras que el 3,7 % (IC 95%:1,18; rango 2,6 a 4,9%) de los terneros resultaron positivos a c-ELISA (tabla 5).

Tabla 5: Proporción de establecimientos y de terneros positivos a *Anaplasma spp.* mediante la técnica de c-ELISA, en tres departamentos del NO de la provincia de Entre Ríos.

Depto.	Establecimientos			Terneros		
	Analizados	Positivos		Analizados	Positivos	
	n	n	%	n	n	%
Federal	17	1	5,9	346	1	0,3
Feliciano	16	3	18,8	307	13	4,2
La Paz	16	6	37,5	336	23	6,8
Total	49	10	20,4	989	37	3,7

La Tabla 5 muestra que la proporción de establecimientos positivos varió entre los distintos departamentos con valor mínimo en Federal, ubicado en área continental de la provincia y valor máximo en La Paz, departamento ubicado en riberas de los ríos Paraná y Guayquiraró (figura 5). Estas diferencias tuvieron correlato en la proporción de terneros positivos a *Anaplasma spp.* en los distintos departamentos (tabla 5).

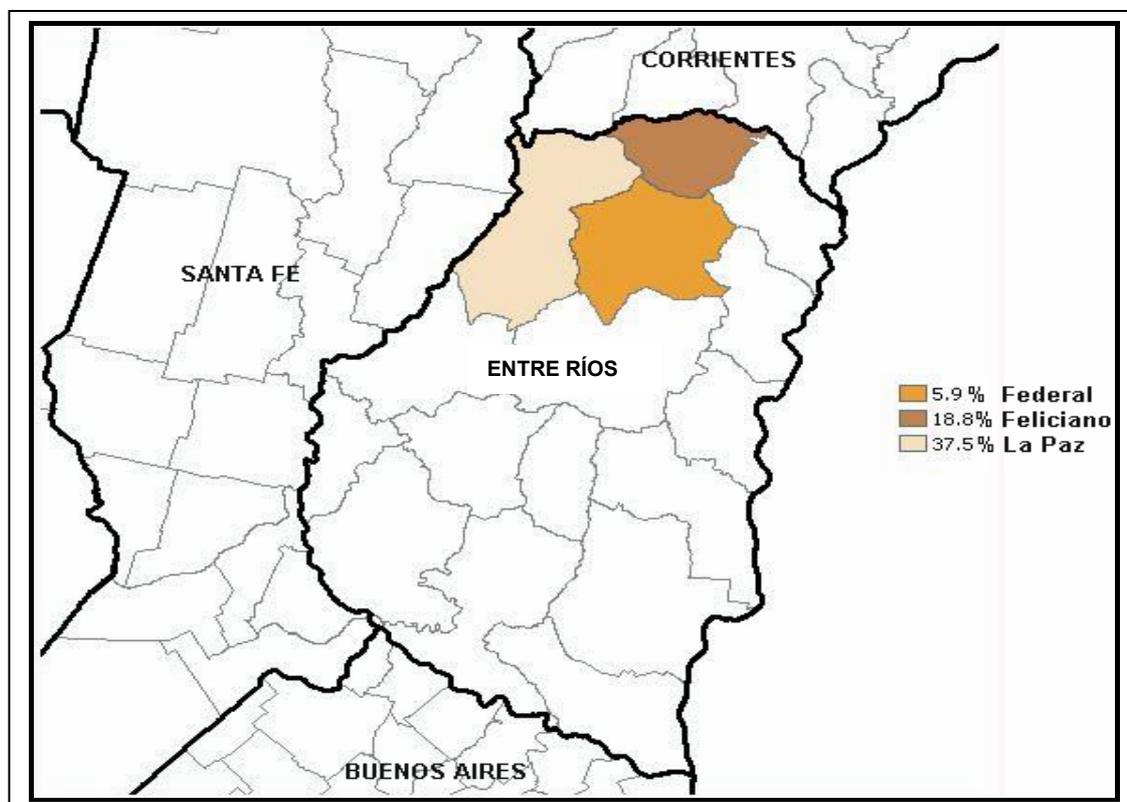


Figura 5: Porcentaje de establecimientos positivos a *Anaplasma spp.* mediante c-ELISA en tres departamentos del NO de la provincia de Entre Ríos.

La Figura 6 muestra la proporción de terneros positivos a *Anaplasma* spp. en los 10 establecimientos a los que pertenecían. El valor máximo (60%) correspondió al departamento de La Paz.

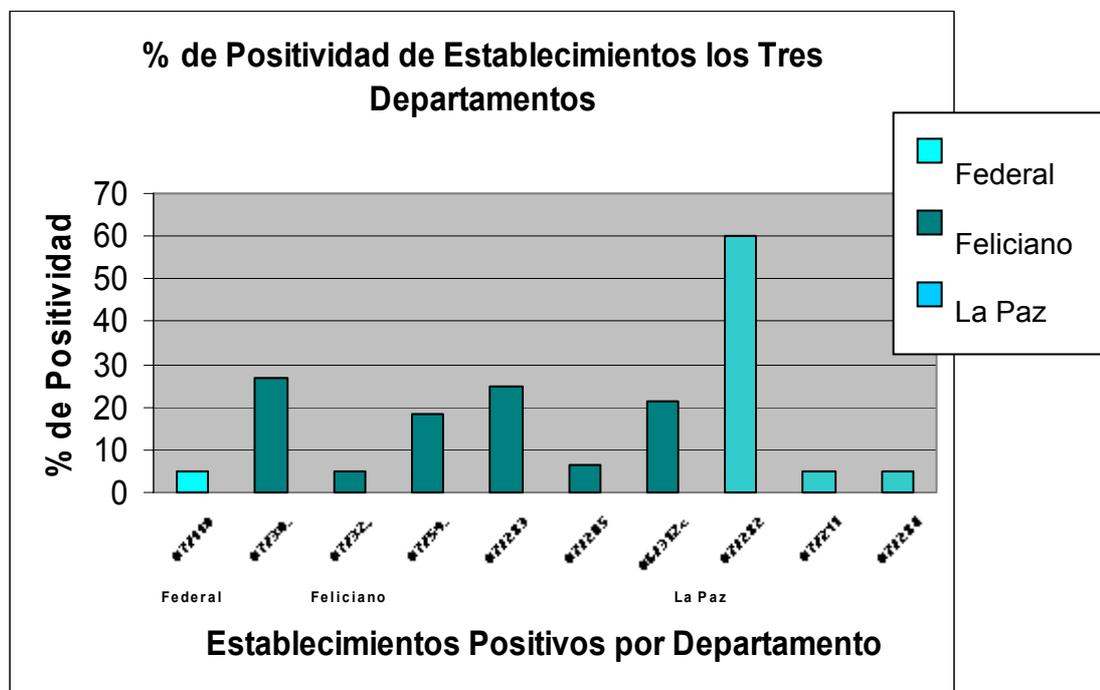


Figura 6: Distribución de la proporción de terneros de 195 días de edad media, serológicamente positivos a *A. marginale* (c-ELISA) en diez establecimientos del NO de Entre Ríos.

4.2.1. Estatus epidemiológico de *A. marginale*.

La Tabla 6 muestra el estatus de los diez establecimientos con terneros reactivos a c-ELISA.

Tabla 6: Estatus epidemiológico de anaplasmosis bovina en 10 establecimientos del NO de Entre Ríos. Tasa de inoculación (h) y tasa de infección (I) en terneros de 195 días de edad media obtenida a través del modelo matemático de Mahoney y Ross (1972).

Establecimiento	Departamento	n	Edad (días)	Positivos		I	h	Estatus	Riesgo	I Estimada a 270 días *
				n	%					
07/118	Federal	20	225	1	5	0,05	0,000228	IE	Bajo	0,06
07/30	Feliciano	30	150	8	27	0,26	0,002068	IE	Alto	0,42
07/32	Feliciano	20	150	1	5	0,05	0,000342	IE	Bajo	0,09
07/59	Feliciano	20	225	4	20	0,20	0,000992	IE	Alto	0,23
07/283	La Paz	20	225	5	25	0,25	0,001279	IE	Alto	0,29
07/205	La Paz	16	225	1	6	0,06	0,000287	IE	Bajo	0,07
06/312c	La Paz	14	210	3	21	0,21	0,001148	IE	Alto	0,27
07/282	La Paz	20	225	12	60	0,60	0,004072	IE	Alto	0,66
07/211	La Paz	20	225	1	5	0,05	0,000228	IE	Bajo	0,06
07/284	La Paz	20	225	1	5	0,05	0,000228	IE	Bajo	0,06

Los valores de las tasas de inoculación (I) calculados para cada establecimiento (rodeo) positivo, comparados con la I crítica (Apéndice VI) indicaron que todos los rodeos estaban en inestabilidad enzoótica al momento de la toma de las muestras. Cinco de ellos presentaron un I entre el 5-6 % ubicándolos como rodeos con baja probabilidad de ocurrencia de brotes de la enfermedad. Los cinco restantes presentaron un I entre el 20-60 % estableciéndose como rodeos con riesgo alto de ocurrencia de brotes de anaplasmosis.

4.3. Detección molecular de *A. marginale*

Mediante la PCR se logró amplificar un fragmento de 345 pb del gen *msp5* que codifica para la proteína de membrana MSP5 (del inglés, Major Surface Protein) (figura 7). Cuarenta (13,7%) de las 291 muestras seleccionadas (según detalle en punto 3.6) resultaron positivas a la PCR *msp5* (tabla 7), las cuales correspondieron a los departamentos de Feliciano y La Paz.

Tabla 7: Número de terneros positivos y negativos a PCR *msp5* *Anaplasma marginale* en establecimientos de tres departamentos del NO de Entre Ríos seleccionados para el análisis molecular.

Depto	Establecimientos			Terneros	
	Estatus de Infección	n	PCR <i>msp5</i> Positivos	n	PCR <i>msp5</i> Positivos
Federal n=16	+	1	0	20	0
	-	2	0	10	0
Feliciano n=16	+	3	3	56	17
	-	5	0	25	0
La Paz n=17	+	6	6	130	22
	-	11	0	50	1
Total		28	9	291	40

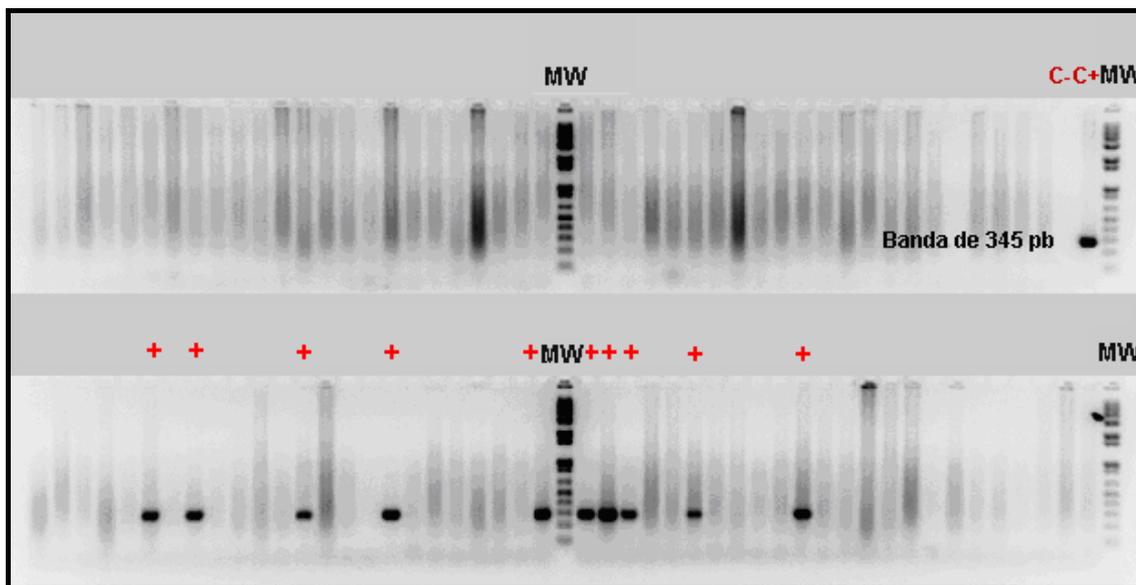


Figura 7: Visualización de los productos de PCR *msp5* en un gel de agarosa. El control positivo y las muestras positivas se evidencian con una banda de 345 pb.

MK: Marcador de Peso Molecular (Molecular Weight Marker)

C+: Control Positivo

C-: Control Negativo

+: Muestras Positivas

Tres muestras que habían sido positivas c-ELISA fueron negativas a la PCR *msp5* y, por el contrario, siete muestras negativas a c-ELISA resultaron positivas a PCR *msp5*. Estas últimas se distribuyeron en cinco establecimientos, encontrándose entre una y dos muestras positivas a PCR *msp5* en cada uno. En estos cinco casos se re-calculó el h incorporando las muestras positivas a PCR *msp5* para el análisis. En ninguno de los establecimientos dicha incorporación modificó su estatus epidemiológico o la situación de riesgo para brotes de anaplasmosis (tabla 8).

Tabla 8: Estatus epidemiológico de anaplasmosis bovina en el NO de Entre Ríos, considerando las muestras positivas a PCR *msp5* y negativas a c-ELISA en cinco establecimientos.

Establecimiento	Depto	n	Edad (días)	Positivos		I	h	Estatus	Riesgo
				n	%				
07/30	Feliciano	30	150	10	33	0,33	0,003482	IE	Alto
07/32	Feliciano	20	150	2	10	0,10	0,000702	IE	Bajo
07/59	Feliciano	20	225	6	30	0,30	0,001585	IE	Alto
07/282	La Paz	20	225	13	65	0,65	0,004665	IE	Alto
07/284	La Paz	20	225	2	10	0,10	0,000468	IE	Bajo

4.4. Tipificación molecular

Se analizó la variación del marcador de genotipo *msp1α* entre y dentro de los establecimientos analizados. A fin de demostrar dicha variación fue necesario hacer comparaciones entre todas las secuencias encontradas teniendo en cuenta su procedencia. Se amplificaron fragmentos únicos entre 650 pb a 1100 pb, la variabilidad genética fue constatada por la amplificación de las secuencias *msp1α* de diferentes tamaños y el análisis de la secuencia (figura 8).

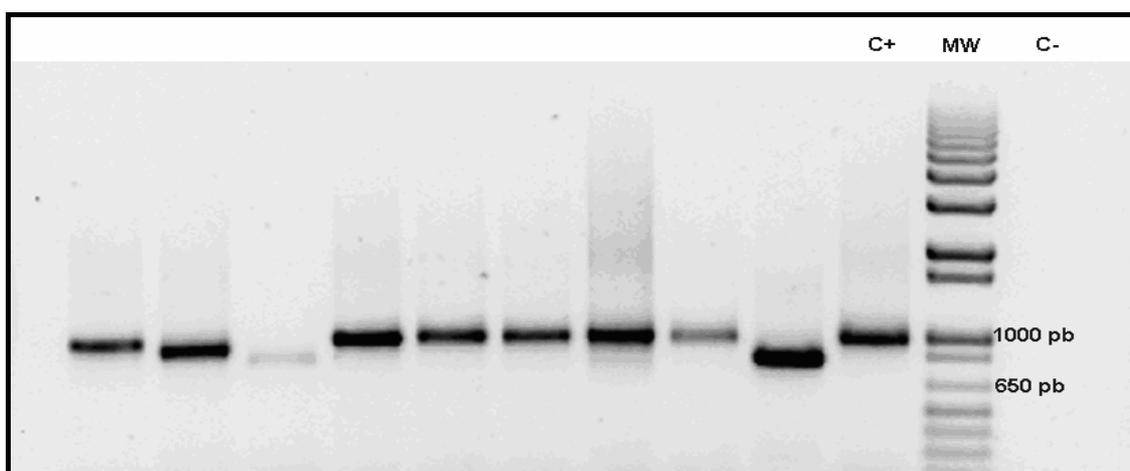


Figura 8: Visualización del tamaño de los productos de PCR de nueve muestras, control positivo, marcador de peso molecular (MW) y control negativo utilizando el marcador genotípico *msp1α*. El tamaño de las bandas observadas se encontró entre los 650 pb y 1100 pb.

MW: Marcador de Peso Molecular (Molecular Weight Marker)

C+: Control Positivo

C-: Control Negativo

Para la caracterización genotípica se analizaron 41 muestras mediante PCR *msp1α*, de las cuales 40 fueron positivas a PCR *msp5* y la restante negativa a esta técnica pero positiva a c-ELISA (Dpto. Federal). Treinta (73%) de las muestras analizadas resultaron positivas a PCR *msp1α* (tabla 9).

Tabla 9: Establecimientos y terneros de los tres departamentos del NO de Entre Ríos caracterizados según el genotipo de *A. marginale* identificado.

Depto	Establecimientos			Terneros		
	Total n	Analizados n	PCR <i>msp1</i> α Positivos	Total n	Analizados n	PCR <i>msp</i> α Positivos
Federal	16	1	0	336	1	0
Feliciano	16	3	2	307	17	11
La Paz	17	6	5	346	23	19
Total	49	10	7	989	41	30

4.4.1. Determinación de variantes genotípicas de *A. marginale* en los departamentos de Feliciano y La Paz.

Se analizaron 21 secuencias pertenecientes a cinco establecimientos. Los genotipos de los diferentes aislamientos se describieron según el número de bloques y la secuencia de los mismos en la región amino terminal de la proteína. El análisis de las secuencias de los diferentes fragmentos amplificados por PCR*msp1α* reveló la presencia de ocho genotipos diferentes, (G1 a G8) compuestos por dos a cinco bloques de repeticiones (tabla 10).

Tabla 10: Genotipos de los aislamientos de *A. marginale* identificados en los cinco establecimientos analizados de los departamentos de Feliciano y La Paz.

Genotipos	Estructura de Repeticiones en Tándem de MSP1 α	N $^{\circ}$ Genbank	n	Establecimientos	Departamentos
G1	F-M-M	DQ833249 DQ833250 DQ833251 DQ833252	7	07/59 y 07/282	Feliciano/La Paz
G2	τ -10-10		1	07/59	Feliciano
G3	α - β - β - β - Γ	DQ833253 DQ833254 DQ833255 DQ833256	5	07/30	Feliciano
G4	B-Q-C		1	07/30	Feliciano
G5	τ -73		1	07/30	Feliciano
G6	23-31-31		2	07/282 y 07/284	La Paz
G7	72-10-3		1	07/283	La Paz
G8	τ -22-13-18	DQ833261 DQ833266 DQ833267	3	07/283	La Paz
Total	8		21	5	2

La secuencia de nucleótidos obtenida del producto de PCR es traducida y analizada a fin de determinar el número y la variación de los bloques. Los bloques de repeticiones descritos por primera vez en este trabajo se detallan en la Tabla 11, mientras que los descritos hasta el momento se encuentran enumerados en el apéndice VII.

Tabla 11: Dos nuevos bloques de secuencias repetitivas de aislamientos de *A. marginale* en los departamentos de Feliciano y La Paz. Se utilizó la denominación de aminoácidos de una letra a fin de facilitar la comparación entre los bloques. Los asteriscos indican la identidad en los diferentes gaps y posiciones aminoacídicas con respecto al bloque de referencia (A).

Bloque de repetición	Secuencia de aminoácidos	Origen
A	DDSSSASGQQQESSVSSQSE-ASTSSQLG--	Bloque de Referencia
72	T*****L*P*GQ*****VG	La Paz
73	A*****L***DQ*****S***	Feliciano

Cada genotipo detectado, fue hallado en un animal diferente. En uno de los establecimientos se detectó un sólo genotipo, en los restantes más de un genotipo por establecimiento (figura 9).

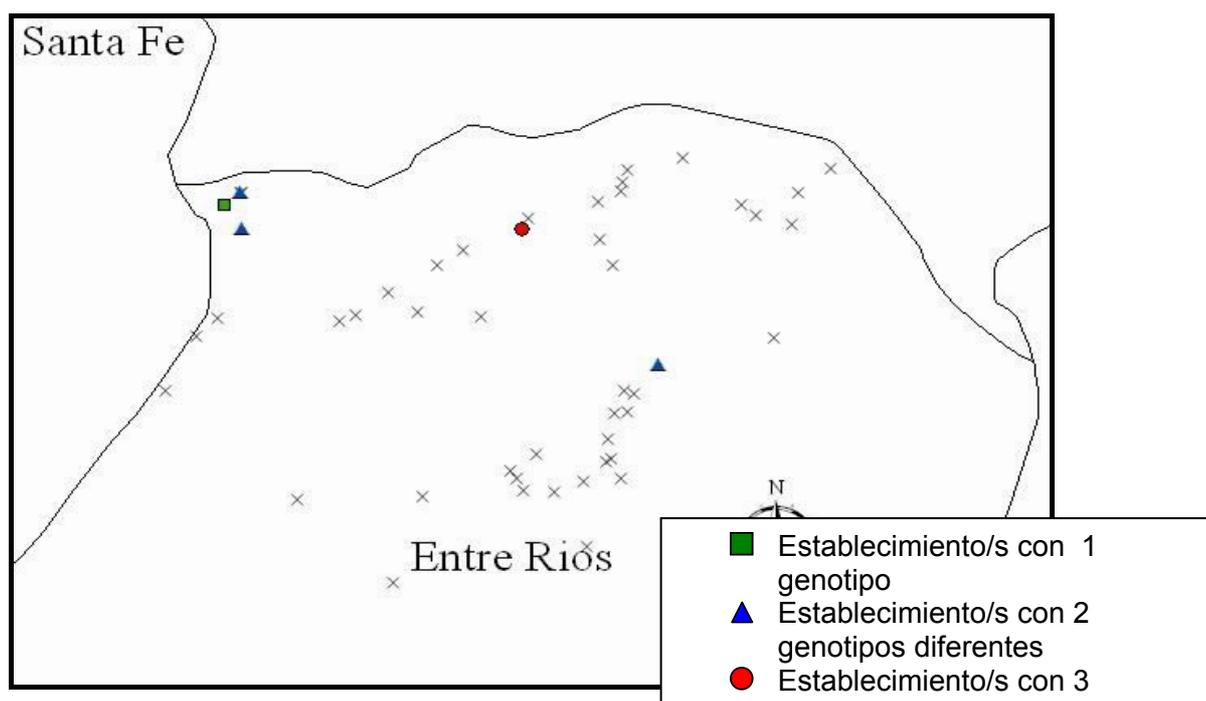


Figura 9: Ubicación geográfica de los cinco establecimientos en los que se determinaron las variaciones polimórficas y su diferenciación según el número de genotipos encontrados para *A. marginale* en cada establecimiento.

A diferencia de los restantes, el genotipo 1 (F-M-M) estuvo presente en aislamientos provenientes de dos departamentos (Feliciano y La Paz). El genotipo 3 (α - β - β - Γ) fue encontrado en cinco terneros de un establecimiento de Feliciano. Los genotipos 2 (τ -10-10), 4 (B-Q-C) y 5 (τ -73) estuvieron presentes sólo en aislamientos correspondientes al departamento de Feliciano, estos tres genotipos y los genotipos 6

(23-31-31) y 7 (72-10-3) se describen por primera vez en este trabajo. Los bloques 72 y 73 son dos nuevas variables de bloque también descritos por primera vez en este trabajo.

El genotipo 8 (τ -22-13-18) y los genotipos 6 (23-31-31) y 7 (72-10-3) sólo se encontraron en aislamientos provenientes del departamento de La Paz. Finalmente el genotipo 8 (τ -22-13-18), se identificó en el departamento de La Paz con la misma frecuencia que el G1 siendo ambos los más frecuentes.

En la Tabla 12 se resumen los distintos genotipos y los establecimientos de los cuales procedieron. Se observa que para cada establecimiento se identificaron entre uno y tres genotipos diferentes.

Tabla 12: Genotipos de *A. marginale* encontrados en los cinco establecimientos de Feliciano y La Paz.

Establecimientos	Procedencia	Genotipos Identificados		
07/59	Feliciano	G1	G2	
07/30	Feliciano	G3	G4	G5
07/284	La Paz	G6		
07/283	La Paz	G7	G8	
07/282	La Paz	G1	G6	

4.4.2. Análisis de la variación polimórfica

Para evaluar el grado de asociación entre las variantes polimórficas detectadas y su procedencia se analizaron las 21 secuencias provenientes de cinco establecimientos (tabla 10) a fin de determinar similitudes o diferencias.

Se formaron pares considerando dos atributos: secuencias y establecimientos. Se realizó un total de 210 comparaciones (Apéndice VIII).

Secuencias: Secuencias Iguales (**0**) o Secuencias Diferentes (**1**).

Establecimientos: Establecimientos Iguales (**0**) o Establecimientos Diferentes (**1**).

A partir de los datos obtenidos se confeccionó una tabla de contingencia de 2 x 2 (tabla 13).

Tabla 13: Tabla de 2 x 2 con las cuatro combinaciones posibles entre los dos atributos seleccionados para el análisis de las variantes polimórficas.

		Establecimientos		
		Iguales	Diferentes	Total
Secuencias	Iguales	22	13	35
	Diferentes	21	154	175
	Total	43	167	210

Se plantearon las siguientes hipótesis:

H_0 = La probabilidad de detectar un genotipo en un establecimiento es **igual** a la probabilidad de encontrarlo en un establecimiento diferente.

H_1 = La probabilidad de detectar un genotipo en un establecimiento es **mayor** a la probabilidad de encontrarlo en un establecimiento diferente.

Se realizó un estudio transversal, calculándose el OR para medir el grado de asociación entre los dos atributos, utilizando el programa Win Episcopo 2.0. Se obtuvo un Odds Ratio: 12,4 (IC 95% 5,999-25,67) con una asociación significativa (X^2 46,3; $p < 0,0001$). Al ser OR un valor que supera a uno, se rechaza la H_0 debido a que la distribución de las secuencias en los establecimientos no es al azar. Hallándose agrupamiento de secuencias en los establecimientos analizados. Es decir que hay 12,4 veces más probabilidad de encontrar genotipos iguales dentro de un establecimiento que entre establecimientos.

4.4.3. Variación polimórfica intra- establecimiento, en el departamento de Feliciano.

En el establecimiento 07/30, se caracterizaron genotípicamente (MSP1α) siete muestras. Se encontraron tres genotipos diferentes, de los cuales dos se describen por primera vez en este trabajo (G4 y G5). Fueron detectados un total de ocho bloques diferente (tabla 14).

Tabla 14: Genotipos, estructuras de repeticiones en tándem de MSP1 α y número de bloques detectados en muestras del establecimiento 07/30 del departamento de Feliciano.

Nº de muestras	Genotipos detectados	Estructura de Repeticiones en Tándem de MSP1 α	Nº de Bloques
1	G3	α - β - β - β - Γ	5
2	G3	α - β - β - β - Γ	5
3	G3	α - β - β - β - Γ	5
4	G3	α - β - β - β - Γ	5
5	G3	α - β - β - β - Γ	5
6	G4	B-Q-C	3
7	G5	τ -73	2

4.5. Detección simultanea de hemoparásitos

A partir del análisis con RLBH se encontró que de las 87 muestras analizadas, 34 (39%) resultaron positivas. De los seis establecimientos analizados cinco tuvieron por lo menos un positivo a RLBH, dos pertenecientes al departamento de Feliciano y tres a La Paz (tabla 15).

Tabla 15: Resultados obtenidos para *A. marginale* en los 6 establecimientos de los departamentos de Feliciano y La Paz analizados mediante RLBH.

Depto	Establecimientos			Terneros		
	Total n	Analizados n	Positivos <i>A. marginale</i>	Total n	Analizados n	Positivos <i>A. marginale</i>
Federal	16	-	-	336	-	-
Feliciano	16	3	2	307	44	14
La Paz	17	3	3	346	43	20
Total	49	6	5	989	87	34

El RLBH fue la única prueba diagnóstica aplicada en este trabajo que permitió comprobar la presencia de *A. marginale* y *A. centrale* simultáneamente (figura 10).

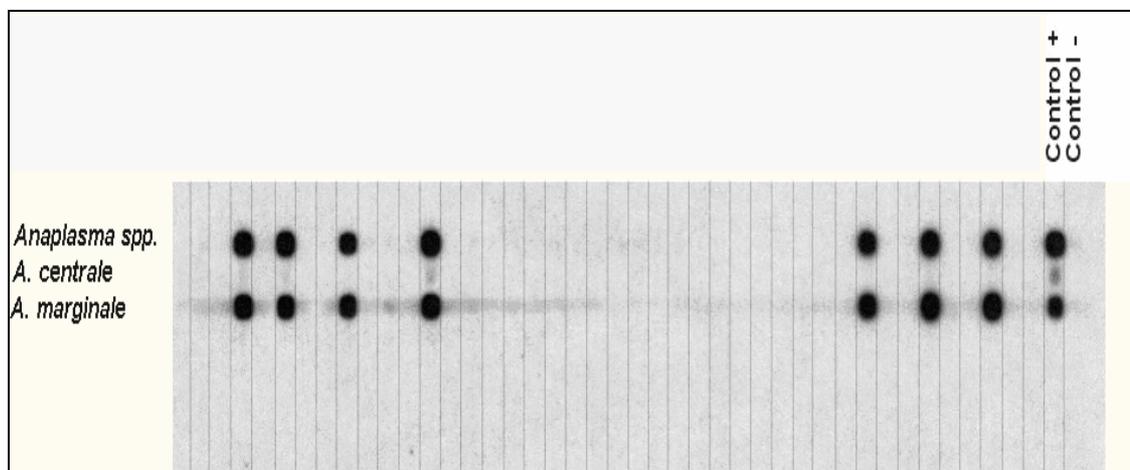


Figura 10: Visualización de los resultados obtenidos para *Anaplasma spp.* en la membrana de RLBH.

4.6. Concordancia entre técnicas utilizadas en el diagnóstico

El grado de concordancia que se observó entre las técnicas de c-ELISA y PCR *msp5* fue calculado sobre un n= 291 ya que fue el número de muestras analizadas por las dos técnicas paralelamente. Se observó muy buena concordancia con un *Kappa* estimado de 0,822 (IC 95% 0.708-0.937) $p < 0,000001$ (tabla 16).

Tabla 16: Concordancia entre el c-ELISA y PCR *msp5* a partir de 291 muestras procesadas en paralelo.

		c-ELISA		
		Positivos	Negativos	Total
PCR <i>msp5</i>	Positivos	33	5	38
	Negativos	7	246	253
	Total	40	251	291

Sobre un total de 87 muestras analizadas con c-ELISA y RLBH, se estimó un valor de *Kappa* de 0,830 (IC 95% 0,620-1,040) $p < 0,00001$, una muy buena concordancia (tabla 17).

Tabla 17: Concordancia entre el c-ELISA y la RLBH a partir de 87 muestras procesadas en paralelo.

c-ELISA				
RLBH		Positivos	Negativos	Total
	Positivos	30	4	34
	Negativos	3	50	53
	Total	33	54	87

Sobre un total 72 muestras fueron analizadas en forma paralela con la técnica de PCR *msp5* y RLBH, se obtuvo un valor de concordancia *Kappa* de 0,872 (IC 95% 0,642-1,103) $p < 0,00001$, se observó muy buena concordancia (tabla 18).

Tabla 18: Concordancia entre la PCR *msp5* y la RLBH a partir de 72 muestras procesadas en paralelo.

PCR <i>msp5</i>				
RLBH		Positivos	Negativos	Total
	Positivos	21	1	22
	Negativos	3	47	50
	Total	24	48	72

4.7. Otros hallazgos

En el análisis de las muestras con la técnica de RLBH se pudo detectar la presencia de otra especie de *Anaplasma* como *A. centrale* y también otros agentes como *Ehrlichia spp.* y/o *Babesia spp.* (figura 11).

Cinco de las 87 muestras analizadas resultaron positivas a *Ehrlichia omatjenne*, de las cuales dos también fueron positivas a *A. marginale*. Un total de 47 muestras fueron detectadas como positivas a *Babesia/Theileria spp.*, 23 de ellas en el departamento de Feliciano y 24 en el departamento de La Paz. Esta técnica no permitió completar el diagnóstico de estos protozoarios a nivel de género/especie (figura 11).

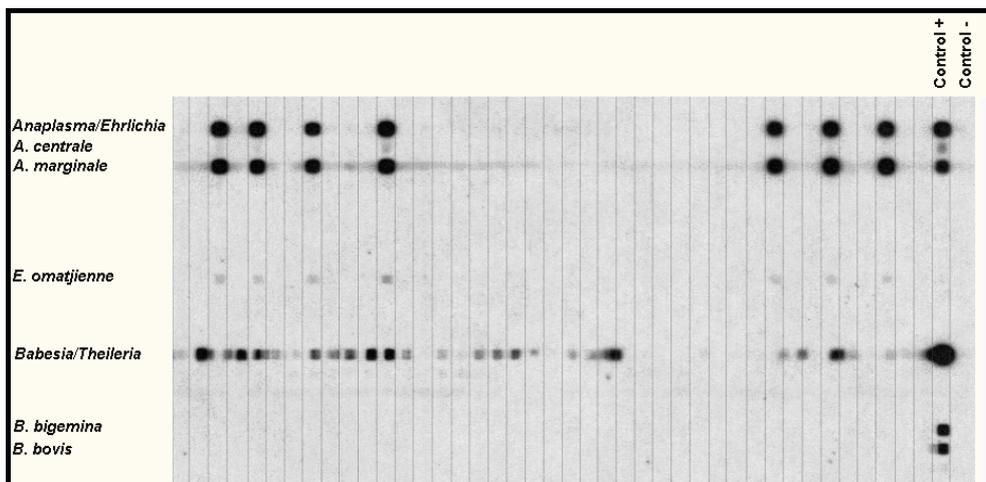


Figura 11: Visualización de la membrana de RLBH y de los resultados obtenidos e el análisis de los géneros *Anaplasma/Ehrlichia* y *Babesia/Theileria*.

Si bien estos hallazgos excedieron los objetivos del trabajo, se considera importantes mencionarlos ya que, por ejemplo, en nuestro país no existen referencias previas de *E. omatjenne*.

5. DISCUSIÓN

Este trabajo tuvo como objetivo general, conocer las variantes genotípicas de *A. marginale*, en rodeos bovinos de una región con antecedentes de ocurrencia de casos clínicos de anaplasmosis e indemne de la garrapata del bovino *R. microplus*.

5.1. Caracterización epidemiológica

Para la caracterización epidemiológica se utilizó la evaluación serológica de anticuerpos y la detección molecular de *Anaplasma spp.*, lo que permitió establecer el estatus de infección de los rodeos y seleccionar las muestras positivas para la posterior caracterización genotípica de los aislamientos de *A. marginale*, y su relación según su procedencia y estatus epidemiológico.

Los bovinos analizados provenían de rodeos que de acuerdo a la encuesta no habían recibido en su calendario sanitario vacunas que contuvieran *A. centrale*. Por lo tanto, dado que c-ELISA no permite diferenciar anticuerpos generados por *A. centrale* de aquellos inducidos por *A. marginale* (Moland, *et al.*, 2006), se asumió que los anticuerpos detectados mediante c-ELISA se debían a la primo-infección con *A. marginale* y no a una reacción cruzada con *A. centrale*.

El NO de Entre Ríos, es considerado una zona de ocurrencia de brotes de *A. marginale*. El hecho de que diez (20,4%) de los 49 rodeos resultaron positivos al c-ELISA, indicaría una baja circulación del agente en los meses previos al muestreo, con una consecuente baja tasa de infección de *A. marginale* en los establecimientos de esta zona endémica.

Los diez rodeos positivos, presentaron diferente prevalencia (figura 6), encontrándose todos en inestabilidad enzoótica (IE). Si estas condiciones se mantuvieran en este grupo etario durante la edad adulta, en estos rodeos podría ocurrir brotes de anaplasmosis ya que una importante proporción de bovinos no presentaría inmunidad. Para la ocurrencia de brotes en esta región se requiere de la convivencia de bovinos susceptibles con bovinos portadores y de la transmisión mecánica ya sea a través de insectos hematófagos o por vía iatrogénica. Se debe considerar también que esta transmisión se podría dar cuando los bovinos comparten aguadas, mangas o corrales durante las prácticas rurales, o alguna etapa del proceso productivo.

En los tres departamentos donde se realizó éste estudio fueron detectados rodeos con animales positivos a c-ELISA (tabla 5). Mientras que en el departamento

de Federal con ubicación continental, se detectó un sólo rodeo positivo con un 5% de prevalencia, en el departamento de La Paz con una ubicación a la ribera de dos cursos de agua permanente, el Río Paraná y el Río Guayquiraró, se observaron seis rodeos positivos con un rango de prevalencia que varió entre el 5 y el 60 %. Los registros de precipitaciones diarias de ambos departamentos mostraron una diferencia de 10 mm de promedio en 15 años (1992-2007). El período de muestreo de este trabajo, abarcó desde la primavera de 2006 al invierno de 2007 (octubre2006-julio2007), las precipitaciones registradas en estos períodos fueron similares en los departamentos de Federal y Feliciano (130 mm promedio) mientras que en el departamento de La Paz se registraron 29 mm más (159 mm promedio), según datos de la Dirección de Hidráulica de Entre Ríos (http://www.hidraulica.gov.ar/gis_googleearth.php). La diferencia tanto entre el número de rodeos positivos, como en el número de bovinos positivos, podría deberse a las condiciones climáticas más propicias para el desarrollo de insectos hematófagos en los departamentos ubicados a la ribera de los ríos. El departamento de La Paz localizado en la ribera de dos ríos y con el mayor registro de precipitaciones, fue donde se detectó el mayor número de rodeos positivos (n=6) y la mayor prevalencia de anaplasmosis (60%)

La determinación del estatus epidemiológico surgida del modelo matemático de Mahoney y Ross (1972), reflejó situaciones epidemiológicas diferentes tanto entre establecimientos como entre departamentos. La tasa de inoculación encontrada en los departamentos de la Ribera, varió entre 0,05 y 0,6 para el departamento de La Paz y entre 0,05 y 0,26 para el departamento Feliciano, situándolos en inestabilidad enzoótica con alto o bajo riesgo de ocurrencia de brotes en ambos departamentos, restringiendo esta calificación a la generación analizada (tabla 4). Para el departamento de Federal, de localización continental se observó sólo un establecimiento con una tasa de inoculación de 0,05, con un solo ternero positivo y bajo riesgo de ocurrencia de brotes. Este caso podría estar incluido dentro del error aceptado de c-ELISA ya que su sensibilidad y especificidad no alcanza el 100%.

En rodeos de zonas endémicas para *A. marginale*, indemnes para *R. microplus* y con presencia de portadores, la transmisión a través de insectos hematófagos como *Stomoxys calcitrans* (Potgieter, *et al.*, 1981) y varias especies de *Tabanus* (Hawkins, *et al.*, 1982), podrían cumplir un papel importante en la transmisión, sobre todo dentro del establecimiento.

Los Tábanos tendrían una limitante espacial para la transmisión de *A. marginale* entre bovinos de diferentes rodeos, ya que es poco probable que recorran

distancias superiores a los 25 m, en caso de que sufrieran alguna interrupción durante su alimentación. Por lo general cada evento comienza y termina en el mismo animal (Barros; Foil, 2007). Su papel en la transmisión dentro del establecimiento sería otro, ya que los bovinos podrían encontrarse a menos distancia. La transmisión iatrogénica, a través de elementos punzo-cortantes con los cuales normalmente se realizan maniobras quirúrgicas o de manejo en los bovinos como las agujas, descornadores, castradores y otros elementos, son una posible fuente de transmisión de anaplasmosis (Kocan *et al.*, 2003, Abdala, *et al.*, 1992). Para la ocurrencia de brotes, deberíamos contar por lo tanto con la presencia de animales susceptibles y portadores de *A. marginale* dentro del rodeo. Estas dos formas de transmisión no tendría el mismo valor epidemiológico entre rodeos independientes, a menos que se realizaran actividades compartidas entre bovinos de diferentes rodeos.

La baja proporción de rodeos infectados por *A. marginale* y la baja prevalencia detectada en los rodeos del NO de Entre Ríos, área endémica sin presencia de garrapatas, contrasta con la situación epidemiológica de anaplasmosis encontrada en áreas con presencia de garrapatas. Mtshali, *et al.* (2007) en un área endémica de Sudáfrica, encontraron entre un 44-88 % de bovinos mayores de un año positivos a c-ELISA, con varias especies de garrapatas implicadas como vectores (Dreyer, *et al.*, 1998). Asimismo, los estudios realizados por De la Fuente, *et al.* (2007), en un área endémica de Palermo (Sicilia), también en animales mayores de un año, reveló entre un 62-100 % de animales positivos a c-ELISA, con al menos seis especies de garrapatas involucradas en la transmisión de *A. marginale*. En un área del sudoeste del Chaco, Argentina donde la garrapata *R. microplus* es endémica, se realizó un estudio para determinar el riesgo de ocurrencia de brotes de babesiosis y anaplasmosis en terneros entre 4 a 8 meses de edad. Sobre 776 muestras de sueros analizados de 33 establecimientos, se encontró que en 10 rodeos (30%) más del 80% de los terneros resultaron positivos a *Anaplasma spp*, mientras que los restantes se encontraban en inestabilidad enzoótica y en 21 rodeos existía alto riesgo de ocurrencia de brote (Mastropaolo *et al.*, 2006).

La edad de los bovinos y la presencia de garrapatas y sus especies serían los factores que podrían determinar las variaciones en la tasa de infección de *A. marginale* encontrada entre los rodeos de las otras áreas endémicas descritas y los del NO de Entre Ríos. En los trabajos realizados tanto en Sudáfrica como en Palermo Italia encontramos que los animales analizados eran mayores de un año, contrastando con lo ocurrido en este trabajo y en el de Mastropaolo *et al.* (2006),

donde los animales analizados tenían entre 4-8 meses, edad recomendada para establecer el estatus epidemiológico. Si bien, se puede esperar que en algunos de los rodeos tanto de NO de Entre Ríos como del sudoeste de Chaco, lleguen al año de vida en estabilidad enzoótica, gran parte de estos rodeos mantendrá su estatus de inestabilidad enzoótica y tendrían alto riesgo de ocurrencia de brotes. Las diferencias en las tasas de inoculación entre estas regiones, podría deberse a la presencia de vectores (Mtshali, *et al.*, 2007) o de varias especies de garrapatas involucradas en la transmisión (De la Fuente, *et al.*, 2007). Lo observado por Mastropaolo *et al.* 2006, estaría reflejando que en nuestro país para la transmisión de *A. marginale*, no sólo se debería tener en cuenta si la región es endémica para *R. microplus*, sino también para otros transmisores, o vectores potenciales u otras formas de transmisión.

El concepto de estabilidad e inestabilidad enzoótica de anaplasmosis bovina se basa en el modelo de Mahoney y Ross (1972), que es la única herramienta disponible hasta el momento. Fue desarrollado originalmente para la malaria y años después adaptado para la babesiosis bovina, ambas enfermedades transmitidas por vectores. Sin embargo, para el caso de *A. marginale* se reconocen además varios vectores/transmisores, tomando relevancia la transmisión mecánica. En particular, en nuestro país el papel que cumple la garrapata *R. (Boophilus) microplus* como transmisor es muy discutido, al ser ésta una garrapata de un sólo huésped. Hasta el momento no se pudo demostrar que esta garrapata pueda actuar como un vector biológico, ya que no ha sido posible verificar la transmisión transovárica. Asimismo, no debería descartarse la posibilidad de que otros géneros de garrapatas tuvieran un rol en la transmisión. Gaido, *et al.*, (1995), demostraron que *A. neumanni*, bajo condiciones de laboratorio, era capaz de transmitir *A. marginale*, mediante garrapatas alimentadas previamente en terneros infectados con *A. marginale*. La primera detección en frotis ocurrió en el día 21 desde la infestación de los terneros, mientras que los anticuerpos se identificaron a partir del día 50. No hubo evidencias de signos clínicos en los animales desafiados. Un reciente trabajo de Nava, *et al.* (2009) muestra la amplia distribución real y potencial de *A. neumanni*, dentro de la zona ganadera tradicional, siendo esta una garrapata de más de un huésped, debería considerarse su rol en la epidemiología de esta enfermedad,

Teniendo en cuenta que la edad de los terneros analizados en este estudio varió entre cuatro a ocho meses, no debería descartarse la posible transmisión transplacentaria en estos rodeos. Hasta el momento se considera que ésta ocurre *in utero* y puede suceder en infecciones agudas en madres que se encuentran en el

último tercio de la gestación (Brinton; Paumer, 1976; Ribeiro, *et. al*, 1995), aunque también fue demostrada en vacas portadoras crónicas (Zaugg; Kuttler, 1984; Potgieter, 1987). Hasta el momento son escasos los estudios realizados sobre la transmisión transplacentaria a campo, desconociéndose el valor epidemiológico que ésta pueda tener en los rodeos.

Por lo mencionado hasta el momento, queda en evidencia que la transmisión de *A. marginale* es un proceso donde intervienen diversos factores, muchos de los cuales son difíciles de determinar. En tal sentido, el modelo matemático de Mahoney y Ross (1972) desarrollado para el cálculo de la tasa de inoculación de *Babesia*, estaría subestimando el riesgo de ocurrencia de brote de anaplasmosis en caso de inestabilidad enzoótica con una $h < 0.0005$ ya que no considera la tasa de inoculación a través de fomites.

Recientemente fue reportado en la literatura un nuevo modelo matemático de simulación para transmisión de patógenos en forma mecánica por parte de una población de insectos definida, en base a información recogida en ensayos en el campo con *Trypanosoma spp.* Este modelo tiene en cuenta parámetros conocidos de la enfermedad y de su transmisión, permite hacer una estimación de parámetros desconocidos, y simular y evaluar el riesgo de transmisión de un patógeno bajo condiciones de campo. Si bien este modelo fue desarrollado para un patógeno, podría ser adaptado – de acuerdo a sus autores - a otros patógenos presentes en la sangre, que se transmitan mecánicamente. Se debe tener en cuenta, la prevalencia de la enfermedad, el tipo y la carga media de insectos por individuo, la parasitemia, y otros factores que difieren entre enfermedades (Desquesnes, *et al.*, 2009)

A fin de detectar las muestras positivas para la posterior caracterización genotípica de los aislamientos, se utilizó la técnica de PCR para la detección de una secuencia del gen *msp5* de *A. marginale* altamente conservada. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados son compartidas con *A. centrale*, por lo tanto no fue posible diferenciar por esta técnica ambas especies. Para tal fin se utilizó la técnica de RLBH (Schouls *et al.*, 1999; Gubbels *et al.*, 1999), la cual permitió diferenciar simultáneamente y en forma específica *A. marginale* de *A. centrale* como así también identificar otros hemoparásitos, algunos de ellos potencialmente presentes en la región de estudio.

A partir de los resultados obtenidos con la técnica de PCR *msp5*, y con c-ELISA, se pudo apreciar una muy buena concordancia entre ambas pruebas tal como lo observó Palmer, *et al.*, (2004). Por lo tanto, utilizando los resultados de PCR *msp5*

para calcular la tasa de infección (I) se pudo recalcular el estado de estabilidad o inestabilidad enzoótica de los establecimientos analizados, al igual que con la serología. Dicho cálculo no mostró cambios en los estados de estabilidad, manteniéndose cada uno de los establecimientos analizados en el mismo estado definido por el valor serológico para el cálculo de I.

Al comparar los resultados obtenidos mediante las técnicas utilizadas con fin diagnóstico (c-ELISA, PCR $msp5$ y RLBH), se pudo estimar el valor *Kappa*. Dicha estimación se realizó independientemente entre las tres técnicas, encontrándose muy buena concordancia (tabla 16, 17 y 18). Si bien Palmer *et al.* (2004) reportaron una concordancia perfecta entre el c-ELISA y PCR $msp5$, es importante destacar que en dicho trabajo las muestras provenían de un área endémica con presencia de vectores y los animales analizados eran mayores de un año y que si bien se utilizó la misma técnica de c-ELISA, se aplicó en cambio una PCR anidada del gen $msp5$. Para el presente trabajo se decidió realizar la PCR del gen $msp5$ en un sólo paso, dada su elevada sensibilidad y la ventaja de evitar el riesgo de contaminación que presenta la técnica de PCR anidada, para el procesamiento de una gran cantidad de muestras, como fue el caso del presente estudio (n=291). Es importante tener en cuenta, que el método de extracción de ADN fue también diferente ya que para el presente trabajo se utilizó un protocolo más sencillo, rápido y económico, que permitió procesar un gran número de muestras a bajo costo, sin embargo tiene como desventaja la disminución del rendimiento de extracción del ácido nucleico.

A través de la técnica de RLBH se logró confirmar la presencia de *A. marginale* y de otros agentes transmitidos por garrapatas *spp.*, ya que las sondas que contienen la membrana comercial (ISOGEN) utilizada en este análisis permiten diferenciar géneros (*Anaplasma/Ehrlichia spp.* y *Babesia/Theileria spp.*) y especies.

El género *Ehrlichia* comprende un grupo importante de microorganismos, éstos fueron reclasificados por Dumler, *et al.*, (2001) por sus similitudes o diferencias genéticas. Dentro de este grupo encontramos a *E. omatjenne*, que si bien hasta el momento no se demostró que sea un agente patógeno, se observó, a través de la secuencia nucleotídica del gen de la subunidad menor del ribosoma (16S) que filogenéticamente está muy relacionada con *Anaplasma spp.*, tal es así que en la actualidad se lo denomina *Anaplasma spp. (omatjenne)* (Zweygarth *et al.*, 2006). Hasta la fecha no hubo reportes en nuestro país de la presencia de este microorganismo. En el caso particular de este estudio la presencia de ADN de *A. sp. omatjenne* se detectó únicamente en las muestras provenientes del departamento

Feliciano, donde por otra parte fue posible observar la mayor diversidad genética en los aislamientos de *A. marginale* detectados (figura 9). La presencia de *E. omatjienne* y la posibilidad de que su transmisión estuviera relacionada con transmisores/vectores involucrados en la transmisión de *A. marginale* simultáneamente es una hipótesis que merece considerarse para futuros estudios.

5.2. Análisis de la diversidad de los aislamientos de *A. marginale*

La secuenciación de un fragmento de la región 5' del gen *msp1α* fue utilizada para obtener información sobre la diversidad genotípica de los diferentes *A. marginale* identificados en las muestras en estudio.

De los ocho genotipos descritos en este trabajo, tres (F-M-M, α - β - β - Γ , τ -22-13-18) fueron reportados previamente en el país por Ruybal *et al.* (2009). El genotipo F-M-M (G1) detectado en los departamentos Feliciano (E-07/59) y La Paz (E-07/282), ya había sido reportado en la provincia de Entre Ríos, también en el departamento La Paz.

El genotipo α - β - β - Γ (G3), detectado en Feliciano (E-07/30), había sido descrito en Venado Tuerto, provincia de Santa Fe. El genotipo τ -22-13-18 (G8), detectado en La Paz (E-07/283), había sido descrito en Villa Ángela, Chaco. Si bien ambos trabajos se hicieron en zona considerada endémicas para *A. marginale*, este trabajo se realizó exclusivamente en el NO de Entre Ríos, que es considerada indemne para *R. microplus* y en el análisis se utilizaron terneros clínicamente sanos. En contraste Ruybal, *et al.* (2009), trabajaron con muestras provenientes de casos clínicos de zonas consideradas, de control, erradicación, indemne y naturalmente indemne para *R. microplus*. El G1 detectado en ambos trabajos, tanto de casos clínicos como de terneros clínicamente sanos, podría considerarse uno de los genotipos predominantes en el departamento de La Paz. Teniendo en cuenta que el origen de los casos clínicos caracterizados por Ruybal, *et al.* (2009), es diferente a los analizados en el presente trabajo. Este genotipo fue el único de los ocho detectados en este trabajo, encontrados en dos departamentos.

El G3 fue descrito previamente en Argentina en la provincia de Corrientes sin el bloque Γ , en México fue reportado con un bloque β menos y en Brasil con un bloque β más (De la Fuente, *et al.*, 2007). Los bloques β , α y Γ , fueron reportados hasta el momento solamente en genotipos detectados en países de América Central y del Sur. Estos podrían ser bloques característicos de aislamientos de estas regiones.

De los diez establecimientos con serología positiva, cinco se caracterizaron genéticamente. Los establecimientos que presentaron mayor número de positivos también presentaron mayor número de genotipos, esto sugiere que a mayor circulación de *A. marginale*, mayor prevalencia y mayor probabilidad de genotipos por establecimiento. Para poder continuar con las investigaciones sobre la variabilidad genética en el NO de Entre Ríos, sería necesario seguir trabajando, sobre todo fortaleciendo la recopilación de datos epidemiológicos a través de las encuestas.

A través del estudio observacional fue posible establecer que cuando los aislamientos pertenecían al mismo establecimiento había una probabilidad 12 veces mayor de que estos fueran iguales. De esta forma queda en evidencia el rechazo de la hipótesis nula (la variación genética dentro de los establecimientos es similar a la variación genética entre establecimientos), ya que se encontró que la diversidad genotípica de los aislamientos no tendría una distribución al azar, sino por el contrario estaría agrupada por establecimientos. Hasta el momento se desconoce la existencia de trabajos que comparen la variabilidad genética entre establecimientos de una misma región, pero hay antecedentes sobre la variabilidad dentro del establecimiento. Palmer, *et al.* (2004), analizando un establecimiento ubicado en una región endémica de EEUU, hábitat de las garrapatas *D. andersoni* y *D. variabilis* (garrapatas de más de un huésped) vectores de *A. marginale*, encontraron que la diversidad genotípica de los aislamientos respondía a un patrón estocástico dentro de ese establecimiento. Lo observado en el presente trabajo podrían deberse a que en esta zona endémica la transmisión de *A. marginale*, estaría dada principalmente por la transmisión iatrogénica o por insectos hematófagos.

5.3. Diversidad genética intra-establecimiento, en el departamento de Feliciano

Al hacer un análisis particular del establecimiento 07/30 del departamento de Feliciano (figura 9), recabando tanto los datos obtenidos a partir de las técnicas moleculares como los de la encuesta, se trató de interpretar de forma integradora la información obtenida.

Este establecimiento se dedica a la cría de bovinos, en el momento de la toma de muestras contaba con 360 cabezas, no se realiza vacunación con vacunas que contengan *A. centrale*, pero si las pertenecientes al calendario sanitario de rodeos de cría. Este establecimiento tiene reportes de casos clínicos en los años previos al muestreo, los terneros muestreados nacieron en el establecimiento. Se desconoce el origen de los animales adultos.

En este establecimiento se muestrearon 30 terneros de cinco meses de edad, nacidos en el establecimiento, de los cuales ocho fueron positivos al c-ELISA (27%). Además, estos ocho terneros también fueron positivos a PCR *msp5*. La concordancia observada entre el c-ELISA y PCR *msp5* (n=30), fue muy bueno ($Kappa=0,842$ IC 95% 0,489-1,195, $p<0,0001$). De las 30 muestras analizadas de este establecimiento solamente dos presentaron disparidad en los resultados, siendo negativas a c-ELISA y positivas a PCR *msp5*. La disparidad observada entre c-ELISA y PCR *msp5*, podría ser atribuida a la edad de los terneros (5 meses), ya que los mismos pueden haberse expuesto a *A. marginale* (primo-infección) y por ser ésta reciente no haber generado anticuerpos circulantes detectables con el c-ELISA.

Otro hallazgo interesante en este establecimiento fue el de *A. omatjenne*. Siendo el único establecimiento en el cual se detectaron cinco muestras positivas a este agente (n=5), tres de estos terneros también fueron positivos a *A. marginale* (PCR *msp5*).

Si nos remitimos a la tabla 13 de los resultados, podemos apreciar que el análisis total de la variación genotípica sugirió que la distribución de los genotipos no fue al azar, encontrándose agrupación de genotipos por establecimientos. Como se observó en la tabla 14, en este establecimiento se pudieron detectar tres genotipos diferentes, sin embargo el G3 sin duda fue el más frecuente.

A partir de este hallazgo surgen dos teorías que podrían explicar esta situación; una sería que “un genotipo tendría mayor capacidad de ser transmitido dentro de un rodeo” y la otra que “la distribución de los genotipos dentro de un rodeo es al azar”.

Leverich, *et al.* (2008), sugiere que dentro de un rodeo podríamos tener varios genotipos, pero que uno de ellos tendría mayor capacidad de ser transmitido, por ende sería el predominante en ese rodeo.

Palmer *et al.* (2004), sostienen que la transmisión de los genotipos dentro de un rodeo es un hecho probabilístico, por lo tanto el genotipo más abundante sería el más transmitido.

Para poder probar cualquiera de las dos hipótesis planteadas, “si un genotipo tiene mejores capacidades para ser transmitido” o “si la transmisión de los genotipos es un hecho estocástico”, se proyectará una investigación que nos permita afirmar o descartar las hipótesis planteadas, como así también estudiar otros vectores potenciales de *A. marginale* y trabajar en zonas de alta prevalencia con mayor circulación y mayores posibilidades de re-infecciones con diferentes genotipos.

6. CONCLUSIÓN

Se determinó la presencia de *A. marginale* en una baja proporción de rodeos bovinos del NO de Entre Ríos, con una tasa de inoculación relativamente baja que los ubicó en todos los casos en inestabilidad enzoótica. La mayor proporción de rodeos infectados y la mayor prevalencia de anaplasmosis se asociaron con los departamentos localizados en la ribera de los ríos, donde las condiciones ambientales favorecen el desarrollo de los insectos hematófagos. Se reconocieron en la región variantes genotípicas de *A. marginale*, algunas ellas descritas por primera vez. La diversidad genotípica de los aislamientos en la región no mostró una distribución al azar, sino por el contrario se agrupó por establecimientos.

Las diferentes técnicas diagnósticas aplicadas estratégicamente, la recopilación de antecedentes y el conocimiento de la diversidad genotípica de *A. marginale* analizadas en forma conjunta, proporcionaron información sólida sobre la epidemiología de la anaplasmosis bovina en el NO de Entre Ríos. Los resultados indican la necesidad de aplicar medidas de prevención para evitar la ocurrencia de brotes de anaplasmosis en los bovinos adultos de la región.

7. BIBLIOGRAFIA

- ABDALA, A.A.; MANGOLD, A.J.; ECHAIDE, S.T. DE. 1992. Transmisión experimental de *Anaplasma marginale* por palpación rectal (resultados preliminares). Vet. Arg. 9(90): 682-685.
- AGUIRRE, D.H.; GAIDO, A.B.; VIÑABAL, A.H.; DE ECHAIDE S.T.; GUGLIELMONE A.A. 1994. Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* tick fed as nymphs with different levels of rickettsaemia. Parasite. 1: 405-407.
- ALLEMAN, A.R.; BARBET, A. F. 1996. Evaluation of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 3 (MSP3) as a Diagnostic Test Antigen. J Clin Microbiol. 34(2): 270-276.
- ALLRED, D.R; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H.; LEIB, S.R.; HARKINS, T.M.; MCELWAIN, T.F.; 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.
- AMEREAULT, T.E.; MAZZOLA, V.; ROBY, T.O. 1973. Gram-staining characteristics of *Anaplasma marginale*. Am. J. Vet. Res. 34:552-555.
- BAKER, N. F; OSEBOLD, J.W.; 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.; 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(10):2428-2435.
- BARBET, A. F.; BLENTLINGER, R.; JOOYOUNG YI; LUNDGREN, A. M.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. 1999. Comparison of Surface Proteins of *Anaplasma marginale* Grown in Tick Cell Culture, Tick Salivary Glands, and Cattle. Infect Immun. 67(1):102-107.
- BARBET, A. F.; JOOYOUNG YI; LUNDGREN, A.; MCEWEN, B. R.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. 2001. Antigenic Variation of *Anaplasma Marginale*: Major Surface Protein 2 Diversity during Cyclic Transmission between Ticks and Cattle. Infect Immun. 69(5):3057-3066.
- BARROS, A.T.M.; FOIL, L.D. 2007. The influence of distance on movement of tabanids (Diptera: Tabanidae) between horses. Vet Parasitol. 144: 380-384.
- BEKKER, C.P.J.; DE VOS, S.; TAOUFIK, A.; SPARAGANO, O.A.E.; JORGENJAN, F. 2002. Simultaneous Detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* Species in Ruminants and Detection of *Ehrlichia ruminatum* in *Amblyoma variegatum* Ticks by Reverse Line Blot Hybridization. Vet Microbiol. 89:223-238.
- BOCK, R.E.; KINGSTON, T.G.; DE VOS, A.J. 1999. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Anaplasma marginale* transmitted by *Boophilus microplus*. Aust Vet J. 77(11):748-751.

- BOWIE, M.V.; DE LA FUENTE J.; KOCAN, K.M.; BLOUIN, E.F.; BARBET A.F. 2002. Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. *Gene*. 282:95-102.
- BRAYTON, K.A.; KAPPMAYER, L.S.; HERNDON, D.R.; DARK, M.J.; TIBBALS, D.L.; PALMER, G.H.; MCGUIRE, T.C.; KNOWLES, D.P. JR. 2005. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *U S A. Proc Natl Acad Sci* .102 (3):844-849.
- BRINTON, L.S.; PAUMER, R.J. 1976. Vertical transmission of *Anaplasma marginale* in cattle. *Theriogenology*. 6(5): 515-521.
- CORONADO, A. 2001. Is *Boophilus microplus* the main vector *Anaplasma marginale*? Technical note. *Rev Cient-Fac Cien V.11* (5):408-411.
- DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K.M. 2001. Expression of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 2 Variants in Persistently Infected Ticks. *Infect Immun*. 69(8):5151-5156.
- DE LA FUENTE, J.; RUYBAL, P.; MTSHALI, M.S.; NARANJO, V.; SHUQING, L.; MANGOLD, A.J.; RODRIGUEZ, S.D.; JIMENEZ, R.; VICENTE, J.; MORETTA, R.; TORINA, A.; ALMAZAN, C.; MBATI, P.M.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; FARBER, M.; ROSARIO-CRUZ, R.; GORTAZAR, C.; KOCAN, K.M. 2007. Analysis of World Strains of *Anaplasma marginale* using Major Surface Protein 1a Repeat Sequences. *Vet Microbiol*. 119:382-390.
- DE RIOS, L.G.; AGUIRRE, D.H.; GAIDO, A.B. 1990. Infection Naturelle par *Anaplasma marginale* chez deux troupeaux de bovins avec différents niveaux d'infestation par la tique *Boophilus microplus*. *Rev Elev Med Vet Pay*. 43(4) :447-452.
- DE BLAS, I; ORTEGA, C.; FRANKENAK, K.; NOORDHUIZEN, J.; THRUSFIELD, M. Win Episcopo. V 2.0, 2000. [en línea] < http://infecepi.unizar.es/pages/ratio/soft_uk > [Consulta: 15 de octubre de 2007].
- DESQUESNES, M.; BITEAU-COROLLER, F.; BOUYER, J.; LAMINE DIA, M.; FOIL, L. 2009. Development of a mathematical model for mehanical trnsmission of trypanosomes and other pathogens of cattle transmitted by tabanids. *Int J Parasitol*. 39(3): 333-346.
- DIRECCIÓN HIDRAULICA DE ENTRE RÍOS. 2009. Precipitaciones (Histórico). [en línea] <http://www.hidraulica.gov.ar/gis_googleearth.php> [Consulta: 16 de marzo 2009].
- DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, 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 six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int. Syst. Evol. Microbiol. 6:2145-2165.

- DREYER, K.; FOURIE, L. J.; KOK, D.J. 1998. Epidemiology of tick-borne diseases of cattle in Botshabelo and Thaba Nchu in the free state province. Onderstepoort J. Vet. Res. 65: 285-289.
- ERIKS, I.S.; STILLER, D.; PALMER, G. H. 1993. Impacto of Persistent *Anaplasma marginale* Rickettsemia on Tick Infection and Transmission. J Clin Microbiol. 31 (8): 2091-2096.
- ERIKS, I.S.; PALMER, G.H.; MCGUIRE, T.C.; ALLRED, D.R.; BARBET, A.F. 1989. Detection and Quantitation of *Anaplasma marginale* in Carrier Cattle by Using a Nucleic Acid Probe. J Clin Microbiol. 27(2):279-284.
- FIGUEROA, J.V.; BUENING, G.M. 1995. Nucleic Acid Probes as a Diagnostic Method for Tickborne Hemoparasites of Veterinary Importance. Vet Parasitol. 57 (1-3):75-92.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO).1984. Epidemiology of tick-borne diseases: epidemiological parameters and their application to the control of tick-borne disease. In: FAO Ticks and Ticks-Borne Disease Control. A Practical Field Manual. Rome. pp. 373-381.
- FRENCH, D.M.; BROWN, W.C.; PALMER, G. H. 1999. Emergence of *Anaplasma marginale* Antigenic Variants during Persistent Rickettsemia. Infect Immun. 67(11):5834-5840.
- FUTSE, J.E.; UETI, M.W.; KNOWLES JR., D.P.; 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(8):3829-3834.
- GAIDO, A.B.; VIÑABAL, A.E.; AGUIRRE, D.H.; DE ECHAIDE S.T.; GUGLIELMONE A.A.1995. Transmission of *Anaplasma marginale* by the three-host tick *Amblyomma neumanni* under laboratory conditions. Folia Parasit.42:72.
- GEORGES, K.; LORIA, G.R.; RIILI, S.; CARACAPPA, S.; JONGEJAN, F.; SPARAGANO, O. 2001. Detection of Hemoparasites in Cattle by Reverse Line Blot Hybridization with a note on the Distribution of Ticks in Sicily. Vet Parasitol. 99: 273-286.
- GONÇALVES RUIZ, P.M.; FRICHE PASSOS, L.M.; BABOSA RIBEIRO, M.F. 2005. Lack of infectivity of a Brazilian *Anaplasma marginale* isolate for *Boophilus microplus* ticks. Vet Parasitol.128: 325-331.
- GUBBELS, J.M.; DE VOS, A.P.; VAN DER WEIDE, M.; VISERA, J.; SCHOULS, L.M. ; DE VRIES, E.; JONGEJAN, F. 1999. Simultaneous Detection of Bovine Theileria and babesia Species by Reverse Line Blot Hybridization. J Clin Microbiol. 37(6):1782-1789.

- GUGLIELMONE, A.A. 1980. La prevención de babesiosis y anaplasmosis en Argentina y Australia. *Rev.Med.Vet.* 62(3): 275-277.
- GUGLIELMONE, A. A. 1992. The level of infestation with the vector of cattle babesiosis in Argentina. *Mem I Oswaldo Cruz.* 87(III): 133-137.
- GUGLIEMONE, A.A. 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet Parasitol.*57:109-119.
- GUGLIELMONE, A.A.; NAVA, S. 2006. Las garrapatas argentinas del género *Amblyomma* (Acari:Ixodidae): distribución y hospedadores. *RIA.* 35(3): 133-153.
- GUGLIELMONE, A.A.; SZABÓ, M.P.J.; DE SOUZA MARTINS, J.R.; ESTRADA-PEÑA, A. 2006. Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. In: BARROS-BATTESTI D.M.; ARZUA M.; BECHARA G.H. (ed.). *Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies.* São Paulo, Butantan, Brasil. pp 121-122.
- HAWKINS, J.A.; LOVE, J.N.; HIDALGO, R.J. 1982. Mechanical transmission of *Anaplasma* by tabanids (*Diptera: Tabanidae*). *Am J Vet Res.*43 (4):732-734.
- HIGUCHI, R. 1989. *Using PCR to engineer DNA*, In: ERLICH, H. A. (ed.). *PCR Technology.* Stockton Press, New York, pp 61-70.
- KIESER, S.T.; ERIKS, I.S.; PALMER G.H. 1990. Cyclic Rickettsia Persistent *Anaplasma marginale* Infection of Cattle. *Infect Immun.* 58(4):1117-1119.
- KOCAN, K.M.; HAIR, J.A.; EWING, S.A. 1980. 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.; STRATTON L.G. 1981. Transmission of *Anaplasma marginale* Theiler by *Dermacentor andersoni* Stiles and *Dermacentor variabilis* (Say). *Am. J. Vet. Res.* 42(1): 15-18.
- KOCAN, K.M.; BLOUIN, E.F.; 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.; MELÉNDEZ, R.D. 2003. Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. *Clin Microbiol Rev.* 16(4):698-712.
- LEVERICH, C.K.; PALMER, G.H.; KNOWLES JR., D.P.; BRAYTON, K.A. 2008. Tick-borne transmission of two genetically distinct *Anaplasma marginale* strains following superinfection of the mammalian reservoir host. *Infect Immun.*76 (9): 4066-4070.
- LOSOS, G.J. 1986. Anaplasmosis. In: Losos, G.J.(ed). *Infectious Tropical Diseases of Domestic Animals.* Longman Scientific & Technical. pp. 743-793.
- MAHONEY, D.F. 1974. The application of epizootiological principles in the control of Babesiosis in cattle. *Bull Off. Int. Epizoot.* 81: 123-138.

- MAHONEY, D.F.; ROSS, D.R. 1972. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust. Vet. J.* 48:292-298.
- MASTROPAOLO, M; TORIONI DE ECHAIDE, S.; MANGOLD A.J. 2006. Prevalencia de reactores serológicos contra *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* en bovinos del sudoeste de la provincia del Chaco. . [en línea] <<http://www.inta.gov.ar/rafaela/info/documentos/anuario2006/index-produccion-animal.htm>.>[Consulta: 10 de marzo de 2009].
- MEEUS, P.F.M.; BARBET A.F. 2001. Ingenious gene generation. *Trends Microbiol.* 9(8):353-355.
- MOLAD, T.; MAZUZ, M.L.; FLEIDEROVITZ, L.; FISH, L.; SAVITSKY, I.; KRIGEL, Y.; LEIBOVITZ, B.; MOLLOY, J.; JONGEJAN, D.; SHKAP, V. 2006. Molecular and serological detection of *A. centrale* and *A. marginale* infected cattle grazing within an endemic area. *Veterinary Microbiology.* 113(1-2):55-62.
- MTSHALI, M.S.; DE LA FUENTE, J.; RUYBAL, P.; KOCAN, K.M.; VICENTE, J.; MBATI, P.A.; SHKAP, V., BLOUIN, E.F.; MOHALE, N.E.; MOLOI, T.P.; SPICKETT, A.M.; LATIF, A.A. 2007. Prevalence and Genetic Diversity of *Anaplasma marginale* Strains in Cattle in South Africa. *Zoonoses Public Health.* 54 :23-30.
- NORMAN, G.R.; STREINER, D.L. 2000. Capitulo 17 En su: NORMAN, G.R.; STREINER, D.L (eds). *Bioestadística*. Mosby. p.p. 164-169.
- NAVA, S.; ESTRADA-PEÑA, A.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. 2009. Ecology of *Amplyomma neumanni* (Acari: Ixodidae). *Acta Tropical.* 111: 226-236.
- OBERLE, S.M.; PALMER, G.H.; BARBET, A.F. 1993. Expression and Immune Recognition of the Conserved MSP4 Outer Membrane Protein of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun.* 61(12): 5245-5251.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (OIE). 2008. Enfermedades Animales. Declaración obligatoria a la OIE. [en línea] <http://www.oie.int/esp/maladies/es_classification2008.htm>[Consulta: 05 de marzo de 2008].
- OTIM, C.; WILSON, A.J.; CAMPBELL, R.S.1980. A comparative study of experimental anaplasmosis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *Aust Vet J.* 56(6):262-266.
- PALMER, G.H.; KOCAN, K.M.; BARRON, S.J.; HAIR, J.A.; BARBET, A.F.; DAVIS, W.C. and McGUIRE, T.C. 1985. Presence of Common Antigens, Including Major Surface Protein Epitopes, between the Cattle (Intraerythrocytic) and Tick Stages of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun.* 50(3):881-886.
- PALMER, G.H.; BARBET, A.F.; KUTTLER, K.L.; McGUIRE, T.C. 1986. Detection of an *Anaplasma marginale* Common Surface Protein Present in All Stages of Infection. *J Clin Microbiol.* 23(6):1078-1083.

- PALMER, G.H.; BARBET, A.F.; MUSOKE, A.J.; KATENDE, J.M.; RURANGIRWA, F.; SHKAP, V.; PIPANO, E.; DAVIS, W.C.; MCGUIRE, T.C. 1988. Recognition of conserved surface protein epitopes on *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale* isolates from Israel, Kenya and United States. *Int. J. Parasitol.* 18:33-38.
- PALMER, G.H.; EID, G.; BARBET, A.F.; MCGUIRE, T.C.; MCELWAIN, T.F. 1994. The Immunoprotective *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 2 Is Encoded by a Polymorphic Multigene Family. *Infect Immun.* 62(9):1808-1816. PALMER, G.H.; BROWN, W.C.; RURANGIRWA, F.R. 2000. Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Microbes Infect.* 2:167-176.
- PALMER, G.H.; 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.; BROWN, W.C. 1999. Molecular basis for vaccine development against the Ehrlichial Pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitol Today.* 15:253-300.
- PALMER, G.H.; KNOWLES, D.P.; RODRIGUEZ, J.L.; GNAD, D.P.; HOLLIS, L.C.; MARSTON, T.; BRAYTON, K.A. 2004. Stochastic Transmission of Multiple Genotypically Distinct *Anaplasma marginale* Strain in Herd with High Prevalence of *Anaplasma* infection. *J Clin Microbiol.* 42(11): 5381-5384.
- PEVIANI, F. 1956. *Anaplasma centrale* en la preminición contra *Anaplasma marginale*. *Anales Soc. Rural Argentina.* 90: 474-478.
- PHILIP, C.B. 1957. Bergey's manual of determinative bacteriology. In: Breed, R.S.; Murray, E.G.D.; Smith, R.N. (eds). 7th ed. Family IV. Anaplasmataceae Philip fam. nov. Williams and Williams Co. Baltimore, Maryland, USA. p.p. 980-984.
- POTGIETER, F.T.; SUTHERLAND, B.; BIGGS, H.C. 1981. Attempts to transmit *Anaplasma marginale* with *Hippobosca rufipes* and *Stomoxys calcitrans*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 48(2):119-122.
- POTGIETER, F.T.; KOCAN, K.M.; MCNEW, R.W.; EWING, S.A. 1983. Demonstration of colonies of *Anaplasma marginale* in the midgut of *Rhipicephalus simus*. *Am J Vet Res.* 44(12):2256-2261.
- POTGIETER, F.T.; VAN RENSBURG, L. 1987. The persistence of colostral *Anaplasma* antibodies and incidence of *in utero* transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 54: 557-560.
- RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D. 1996. Morphology and development of *Anaplasma marginale* in midgut of engorged female ticks of *Bophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* 61(1-2):31-39.
- RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.F.; GUIMARÃES, A.M.; SCATAMBURLO, M.A.; MARTINS, N.E. 1995. Transmissão Congênita da anaplasmosse bovina. *Arq Bras Med Vet Zoo.* 43 (3):297-304.

- RISTIC, M. 1968. Anaplasmosis. In: Weinman, D; Ristic, M. (eds.). Infectious blood diseases of man and animals. Academic Press, Inc., New York, pp. 478-572.
- ROGERS, R.J.; BLIGHT, G.W.; KNOTT, S.G. 1978. A study of the Epidemiology of *Anaplasma marginale* Infections of Cattle in Southern Queensland: Clinical Disease and the Prevalence of Complement Fixing Antibodies. Australian Vet J. 54(3):115-120.
- ROSS, D.R.; MAHONEY, D.F. 1974. Bovine babesiosis: Computer simulation of *Babesia argentina* parasite rates in *Bos taurus* cattle. Ann Trop Med Parasit.(4): 385-392.
- RUYBAL, P.; MORETTA, R.; PEREZ, A.; PETRIGH, R.; ZIMMER, P.; ALCARAZ, E.; ECHAIDE, I.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; FARBER, M. 2009. Genetic Diversity of *Anaplasma marginale* in Argentina. Vet Parasitol. 162 (1-2):176-180.
- SCHNITTGER, L.; YIN, H.; QI, B.; GUBBELS, M.J.; BEYER, D.; JONGEJAN, S.N.F.; 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.; RIJPKEMA, S.G.T.; 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(7):2215-2222.
- SCOLES, G.A.; BROCE, A.B.; LYSYK, T.J.; 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(4):668-675.
- SCOLES, G.A.; MILLER, J.A.; 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(1):109-114.
- SMITH, T.; KILBORNE, F.L. 1893. Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. U.S. Depto. Agric. Bur. Anim. Ind. Bull. 1:301-324.
- SMITH, R.D.; LEVY M.G.; KUHLENSCHMIDT, M.S.; ADAMS, J.H.; RZECHULA, D.L.; HARDT, T.A. ; KOCAN, K.M. 1986. Isolates of *Anaplasma marginale* not Transmitted by Ticks. Am J Vet Res. 47(1):127-129.
- SPÄTH, E.J.A. 1986. Un estudio epidemiológico de babesiosis y anaplasmosis bovina en el Valle de Lerma, Provincia de Salta. Rev.Med.Vet. 67(5): 274-281.
- SPÄTH, E.J.A. 1987. Estimación de las pérdidas económicas producidas por la anaplasmosis y babesiosis bovina en la cuenca lechera del Valle de Lerma, Provincia de Salta. Rev.Med.Vet. 68(5): 277-282.

- SPÄTH, E.J.A. 1994. Estimación de las pérdidas económicas directas producidas por la garrapata *Boophilus microplus* y las enfermedades asociadas. *Therios*. 23 (118): 454-468.
- SPÄTH, E.J.A.; GUGLIELMONE, A.A.; SIGNORINI, A.R.; MANGOLD, A.J. 1990. Estimación de las pérdidas económicas producidas por garrapata *Boophilus microplus* y las enfermedades asociadas en la Argentina. 15º Congreso Argentino de Producción Animal. Huerta Grande Córdoba. SA 3. pp.126.
- STICH, R.W.; BANTLE, J.A.; KOCAN, K.M.; ERIKS, I.S.; PALMER, G.H.1991. Preliminary Development of a Polymerase Chain Reaction Assay for.
- STILLER, D. L.; JOHNSON, W.; 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 Manual Meeting of the U. S. Animal Health Association. pp.59-65.
- STILLER, D.; KOCAN, K.M.; EDWARDS, W.; EWING, S.A.; BARRON, J.A. 1989. Detection of colonies of *Anaplasma marginale* in salivary glands of three *Dermacentor* spp. infected as nymphs or adults. *Am J Vet Res*. 50(8): 1381-1385 *Anaplasma marginale* in Ticks. *Biotechnol Tech*. 5(4):269-274.
- TEBELE, N.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H. 1991. Induction of Protective Immunity by Using *Anaplasma marginale* Initial Body Membranes. *Infect Immun*. 59(9): 3199-3204.
- THEILER, A. 1910. "*Anaplasma marginale*" (gen. and spec. nov.). The marginale points in blood of cattle suffering from a specific disease. In: THEILER, A. (ed.). Report of the government veterinary bacteriologist. *Trasvaal S. Afr. Rep. Vet. Bact. Dept. Agr.* pp. 7-64.
- THEILER, A. 1911. Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. *So. Afr. Deot. Agric., First Rep. of the Div. of Vet. Res.* 7-46.
- THOEN, C.O.; BLACKBURN, B.; MILLS, K.; LOMME, J.; HOPKINS, M.P.1980. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting Antibodies in Cattle in a Herd in Which Anaplasmosis Was Diagnosed. *J Clin Microbiol*. 11(5):499-502.
- THRUSFIELD, M. 1995. Capítulo 13 In: THRUSFIELD, M. *Veterinary Epidemiology*. Blackwell Science. 2 ed. Gran Bretaña. pp 179.
- TORIONI DE ECHAIDE, S.; KNOWLES, D.P.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G. SUAREZ, C.E.; 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(3): 777-782.
- VANZINI, V.R.; SOMMA DE FERÉ, G.R.; ZUBRIGGEN, M.A.; HOMSE, A.; DRAGHI DE BENITEZ, M.G.; MEANA COLODRERO, D. 1984. Aislamiento de una cepa de *Anaplasma centrale* en la provincia de Corrientes, (Argentina). *Vet. Arg*. 1(7): 673-677.

- VANZINI, V.R.; RAMIREZ, L.M. 1994. Babesiosis y Anaplasmosis Bovina. Diagnóstico, Epidemiología y Control. RIA. 25(3): 137-190.
- VIDOTTO, M.C.; MCGUIRE, T.C.; MCELWAIN, T.F.; PALMER, G.H.; KNOWLES, JR. D.P. 1994. Intermolecular Relationships of Major Surface Proteins of *Anaplasma marginale*. Infect Immun. 62(7): 2940-2946.
- VISSER, E.S.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H.; DAVIS, W.C.; SHKAP, V.; PIPANO, E.; KNOWLES, JR. D.P. 1992. The *Anaplasma marginale msp5* Gene Encodes a 19-Kilodalton Protein Conserved in All Recognized *Anaplasma* Species. Infect Immun. 60(12):5139-5144.
- WILSON, A.J.; PARKER, R.; TRUEMAN, K.R.1980. Susceptibility of *Bos indicus* crossbred and *Bos taurus* cattle to *Anaplasma marginale* infection. Trop Anim Health Prod. 12(2):90-94.
- ZAUGG, J.L. 1985. Bovine Anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation. Am J Vet Res.46(3):570-572.
- ZAUGG, J.L.; KUTTLER, K.L. 1984. Anaplasmosis: in utero transmission and the immunological significance of ingested colostrum antibodies. Am J Vet Res. 45: 440-443.
- ZAUGG J.L.; STILLER D.; COAN M.E.; 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(10):2269-2271.
- ZIVKOVIC, Z.; NIJHOF, A.M.; DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K.M.; JONGEJAN, F. 2007. Experimental transmission of *Anaplasma marginale* by male *Dermacentor reticulatus*. BMC Vet Res. 3(32):1-6.
- ZWEYGARTH, E.; JOSEMANS, A.I.; SPICKETT, A.M.; STEYN, J.; PUTTERILL, P.C.; TROSKIE, M.S.; MTSHAL, M.S.; BELL-SAKYI, L.; SHKAP, V.; FISH, L.; KOCAN, K.; BLOUIN, E.F. 2006. In vitro cultivation of a south African isolate of an *Anaplasma* sp. in tick cell cultures. Onderstepoort J Vet Res.73(4):251-255.

8. APENDICE

Apéndice I: Encuesta

DATOS GENERALES DEL ESTABLECIMIENTO							
Establecimiento			e-mail			Depto	
Propietario							
Dirección			Tel			Sección	
RENSPA							
Actividad							
Nº de Cabezas							
DATOS DEL RODEO GENERAL							
Vacunación	Si	No	Origen	Rafaela	Mercedes	Triple	Anaplasma
Serología	Si	No	Momento	Prevacunación		Posvacunación	
Baño	Si	No	Producto			Frecuencia	
Pour-on	Si	No	Producto			Frecuencia	
Origen de los animales			Marca Líquida				
			Campo Vecino				
			Otro Departamento				
			Otra Provincia				
DATOS DE RODEO AFECTADO							
Casos Clínicos	Si	No		Característica		Caso aislado	
						Brote	Goteo
							Abrupto
Época del año							
Edad							
Nº Enfermos							
Nº Muertos							
Nº Expuestos							
Curso en días de la enfermedad							
Medidas tomadas				Antibiótico			
				Antiparasitario			
				ATB+Antip.			
				Ninguno			
				Cambio de potrero			
				Otros			
Diagnóstico	Sintomático						
	Laboratorio			Hematocrito			
				Frotis			
				Temperatura			

Apéndice II

Citrato de Sodio Dihidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$)

3,8 g Citrato de sodio dihidratado

100 ml Agua bidestilada

Autoclavar, vapor fluente.

Apéndice III

Buffer lisis:

0,32 M sacarosa

10 mM Tris-HCl (pH:7,5)

5 mM $MgCl_2$

1% v/v Triton X-100

Apéndice IV

Buffer PNBD (buffer con detergentes no iónicos):

50 mM KCl

10 mM Tris-HCl (pH:8,3)

2,5 mM $MgCl_2$

0,1 mg/ml gelatina

0,45% (v/v) Nonidet P40

0,45% (v/v) Tween 20

Autoclavar para esterilizar y disolver la gelatina.

Guardar a $-20^\circ C$.

Apéndice V

Diseño de la membrana ISOGEN:

Lane Species Probe Sequence * (from 5' – 3')

1 *Ehrlichia/Anaplasma* catch-all GGG GGA AAG ATT TAT CGC TA

2 *Anaplasma centrale* TCG AAC GGA CCA TAC GC

3 *Anaplasma marginale* GAC CGT ATA CGC AGC TTG

4 *Anaplasma phagocytophilum* TTG CTA TAA AGA ATA ATT AGT GG

5 *Anaplasma phagocytophilum* TTG CTA TGA AGA ATA ATT AGT GG

6 *Anaplasma phagocytophilum* TTG CTA TAA AGA ATA GTT AGT GG

7 *Anaplasma phagocytophilum* TTG CTA TAG AGA ATA GTT AGT GG

8 *Ehrlichia ruminantium* AGT ATC TGT TAG TGG CAG

9 *Anaplasma bovis* GTA GCT TGC TAT GRG AAC A

- 10** *Ehrlichia chaffeensis* ACC TTT TGG TTA TAA ATA ATT GTT
11 *Ehrlichia* sp Omatjenne CGG ATT TTT ATC ATA GCT TGC
12 *Ehrlichia canis* TCT GGC TAT AGG AAA TTG TTA
13 *Theileria/Babesia* catch-all TAA TGG TTA ATA GGA RCR GTT G
14 *Babesia felis* TTA TGC GTT TTC CGA CTG GC
15 *Babesia divergens* ACT RAT GTC GAG ATT GCA C
16 *Babesia microti* GRC TTG GCA TCW TCT GGA
17 *Babesia bigemina* CGT TTT TTC CCT TTT GTT GG
18 *Babesia bovis* CAG GTT TCG CCT GTA TAA TTG AG
19 *Babesia rossi* CGG TTT GTT GCC TTT GTG
20 *Babesia canis canis* TGC GTT GAC GGT TTG AC
21 *Babesia canis vogeli* AGC GTG TTC GAG TTT GCC
22 *Babesia major* TCC GAC TTT GGT TGG TGT
23 *Babesia bicornis* TTG GTA AAT CGC CTT GGT C
24 *Babesia caballi* GTT GCG TTK TTC TTG CTT TT
25 *Theileria* sp Kudu CTG CAT TGT TTC TTT CCT TTG
26 *Theileria* sp Sable GCT GCA TTG CCT TTT CTC C
27 *Theileria bicornis* GCG TTG TGG CTT TTT TCT G
28 *Theileria annulata* CCT CTG GGG TCT GTG CA
29 *Theileria buffeli* GGC TTA TTT CGG WTT GAT TTT
30 *Theileria* sp Buffalo CAG ACG GAG TTT ACT TTG T
31 *Theileria mutans* CTT GCG TCT CCG AAT GTT
32 *Theileria parva* GGA CGG AGT TCG CTT TG
33 *Theileria taurotragi* TCT TGG CAC GTG GCT TTT
34 *Theileria velifera* CCT ATT CTC CTT TAC GAG T
35 *Theileria equi* TTC GTT GAC TGC GYT TGG
36 *Theileria lestoquardi* CTT GTG TCC CTC CGG G

* Los símbolos indican degeneraciones en las posiciones: R = UN / G, W = UN / el T, K = G / el T

Apéndice VI:

Relación entre la tasa de inoculación y porcentaje de animales infectados (FAO.1984. Epidemiology of tick-borne diseases: epidemiological parameters and their application to the control of tick-borne disease. In: Ticks and Ticks-Borne Disease Control. A Practical Field Manual. Rome. tabla 8.1, p. 377)

(I)	Inoculation rate (h) for calves of mean age (months)					
	4	5	6	7	8	9
5%	.0004	.0003	.0003	.0002	.0002	.0002
10%	.0009	.0007	.0006	.0005	.0004	.0004
15%	.0014	.0011	.0009	.0008	.0007	.0006
20%	.0019	.0015	.0012	.0011	.0009	.0008
25%	.0024	.0019	.0016	.0014	.0012	.0011
30%	.0030	.0024	.0020	.0017	.0015	.0013
35%	.0036	.0029	.0024	.0021	.0018	.0016
40%	.0043	.0034	.0028	.0024	.0021	.0019
45%	.0050	.0040	.0033	.0029	.0025	.0022
50%	.0058	.0046	.0039	.0033	.0029	.0026
55%	.0067	.0053	.0044	.0038	.0033	.0030
60%	.0076	.0061	.0051	.0044	.0038	.0034
65%	.0088	.0070	.0058	.0050	.0044	.0039
70%	.0100	.0080	.0067	.0057	.0050	.0045
75%	.0116	.0092	.0077	.0066	.0058	.0051
80%	.0138	.0107	.0089	.0077	.0067	.0060
85%	.0158	.0126	.0105	.0090	.0079	.0070
90%	.0192	.0154	.0128	.0110	.0096	.0085
95%	.0250	.0200	.0166	.0143	.0125	.0111

Apéndice VII:

Bloques de secuencias repetitivas pertenecientes a diferentes aislamientos de *A. marginale* provenientes de América, Europa, Asia, África y Australia (De la Fuente et al., 2007). Se utilizó la denominación de aminoácidos de una letra a fin de facilitar la comparación entre los bloques. Los asteriscos indican la identidad en los diferentes gaps y posiciones aminoacídicas con respecto al bloque de referencia (A). Los bloques 48 a 53 no se encuentran reportados en la bibliografía y fueron descriptos en aislamientos provenientes de Corrientes y Salta, Argentina (Ruybal, et al., 2009).

Bloque de repetición	Secuencia de aminoácidos
A	DDSSSASGQQQESSVSSQSE-ASTSSQLG--
B	A*****G*****DQ*****
C	A*****G*****GQ*****
D	A*****G*****
E	A*****G*****
F	T*****GQ*****
G	*****GQ*****S***

H	T*****GQ*****S***
I	*****GQ*****
J	A***L*G*****DQ*****
K	A*G***G*****DQ*****
L	AG****D*****DQ*****
M	A*****GQ*****
m	A*****GQ*****S***
N	T*****DQ*****
O	----*G*****DQ*****
P	T*****G***GQ**H*A*S***
Q	A*****DQ*****
R	A*****G***H*****DQ*****W**
T	AG****G*****DQ*****
U	*****DQ*****
V	A*****G***_*****DQ*****
W	T*****GQ*****SR**
α	A*****-----*L***GQ*****
β	T*****GD***G*G*****GQ*****
Γ	T*****D*****
π	A*****G*****GQ*****F***
Σ	A*****G*****
σ	A*****G*****I*****DH*****
μ	A*****L*****GQ*****
τ	T*****L*P*GQ*****
Φ	T*****
1	SG*****L**GGQ*****
2	T*****P**GQ*****
3	A*****L***GQ*****
4	T*****L***GQ*****
5	A*****D*****
6	A*****H*****
7	T*****H*****
8	A*G***GD*****G*****S***
9	A*****D*****S***
10	A*****L*P*GQ*****
11	A*****L*P*GQ*****VG
12	AG*****L***DQ*****

13	T*****L**DQ*****
14	T*****L**G*****
15	A*****G*L**GQ*****
16	A*****GD**G*****GQ*****
17	T*****G*****GQ*****
18	T*****L**DQ*****S**
19	A*****GDR**G*L**GQ*****
20	A*****GD*****G*L**GQ*****
21	A*****GD*****L**GQ*****
22	A*****L*P*GQ*****S**
23	T*****K**L**SQ*****
24	A*****GN*****LP**GQ*****S**
25	A*****L**SQ*****
26	A*****GN*****LP**GQ*****
27	A*****L**DQ*****
28	AG**E*****L**GQ*****
29	T*****D*****GQ*****
30	A*****K**L**SQ*****
31	A*****GN*****D*****
32	T*****G*****GQ*****
33	A*****L*K*GQ*G*****
34	AN*****L**DQ*****
35	T*****GQ*G*****S**
36	A*****P*****
37	T*****L**GQ*****S**
38	A*****L**GQ*****S**
39	*****L**DQ*****
40	AG***GD*****DQ*****
41	AS*****L**DQ*****
42	T*****LP**GQ*****S**
43	A*****LP**GQ*****S**
44	T*****A*****GQ*****S**
45	T*****LP**DQ*****
46	T*****LP**GQ*****
47	A*****GD*****DQ*****
48	T*G*****L*P*GQ*****VG
49	T*G***GD**G*G*****GQ*****

50	T*****GDR**G*G*****GQ*****
51	T*****GD*R*G*G*****GQ*****
52	T*****V*****D*****
53	T*****LPP*GQ*****

Apéndice VIII

Descripción de los genotipos detectados, establecimientos y departamentos a los que pertenecen. Formación de 210 pares de comparaciones, utilizando dos atributos seleccionados secuencias y establecimientos.

N° de Secuencia	Establecimiento	Genotipo	Departamento
1	07/59	F-M-M	Feliciano
2	07/59	F-M-M	Feliciano
3	07/59	F-M-M	Feliciano
4	07/59	F-M-M	Feliciano
5	07/59	τ-10-10	Feliciano
6	07/30	α-β-β-β-Γ	Feliciano
7	07/30	B-Q-C	Feliciano
8	07/30	α-β-β-β-Γ	Feliciano
9	07/30	α-β-β-β-Γ	Feliciano
10	07/30	α-β-β-β-Γ	Feliciano
11	07/30	τ -55	Feliciano
12	07/30	α-β-β-β-Γ	Feliciano
13	07/282	F-M-M	La Paz
14	07/282	23-31-31	La Paz
15	07/282	F-M-M	La Paz
16	07/282	F-M-M	La Paz
17	07/284	23-31-31	La Paz
18	07/283	54-10-3	La Paz
19	07/283	τ -22-13-18	La Paz
20	07/283	τ -22-13-18	La Paz
21	07/283	τ -22-13-18	La Paz

Tomando los dos atributos seleccionados secuencias y establecimientos, atribuyendo 0 cuando las secuencias comparadas son iguales y 1 cuando son diferentes, y 0 cuando pertenecen al mismo establecimiento y 1 cuando son de establecimientos diferentes. Tomando estos parámetros se confeccionaron los siguientes pares de comparaciones:

Comparación	Secuencias	Establecimientos
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	1	0
5	1	1
6	1	1
7	1	1
8	1	1
9	1	1
10	1	1
11	1	1
12	0	1
13	1	1
14	0	1
15	0	1
16	1	1
17	1	1
18	1	1
19	1	1
20	1	1
21	0	0
22	0	0
23	1	0
24	1	1
25	1	1
26	1	1
27	1	1
28	1	1
29	1	1
30	1	1
31	0	1
32	1	1
33	0	1
34	0	1
35	1	1
36	1	1
37	1	1
38	1	1
39	1	1
40	0	0
41	1	0
42	1	1
43	1	1
44	1	1
45	1	1

Comparación	Secuencias	Establecimientos
46	1	1
47	1	1
48	1	1
49	0	1
50	1	1
51	0	1
52	0	1
53	1	1
54	1	1
55	1	1
56	1	1
57	1	1
58	0	1
59	1	1
60	1	1
61	1	1
62	1	1
63	1	1
64	1	1
65	1	1
66	0	1
67	1	1
68	0	1
69	0	1
70	1	1
71	1	1
72	1	1
73	1	1
74	1	1
75	1	1
76	1	1
77	1	1
78	1	1
79	1	1
80	1	1
81	1	1
82	1	1
83	1	1
84	1	1
85	1	1
86	1	1
87	1	1
88	1	1
89	1	1
90	1	1

Comparación	Secuencias	Establecimientos
91	1	0
92	0	0
93	0	0
94	0	0
95	1	0
96	0	0
97	1	1
98	1	1
99	1	1
100	1	1
101	1	1
102	1	1
103	1	1
104	1	1
105	1	1
106	1	0
107	1	0
108	1	0
109	1	0
110	1	0
111	1	1
112	1	1
113	1	1
114	1	1
115	1	1
116	1	1
117	1	1
118	1	1
119	1	1
120	0	0
121	0	0
122	1	0
123	0	0
124	1	1
125	1	1
126	1	1
127	1	1
128	1	1
129	1	1
130	1	1
131	1	1
132	1	1
133	0	0
134	1	0
135	0	0
136	1	1

Comparación	Secuencias	Establecimientos
137	1	1
138	1	1
139	1	1
140	1	1
141	1	1
142	1	1
143	1	1
144	1	1
145	1	0
146	0	0
147	1	1
148	1	1
149	1	1
150	1	1
151	1	1
152	1	1
153	1	1
154	1	1
155	1	1
156	1	0
157	1	1
158	1	1
159	1	1
160	1	1
161	1	1
162	1	1
163	1	1
164	1	1
165	1	1
166	1	1
167	1	1
168	1	1
169	1	1
170	1	1
171	1	1
172	1	1
173	1	1
174	1	1
175	1	0
176	0	0
177	0	0
178	1	1
179	1	1
180	1	1
181	1	1

Comparación	Secuencias	Establecimientos
182	1	1
183	1	0
184	1	0
185	0	1
186	1	1
187	1	1
188	1	1
189	1	1
190	0	0
191	1	1
192	1	1
193	1	1
194	1	1
195	1	1
196	1	1
197	1	1
198	1	1
199	1	1
200	1	1
201	1	1
202	1	1
203	1	1
204	1	1
205	1	0
206	1	0
207	1	0
208	0	0
209	0	0
210	0	0