



**Universidad Nacional del Litoral**

*Facultad de Ciencias Veterinarias*

*Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (IdICaL) INTA-  
CONICET*

*Tesis presentada para optar por el grado académico de  
Doctora en Ciencias Veterinarias*

***Rol de las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *Amblyomma tonelliae* en la transmisión de *Anaplasma marginale* en Argentina***

**Autora:** Matilde Mazzucco Panizza

**Director:** Santiago Nava

**Codirector:** Marcelo Signorini

**Año:** 2022

## **Agradecimientos**

Mi primer agradecimiento es para mi Director de tesis, Santiago Nava, quien estuvo no sólo presente sino también involucrado en todas las etapas de este trabajo, me guió, enseñó y acompañó, pero también me dio libertad y apoyo para crecer profesionalmente. En segundo lugar, agradezco a mi Cordirector, Marcelo (Chelo) Signorini, por su socorro estadístico y su excelente predisposición siempre. Y agradezco especialmente a Ignacio Echaide, mi Director de beca, a quien considero mentor. Gracias infinitas, Ignacio, por haber confiado en mí para trabajar en INTA, por haberme formado y por aconsejarme hasta el día de hoy.

Este trabajo fue únicamente posible gracias a una inmensa colaboración de todo el grupo de Inmunología y Parasitología Veterinaria del INTA Rafaela. Agradezco a Mario Wuattier, por su ayuda invaluable en los viajes y trabajos de muestreo. A Paola Amherdt, que analizó muestras de suero y repitió PCRs cuando yo dudaba de mis resultados. A Carolina Thompson, que siempre estuvo dispuesta a socorrerme en el área molecular. A Patrick Sebastian, fundamental en el análisis filogenético, y presente siempre para escuchar y ayudar. A Evangelina Primo, que me asistió completamente con el análisis de genotipos y me aconsejó siempre que se lo pedí. A Nicolás Morel, que me enseñó y acompañó a hacer esplenectomías y fue crucial en los ensayos de *Boophilus*. A Beatriz (Trichi) Valentini y Paula Ramírez, que me recibieron en el laboratorio de cultivos, me contuvieron, enseñaron y ayudaron siempre, a Trichi especialmente por su paciencia y acompañamiento en los últimos años como Directora de beca. A Ramón, compañero en el trabajo con animales al pie del cañón, gracias. Al resto de mis compañeros y compañeras del Laboratorio, que jamás me negaron ayuda y a quienes agradezco de corazón por su amabilidad, buena predisposición y buena onda: Belén Novoa, Macarena Sarli, Estefanía Ugarte, Ana Schmidt, Liliana Aguirre, Fernando Seguro y Pablo Salusso. A la gente del “Palacio”, Noelia Saracho y Sebastián Flores por su ayuda; y Evelina Tarragona especialmente, por su ayuda, charlas y consejos. A Atilio Mangold, Oscar Anziani, Susana Torioni y Victor Vanzini, referentes de los hemoparásitos y las garrapatas; por sus respuestas y preguntas, y por poner a disposición sus conocimientos generosamente, haberlos conocido y poder consultarles para mí es invaluable.

A la gente que no sólo fue fundamental para que este trabajo resultara completo y prolijo, sino que también ayudó a que me sintiera como en casa en sus lugares de

trabajo: Victoria Rossner de INTA Colonia Benítez y Christian Cutulle del Instituto de Patobiología de INTA Castelar. Agradezco a Matías Richetta del CICVyA de INTA Castelar por su trabajo intachable con los animales. A Mónica Jacobsen, Leonhard Schnittger y Sabrina Ganzzinelli del Instituto de Patobiología del INTA Castelar por recibirme en su Laboratorio, siempre estaré agradecida. A Pedro Vidosa, por confiar e involucrarse activamente en los ensayos de *Amblyomma*, y Anita Vildoza, por su ayuda en la época álgida de trabajo con animales.

Agradezco al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria que solventó mi formación profesional en estos años, y al INTA y a la Asociación Cooperadora de la Estación Experimental Agropecuaria Rafaela por proveer las condiciones estructurales y financieras para el desarrollo de este trabajo. A la Universidad Nacional de Río Cuarto que me formó como profesional y me dio visión de vida. A la Universidad Nacional del Litoral por la formación de posgrado, y a los evaluadores de estas tesis, cuyo compromiso contribuyó a mejorar significativamente este trabajo.

Finalmente, quiero agradecer a Lucre, Matías, Luciana, Cande, Jose, Carla, Marian, Clara, Sofi, Cocó, Lau, Chiny y Noe; quizás no lo sepan, pero su amistad fue y es una red de contención impagable para mí. A Guille, por su abrazo infinito, su contención, sus ideas y sus críticas. A mi abuela Gladys, por la potencia de sus consejos. A mi mamá, mi papá y mi hermano, que me apoyaron siempre sin condiciones y me rescataron en todo momento.

# ÍNDICE

<b>Índice de tablas</b>	<b>I</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>II</b>
<b>Resumen</b>	<b>III</b>
<b>Abstract</b>	<b>V</b>
<b>Introducción general</b>	<b>1</b>
<b>Parte I: Transmisión de <i>Anaplasma marginale</i> por <i>Rhipicephalus microplus</i></b>	<b>12</b>
Capítulo 1: Transmisión transovárica de <i>Anaplasma marginale</i> por <i>Rhipicephalus microplus</i>	13
INTRODUCCIÓN	13
MATERIALES Y MÉTODOS	15
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	24
Capítulo 2: Migración de adultos de <i>Rhipicephalus microplus</i>	29
INTRODUCCIÓN	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
<b>Parte II: Transmisión de <i>Anaplasma marginale</i> por <i>Amblyomma tonelliae</i></b>	<b>38</b>
INTRODUCCIÓN	39
MATERIALES Y MÉTODOS	41
RESULTADOS	47
DISCUSIÓN	50
<b>Discusión general y conclusiones</b>	<b>54</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>60</b>

# Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Prevalencia de infección con <i>Anaplasma marginale</i> en hembras ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> y su progenie (larvas G1 y G2). .....	21
<b>Tabla 2.</b> Genotipos de <i>msp1a</i> de <i>Anaplasma marginale</i> definidos por microsatélites (ms) y secuencias de repetición en tándem (TRS) en terneros infectados naturalmente de Quimili, Santiago del Estero. ....	22
<b>Tabla 3.</b> Resultados de análisis molecular de larvas de <i>R. microplus</i> recolectadas de vegetación analizadas con PCR en tiempo real para amplificación de un fragmento del gen <i>16S rRNA</i> y PCR anidada para un fragmento del gen <i>msp1b</i> específico de <i>A. marginale</i> . ....	23
<b>Tabla 4.</b> Registro de especímenes adultos de <i>Rhipicephalus microplus</i> hallados en bovinos que al Día 0 se encontraban no infestados y comenzaron a convivir con bovinos infestados con <i>R. microplus</i> . ....	32
<b>Tabla 5.</b> Incidencia acumulada de infestación con adultos de <i>Rhipicephalus microplus</i> en grupos de bovinos con diferente carga animal (animales por hectárea)...	33
<b>Tabla 6.</b> Resultados de PCR en tiempo real del gen <i>16S rRNA</i> y PCR anidada del gen <i>msp1b</i> en muestras de larvas, ninfas y adultos de <i>Amblyomma tonelliae</i> involucradas en los ensayos de transmisión transestadial y transovárica de la cepa S1P de <i>Anaplasma marginale</i> . ....	48
<b>Tabla 7.</b> Resultados de análisis molecular de larvas, ninfas y adultos de <i>A. tonelliae</i> recolectadas de vegetación analizadas con PCR en tiempo real para amplificación del gen <i>16S rRNA</i> , y PCR anidada para amplificación del gen <i>msp1b</i> de <i>A. marginale</i> . ....	49

# Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Ciclos de rickettsemia (eritrocitos infectados con <i>Anaplasma marginale</i> ) en animales persistentemente infectados a lo largo del tiempo. Adaptado de Palmer et al., (1999). .....	3
<b>Figura 2.</b> Microfotografías de colonias de <i>Anaplasma marginale</i> en células de intestino y en glándulas salivales de garrapata (Kocan et al., 2004). .....	5
<b>Figura 3.</b> Áreas de Argentina clasificadas según aptitud ecológica para el desarrollo de <i>Rhipicephalus microplus</i> en Argentina. (Nava et al., 2022).....	9
<b>Figura 4.</b> Distribución de <i>Amblyomma tonelliae</i> en relación a las Eco-regiones de Argentina definidas por Burkart et al., (1999). (Tarragona et al., 2015b).....	10
<b>Figura 5.</b> Niveles de rickettsemia (porcentaje de eritrocitos infectados con <i>Anaplasma marginale</i> ) en ternero 479 infectado con cepa “S1P” de <i>A. marginale</i> e infestado con <i>Rhipicephalus microplus</i> . .....	17
<b>Figura 6.</b> Productos de PCR de fragmentos del gen <i>m脾1a</i> de <i>Anaplasma marginale</i> separados en gel TAE-agarosa al 1 %.....	22
<b>Figura 7.</b> Tasa de infestación con adultos de <i>Rhipicephalus microplus</i> calculada con prueba de supervivencia de Kaplan-Meier en grupos de bovinos con diferente carga animal. ....	34
<b>Figura 8.</b> Niveles de rickettsemia (eritrocitos infectados) en ternero 275 infectado con la cepa S1P de <i>Anaplasma marginale</i> e infestado con <i>Amblyomma tonelliae</i> . .....	43
<b>Figura 9.</b> Representación esquemática de la evaluación de la transmisión transtadial y transovárica de <i>Anaplasma marginale</i> por <i>Amblyomma tonelliae</i> . .....	45

# Resumen

*Anaplasma marginale* es el agente causal de la anaplasmosis bovina, enfermedad que provoca importantes pérdidas económicas en la ganadería argentina. Una de las vías de transmisión de *A. marginale* es por garrapatas. En Argentina, las garrapatas *Rhipicephalus microplus* y *Amblyomma tonelliae* parasitan con frecuencia a los bovinos, y se consideran potenciales transmisores de *A. marginale*. El objetivo general de esta tesis fue aportar conocimientos sobre la epidemiología de la anaplasmosis en Argentina, mediante la evaluación de la capacidad potencial que tienen las principales garrapatas que parasitan a los bovinos para transmitir *A. marginale*, tomando como modelos una especie de garrapata de un solo hospedador (*R. microplus*) y otra de tres hospedadores (*A. tonelliae*). Se evaluó la transmisión transovárica de distintas cepas de *A. marginale* por *R. microplus*. Para ello, se alimentaron *R. microplus* en terneros infectados con *A. marginale*. Una alícuota de las larvas progenie de estas garrapatas se analizaron por PCR para detección de *A. marginale*, con resultados negativos. El resto de las larvas progenie se alimentaron sobre terneros susceptibles esplenectomizados, los cuales fueron monitoreados durante 90 días para evaluar infección con *A. marginale*, con resultados negativos. Además, se evaluó mediante PCR la presencia de ADN de *A. marginale* en larvas de *R. microplus* de vida libre recolectadas en sitios donde existen bovinos portadores del patógeno, para determinar si existe infección natural con cepas locales de *A. marginale* en estos estadios, lo cual sería resultado de una transmisión transovárica. El análisis integrado de toda la evidencia obtenida indica que la transmisión transovárica de *A. marginale* por *R. microplus* no es un evento viable. Se evaluó la migración de adultos de *R. microplus* entre bovinos, lo cual tendría impacto en la transmisión intraestadial de *A. marginale* por esta garrapata, en grupos de baja y alta carga animal (G1 y G2 a respectivamente). En el grupo de baja carga animal se hallaron garrapatas adultas en 25% de los bovinos no infestados que convivieron durante 13 días con bovinos infestados con *R. microplus*, mientras que este porcentaje fue del 65% en el grupo de mayor carga animal. Se demostró estadísticamente que la migración de adultos de *R. microplus* entre bovinos está asociada a la carga animal. Se evaluó la transmisión transestadial y transovárica de *A. marginale* por *A. tonelliae* mediante ensayos de transmisión con animales y análisis molecular. No ocurrió transmisión a los terneros susceptibles. El análisis molecular de la totalidad de adultos mudados y larvas progenie

resultó negativa, mientras que en ninfas mudadas se encontró una tasa mínima de infección del 1,25%. Se analizaron por PCR larvas, ninfas y adultos de *A. tonelliae* de vida libre, con resultados negativos. Los resultados negativos tanto en el análisis molecular de larvas de *R. microplus* como en los ensayos de transmisión, sumado a la evidencia de migración de especímenes adultos entre bovinos, indican que el rol de *R. microplus* en la epidemiología de la anaplasmosis bovina estaría más relacionado a transmisión intraestadial y transestadial que a transmisión transovárica. En el caso de *A. tonelliae* se demostró que esta especie de garrapata no tendría competencia para transmitir *A. marginale* por medio de ninguna de las vías descritas, aunque dado el hallazgo de una tasa mínima de infección del 1,25% en ninfas mudadas no se descarta la posibilidad de transmisión transestadial. Si bien estos resultados no necesariamente son extrapolables a otras especies del género *Amblyomma*, dado que la especie evaluada se tomó como modelo de garrapata de tres hospedadores es probable que el rol de este género de garrapatas no sea de impacto en la epidemiología de la anaplasmosis bovina.

# Abstract

*Anaplasma marginale* is the causative agent of bovine anaplasmosis, a disease that causes significant economic losses in livestock. One of the routes of transmission of *A. marginale* is by ticks. In Argentina, the ticks *Rhipicephalus microplus* and *Amblyomma tonelliae* frequently parasitize cattle and are considered potential vectors of *A. marginale*. The general aim of this thesis was to provide knowledge on the epidemiology of bovine anaplasmosis in Argentina, by evaluating the potential capacity of *R. microplus*, a one-host tick, and *A. tonelliae*, as a model of three-host tick to transmit *A. marginale*. The transovarial transmission of different *A. marginale* strains by *R. microplus* was evaluated. First, *R. microplus* ticks were fed on calves infected with *A. marginale*. After hatching, an aliquot of the larvae was analyzed by PCR to detect *A. marginale*, with negative results. The rest of the larvae were fed on splenectomy susceptible calves, which were monitored for 90 days to detect *A. marginale* infection, with negative results. Finally, free-living larvae of *R. microplus* collected from pasture on farms with cattle infected with *A. marginale* were analyzed by PCR to detect *Anaplasma* infection. All the samples analyzed were negative for *A. marginale*. The integrated analysis of the results indicates that the transovarial transmission of *A. marginale* by *R. microplus* is unlikely to occur. The migration of adults of *R. microplus* among cattle under field conditions would have an impact on the intrastadial transmission of *A. marginale*. The magnitude of the tick migration was evaluated in groups of bovines with low and high stocking rates (G1 and G2 respectively). In G1, ticks were found in 25% of non-infested cattle housed for 13 days with infested cattle, while this percentage was 65% in G2. The tick infestation rate, calculated using the Kaplan-Meier survival test, was higher in G2 ( $P=0.05$ ). Transstadial and transovarial transmission of *A. marginale* by *A. tonelliae* were evaluated by vectorial competence assays and molecular analysis. Transmission to susceptible calves did not occur. Molecular analysis of all the molted adults and the progeny larvae was negative; however, 1.25% of minimum infection rate was found on molted nymphs. Larvae, nymphs and adults of free-living *A. tonelliae* ticks were analyzed by PCR to detect *A. marginale* infection, with negative results. The absence of transovarial transmission of *A. marginale* by *R. microplus*, combined with the description of the magnitude of migration of ticks among cattle, strongly suggest that transstadial and intrastadial transmission are the routes by which this tick has relevance

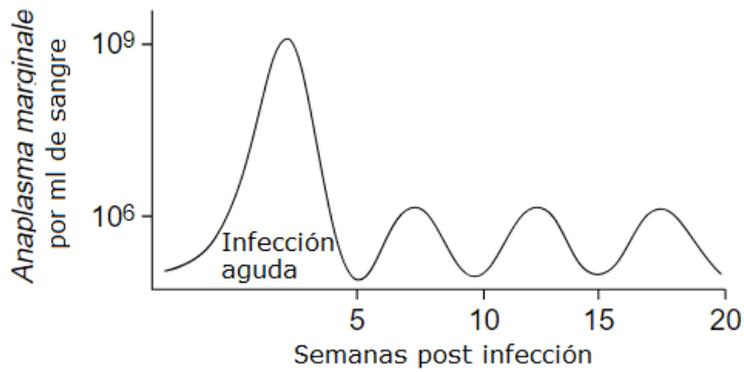
in the epidemiology of bovine anaplasmosis. *Amblyomma tonelliae* would not be able to transmit *A. marginale* through any of the routes described. However, the possibility of transstadial transmission should not be excluded, since a minimum infection rate of 1.25% was found on molted nymphs. Although these results are not necessarily comparable to other species of *Amblyomma*, it is likely that this genus of ticks has no impact on the epidemiology of bovine anaplasmosis, since the specie studied in this thesis was considered as a model.

# Introducción general

*Anaplasma marginale* es un microorganismo intracelular obligado del orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceae, que infecta los eritrocitos de los rumiantes tanto domésticos como silvestres (Dumler et al., 2001; Rar et al., 2021). Es el agente causal de la anaplasmosis bovina, una enfermedad anemizante presente en áreas tropicales y subtropicales de todo el mundo (Kocan et al., 2010) y en zonas de clima templado, donde se presenta en forma de brotes esporádicos (Vanzini & Ramírez, 1994). En Argentina la anaplasmosis bovina es endémica al norte del paralelo 33° S (Anziani, 1979; Araoz et al., 2017) y se considera una enfermedad en expansión, con ocurrencia de brotes en establecimientos localizados al sur del paralelo 33° S (Anziani, 1979). La anaplasmosis bovina provoca importantes pérdidas económicas asociadas a la disminución de la producción láctea y la ganancia de peso, costos de tratamiento y a la mortandad de animales, que se estipula representa dos tercios de las pérdidas económicas en un brote (Aguirre et al., 2011; Kocan et al., 2004). Además, causa un particular impacto sobre los programas de mejoramiento genético cuando se ven afectados reproductores de alto valor (Meléndez, 2000). En América Latina las pérdidas económicas debidas a anaplasmosis bovina se calcularon en 75 millones de dólares anuales (Brown, 1997). En Argentina, si se consideran las existencias ganaderas de provincias donde la enfermedad es endémica y en áreas donde la misma se encuentra en expansión, estarían expuestos alrededor de 20 millones de bovinos (INDEC, Censo Nacional Agropecuario, <https://consultascna2018.indec.gob.ar/>).

*Anaplasma marginale* se desarrolla exclusivamente dentro de los glóbulos rojos del hospedador, donde se describe como una o varias inclusiones pequeñas (0,3-1  $\mu\text{m}$ ) basófilas, de forma redondeada o cocoide y generalmente localizadas en el borde de la célula. Smith & Kilborne (1893) identificaron por primera vez este microorganismo clasificándolo como uno de los estadios del piroplasma causante de la piroplasmosis o Fiebre de Texas. Posteriormente, Theiler (1910) logró describir a *A. marginale* en bovinos enfermos en Sudáfrica, diferenciándolo de la entidad patológica de la piroplasmosis. Existen dos formas morfológicamente distintas de *A. marginale*, descritas por microscopía electrónica: los corpúsculos iniciales, que son las formas infectantes; y los cuerpos de inclusión, que contienen de cuatro a ocho corpúsculos iniciales (Kocan et al., 2004). Al igual que todos los miembros de la familia

Anaplasmatidae, *A. marginale* se localiza dentro de vacuolas formadas por una membrana que deriva de la propia célula de su hospedador, donde realiza ciclos de multiplicación e invasión incrementando en forma logarítmica el número de eritrocitos infectados (Kieser et al., 1990). En bovinos adultos el porcentaje de eritrocitos infectados (rickettsemia) puede alcanzar niveles superiores al 50% (Allen et al., 1981) y con niveles de entre un 15 y 25% aparecen síntomas que requieren tratamiento antibiótico (Anziani et al., 1982). Los glóbulos rojos infectados con *A. marginale* son destruidos por fagocitosis por el sistema retículo endotelial del bovino con el consecuente desarrollo de anemia e ictericia (Kocan et al., 2000). El curso agudo de la enfermedad se caracteriza por presentar fiebre, descenso del hematocrito, ictericia, debilidad, aborto y muerte (Theiler, 1910; Bram, 1975). Debido a la intensidad de la anemia, en algunos casos los valores de hematocrito pueden descender por debajo del 10%, y la hipoxia generada en los tejidos puede causar dificultad respiratoria, irritabilidad e incoordinación en el animal. El período de incubación tras la infección con *A. marginale* es variable y dependiente de la dosis infectante, pudiendo extenderse de 21 a 70 días (Vanzini & Ramirez, 1994). La forma clínica severa de la anaplasmosis por lo general ocurre en primas infecciones en animales adultos, mientras que, en bovinos menores al año de edad, la enfermedad es generalmente subclínica debido a mecanismos de resistencia inmune innata y características propias de su sistema hematopoyético. Los animales que superan la infección inicial desarrollan una sólida inmunidad y permanecen como portadores de por vida, detectándose incrementos de rickettsemia cada aproximadamente cinco semanas gracias a las variantes antigénicas del patógeno, que permiten nuevos ciclos de invasión y multiplicación, pero sin consecuencias clínicas debido a la inmunidad desarrollada (Figura 1) (Kieser et al., 1990; Palmer et al., 1999). Los animales portadores se convierten así en reservorios naturales de *A. marginale*, contribuyendo a su propagación (Kocan et al., 2003).



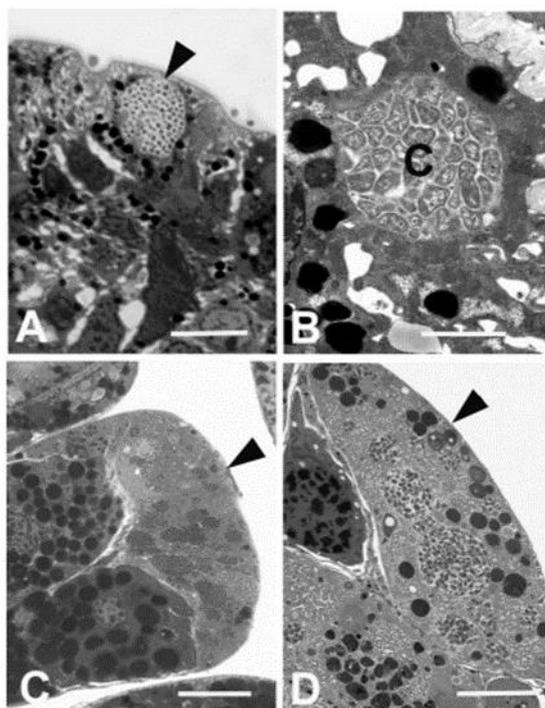
**Figura 1.** Ciclos de ricketsemia (eritrocitos infectados con *Anaplasma marginale*) en animales persistentemente infectados a lo largo del tiempo. Adaptado de Palmer et al., (1999).

El diagnóstico de certeza de la anaplasmosis bovina se realiza por microscopía, mediante observación directa y cuantificación de eritrocitos infectados con *A. marginale* en extendidos de sangre de animales enfermos. En animales muertos, además de extendidos de sangre o coágulos, puede realizarse la identificación en improntas de tejidos como hígado y bazo. En animales portadores crónicos puede observarse una baja proporción de eritrocitos infectados, correspondiente a los ciclos de ricketsemia propios de la variación antigénica mencionada (Kieser et al., 1990) razón por la cual es importante cuantificar los eritrocitos infectados al momento de la observación microscópica. Ante casos clínicos de anaplasmosis existen diferentes opciones de tratamiento antibiótico. Los quimioterápicos disponibles actualmente son oxitetraciclina, dipropionato de imidocarb y, menos utilizada, enrofloxacin (Guglielmo et al., 1996; Vanzini & Ramirez, 1994). Para la prevención de la anaplasmosis nuestro país dispone de una vacuna viva compuesta por eritrocitos infectados con *Anaplasma centrale*, un organismo de menor patogenicidad que produce inmunidad cruzada contra *A. marginale*. Esta vacuna se aplica una sola vez en la vida del animal, entre los 4 y 10 meses de edad.

La transmisión de *A. marginale* se produce por garrapatas, dípteros hematófagos como moscas, tábanos y mosquitos (Foil, 1989; Kocan et al., 2008; Krinsky, 1976) y a través de elementos corto punzantes contaminados con sangre como agujas, instrumental quirúrgico y distintos elementos utilizados en el descornado, castración e identificación de los animales. Incluso se ha demostrado su transmisión a través de palpación rectal sin cambio de guantes (Abdala et al., 1992). También se transmite por vía transplacentaria, aunque según Zaugg (1985) sólo un 3% de animales portadores sería capaz de transmitir la infección verticalmente, con lo cual esta vía no se considera

de relevancia epidemiológica. Los dípteros hematófagos que afectan a los bovinos y tienen potencial transmisor debido a sus hábitos alimenticios son los tábanos (*Tabanus* spp.) y la “mosca brava” o “mosca del establo” (*Stomoxys calcitrans*) (Barros & Foil, 2007). En el caso de los tábanos, las hembras se alimentan durante 3 a 4 días, pero debido a que su picadura es dolorosa su alimentación se ve interrumpida constantemente, lo que la conduciría a cambiar de hospedador para poder completar su alimentación, generando la posibilidad de transmitir mecánicamente el patógeno desde un animal portador a uno susceptible. La transmisión de *A. marginale* por tábanos y *S. calcitrans* a partir de bovinos con altos niveles de rickettsemia ha sido demostrada experimentalmente (Hawkins et al., 1982, Roberts et al., 1969, Potgieter et al., 1981).

Aproximadamente 20 especies de garrapatas pertenecientes a los géneros *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Ixodes* y *Rhipicephalus* han sido incriminadas en la transmisión de *A. marginale* (Kocan et al., 2004) sin embargo, la transmisión biológica no se ha demostrado fehacientemente para todas ellas. El ciclo de *A. marginale* dentro de la garrapata ha sido descrito mediante observaciones por microscopía y técnicas inmunológicas (Kocan et al., 1980; Kocan et al., 1983b; Kocan et al., 1992b; Potgieter et al., 1983; Kocan et al., 2004). Luego de la alimentación, el patógeno ingresa a las células del intestino de la garrapata y se multiplica formando colonias para posteriormente atravesar la membrana basal de las células intestinales, acceder a la hemolinfa y de esta manera infectar diferentes tejidos de la garrapata, incluyendo las glándulas salivales donde ocurre un nuevo ciclo de multiplicación (Figura 2). La primera forma de *A. marginale* que se observa dentro de las colonias tanto en intestino como en glándulas salivales de la garrapata es la forma reticulada (vegetativa) que se divide por fisión binaria y da como resultado la formación de grandes colonias que pueden contener cientos de organismos. La forma reticulada se transforma en la forma densa o infecciosa que puede sobrevivir por un corto tiempo fuera de las células. El bovino adquiere la infección con *A. marginale* cuando las formas densas son transmitidas, durante la alimentación de la garrapata, a través de la inoculación de saliva infectada.



**Figura 2.** Microfotografías de colonias de *Anaplasma marginale* en células de intestino y en glándulas salivales de garrapata (Kocan et al., 2004). (A) Micrografía óptica de una colonia grande (flecha) en una célula intestinal de garrapata. (B) Micrografía electrónica de una colonia (C) en una célula intestinal de garrapata. (C) Micrografía óptica de varias colonias (flecha) en una célula de glándula salival. (D) Micrografía electrónica de una célula de glándula salival de garrapata (flecha) que contiene varias colonias de *A. marginale*. A, barra = 5  $\mu\text{m}$ ; B, barra = 5  $\mu\text{m}$ ; C, barra = 10  $\mu\text{m}$ ; D, barra=5  $\mu\text{m}$ .

Para ser transmitido biológicamente por garrapatas, *A. marginale* debe ser capaz de invadir el epitelio intestinal, y luego replicar en los acinos de las glándulas salivales y ser liberado a la saliva (Scoles et al., 2007). Investigaciones recientes sugieren que la superación de estos procesos para la transmisión transtadial e intraestadial de *A. marginale* podría ser efectiva sólo con algunas cepas de la rickettsia (Scoles et al., 2006, 2007). Ciertamente, distintos estudios han registrado aislamientos de *A. marginale* que varían tanto en su morfología, secuencia de proteínas y características antigénicas como en su capacidad de ser transmitidas por garrapatas (de la Fuente et al., 2007; Kocan et al., 2008; Palmer et al., 2001; Wickwire et al., 1987). Aunque limitado, el mayor número de investigaciones concernientes a diferencias en la transmisión transtadial e intraestadial de cepas de *A. marginale* ha sido realizado en Estados Unidos (Aubry &

Geale, 2011) mediante la evaluación de la competencia vectorial de garrapatas de tres hospederos pertenecientes al género *Dermacentor* para aislamientos de *A. marginale* provenientes de distintas regiones geográficas (Futse et al., 2003; Scoles et al., 2007; Smith et al., 1986; Wickwire et al., 1987). Smith et al., (1986) compararon la capacidad de transmisión transtadial de dos cepas de *A. marginale* (Illinois y Virginia) por *Dermacentor variabilis*, logrando transmitir el patógeno con la cepa de Virginia mientras que la cepa de Illinois no se logró transmitir luego de varios intentos. Se ha propuesto que las diferencias en la transmisión se deben a la composición de la proteína de superficie MSP1a de *A. marginale*, descrita como una adhesina para eritrocitos bovinos y células de garrapata involucrada en la invasión de las células intestinales (de la Fuente et al., 2001 a, b; Kocan et al., 2004). La estructura de esta proteína comprende un número variable de repeticiones de 28-29 aminoácidos dispuestos en tándem en la porción amino terminal, y el aminoácido ubicado en la posición 20 de la repetición sería esencial para la adhesión de *A. marginale* a células de garrapata, lo que determinaría la capacidad de cada cepa de transmitirse por garrapatas (Allred et al., 1990; de la Fuente et al., 2003). Sin embargo, la composición de esta proteína no es el único factor que condicionaría la capacidad de *A. marginale* de transmitirse por garrapatas, dado que además de invadir las células intestinales deberá ser capaz de replicarse en su interior y luego liberarse, ya sea para invadir otros tejidos o para infectar a un hospedador vertebrado a través de la saliva mientras la garrapata se alimenta (Ueti et al., 2007).

Para el estudio del rol de las garrapatas en la transmisión de un patógeno, es necesario recordar que el ciclo biológico de las garrapatas Ixodidae consta de dos fases: una parasitaria, en la cual los diferentes estadios de la garrapata (larvas, ninfas y adultos) se alimentan, y otra no parasitaria que sucede fuera del hospedador, es decir, en el ambiente. La mayoría de las garrapatas de la familia Ixodidae son garrapatas de tres hospedadores, es decir que larvas, ninfas y adultos parasitan cada uno a un hospedador diferente, que puede pertenecer o no a la misma especie, y la muda ocurre en el ambiente. En las garrapatas de dos hospedadores, larvas y ninfas se alimentan de un hospedador, para luego caer al ambiente y mudar a adultos, los cuales se alimentan en un segundo hospedador. Finalmente, en las garrapatas de un solo hospedador, larvas, ninfas y adultos se alimentan y mudan sobre un mismo hospedador (Sonenshine et al., 2002).

Al finalizar la cópula y alimentación, las hembras se desprenden de su hospedador y caen al suelo dando inicio al proceso de oviposición, el cual ocurre en el

ambiente y abarca tres fases. La pre-oviposición, que se define como periodo desde que la hembra se desprende hasta que pone el primer huevo; la oviposición propiamente dicha, definida como el periodo desde que la hembra comienza la oviposición hasta que pone su último huevo; y la incubación, que transcurre desde la oviposición hasta el nacimiento o eclosión de las larvas. La duración de estos periodos depende de la especie de garrapata y de factores ambientales, principalmente la temperatura ambiente. Mientras que la duración de las fases parasitarias es escasamente influida por las condiciones ambientales.

La transmisión de un patógeno por garrapatas puede suceder por vía transestadial, intraestadial o transovárica. La transmisión transestadial es aquella que sucede entre un estadio de la garrapata y el siguiente. En esta forma de transmisión las larvas y ninfas adquieren la infección a partir de un bovino infectado, para luego transmitirla al nuevo estadio, ninfa o adulto respectivamente, y éstas a su vez a un animal potencialmente susceptible. La transmisión intraestadial ocurre dentro de un mismo estadio del ciclo, cuando un ejemplar de garrapata migra de un hospedador a otro, generando en estas circunstancias la posibilidad de infectar un animal susceptible. Los estadios adultos pueden adquirir la infección transestadialmente como ninfas, o bien ingerir sangre de un animal portador del patógeno y migrar a diferentes hospedadores expandiendo la infección (Kocan et al., 1992 a, b). Al finalizar la fase parasitaria las hembras fecundadas e ingurgitadas se desprenden del hospedador para realizar la oviposición, es decir, la postura de huevos. En la transmisión transovárica, las hembras fecundadas infectadas con un patógeno ponen huevos de los que nacen larvas también infectadas y que a su vez infestarán nuevos hospedadores para continuar su ciclo, transmitiendo el patógeno. En organismos de la familia Rickettsiae, pertenecientes al mismo orden que *A. marginale*, la transmisión transovárica ocurre y está descrita como un elemento distintivo del ciclo de estos organismos (Parola, 1993).

Otra forma de transmisión de patógenos por garrapatas, demostrada en el caso de la transmisión de *Rickettsia rickettsii* por la garrapata *Dermacentor andersoni* (Parola, 1993) es a través de co-alimentación cuando varias garrapatas se alimentan en sitios muy cercanos. Sin embargo, en el caso de *A. marginale* no se ha demostrado este mecanismo de transmisión (Kocan & de la Fuente, 2003).

En Argentina existen al menos 9 especies de garrapatas que parasitan con frecuencia a los bovinos (Nava et al., 2017), pero cuatro de ellas, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Amblyomma neumanni*, *Amblyomma sculptum* y *Amblyomma*

*tonelliae*, son relevantes para la producción ganadera no solo porque pueden generar altos niveles de infestación en los bovinos, sino también porque todos los estadios parasíticos se alimentan sobre este hospedador y, por ende, pueden ser potenciales transmisores de *A. marginale* (Guglielmone et al., 1990; Nava et al., 2006, 2017; Tarragona et al., 2015b).

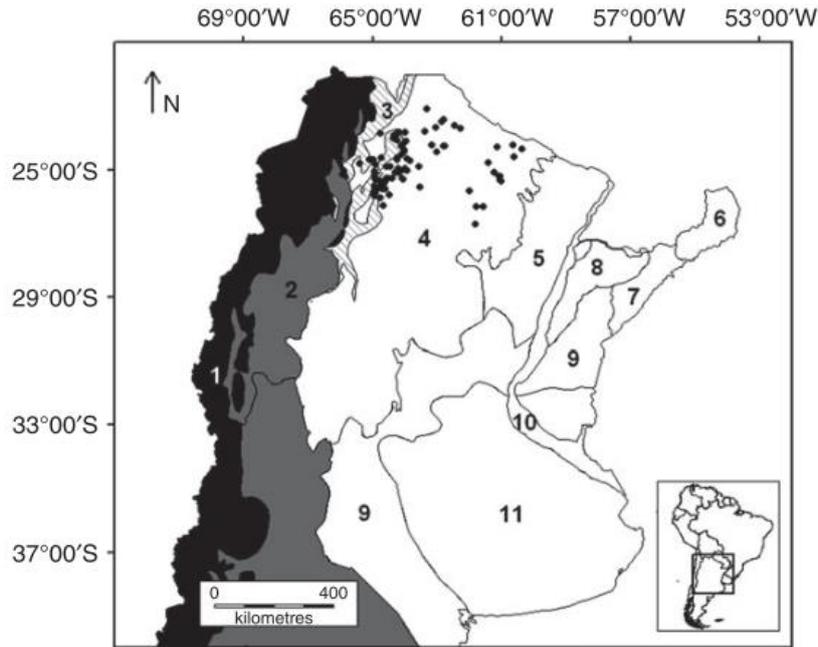
*Rhipicephalus microplus* es una garrapata que ocasiona fuertes limitaciones al desarrollo de la ganadería de carne y leche (Spath et al., 1994). Produce pérdidas económicas directas por la disminución de la ganancia de peso, disminución de la producción láctea, daño en los cueros, mortalidad, costos por control, y otras asociadas a la transmisión de enfermedades, ya que *R. microplus* es vector de los agentes causales de la babesiosis bovina *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. En Argentina *R. microplus* se distribuye al norte de los paralelos 31-32° S con excepción de la región andina, en las provincias de Salta, Tucumán, Jujuy, Santiago del Estero, Santa Fe, Córdoba, Catamarca, Formosa, Misiones, Entre Ríos, Corrientes y Chaco. Dentro del área ecológicamente favorable para *R. microplus*, las zonas más propicias para su desarrollo son aquellas con déficit hídrico anual menor a 200 mm y temperaturas superiores a 15 °C durante la mayor parte del año, exceptuando zonas con anegamientos permanentes (Figura 3) (Guglielmone, 1992). La duración relativamente constante de la fase parasitaria le confiere capacidad para realizar más de un ciclo anual. *R. microplus* es una garrapata con un ciclo de un solo hospedador, es decir, desarrolla toda su fase parasitaria (alimentación, muda de larvas y ninfas y cópula de los adultos) sobre el mismo hospedador. Por ello, las vías potenciales de transmisión de *A. marginale* en esta especie de garrapata son la transovárica y la intraestadial. Los resultados de investigaciones relacionados a transmisión transovárica de *A. marginale* son contradictorios. Existen reportes de transmisión transovárica en las garrapatas *D. andersoni* (Howell et al., 1941), *Rhipicephalus annulatus* (Kuttler, 1971; Rees, 1934) y *R. microplus* (Estrada et al., 2020; Rosenbusch & González, 1923). Sin embargo, otros estudios reportan ausencia de transmisión transovárica, incluso en el caso de *D. andersoni*, *R. annulatus* y *R. microplus* (Anthony & Roby, 1966; Connell & Hall, 1972; Esteves et al., 2015; Leatch, 1973; Potgieter 1979; Rees, 1934; Ribeiro et al., 1996; Ruiz et al., 2005; Thompson & Roa, 1978). La transmisión intraestadial de *A. marginale* ha sido reportada en *D. andersoni* (Kocan et al., 1981; Scoles et al., 2007) y en diferentes especies del género *Rhipicephalus*, entre ellas, *R. microplus* (Futse et al., 2003; Scoles et al., 2007). Si bien *R. microplus* es una garrapata de un solo hospedador,

se ha demostrado la migración de especímenes entre bovinos (Connell & Hall, 1972; Mason & Norval, 1981) condición necesaria para propiciar la transmisión intraestadial de *A. marginale*. Sin embargo, no existen estudios que caractericen con precisión la dinámica de migración de esta especie de garrapata.



**Figura 3.** Áreas de Argentina clasificadas según aptitud ecológica para el desarrollo de *Rhipicephalus microplus* en Argentina. (Nava et al., 2022). 3: favorable; 1,2: intermedio; 4: desfavorable; 5: área naturalmente libre de *R. microplus*.

Las garrapatas *A. neumanni*, *A. sculptum* y *A. tonelliae* se distribuyen en regiones geográficamente diferentes. Se ha registrado la presencia de *A. neumanni* en la eco-región Chaco Serrano (provincia del Chaco) y con menor frecuencia en la eco-región del Monte (Chaco) y Yungas (Amazonia) (Guglielmone & Nava, 2006). La presencia de *A. sculptum* ha sido asociada con áreas húmedas forestadas del norte de Argentina (Estrada Peña et al., 2014; Tarragona et al., 2018) mientras que *A. tonelliae* posee una marcada preferencia eco-geográfica por la región del Chaco árido (Estrada Peña et al., 2014; Tarragona et al., 2015b) (Figura 4). Es posible encontrar especímenes de *A. tonelliae* en actividad durante todo el año, dado que durante el otoño y el invierno se encuentran larvas, durante el invierno y la primavera ninfas, y durante la primavera y el verano, adultos (Tarragona et al., 2015b).



**Figura 4.** Distribución de *Amblyomma tonelliae* en relación a las Eco-regiones de Argentina definidas por Burkart et al., (1999). 1, Altos Andes; 2, Puna; 3, Selva de las Yungas; 4, Chaco Seco; 5, Chaco Húmedo; 6, Selva Paranaense; 7, Campos y Malezales; 8, Esteros del Iberá; 9, Espinal; 10, Delta e Islas del Paraná; 11, Pampa. Los puntos negros indican localidades de hallazgos de *Amblyomma tonelliae*. (Tarragona et al., 2015b).

Las garrapatas del género *Amblyomma* realizan un ciclo de tres hospedadores, dónde cada estadio de la fase parasitaria (larva, ninfa y adulto) se alimenta en un animal distinto, que puede ser o no de la misma especie, y una vez alimentado e ingurgitado se desprende para realizar la muda en el ambiente. Lo antedicho tiene relevancia epidemiológica en el estudio de la transmisión de patógenos, dado que, a diferencia de *R. microplus*, las garrapatas del género *Amblyomma* tienen la oportunidad de infestar a un nuevo hospedador, diferente al que parasitó el estadio previo. Las ninfas y adultos pueden acceder a diferentes bovinos amplificando de esa manera la potencial propagación de *A. marginale* en un rodeo mediante transmisión transestadial. La transmisión transestadial de *A. marginale* ha sido descrita en especies de los géneros *Amblyomma*, *Dermacentor* y *Rhipicephalus* incluso con cepas de *A. marginale* distintas (Aguirre et al., 1994; Gaido et al., 1995; Kocan et al., 1981; Potgieter, 1981; Potgieter & Van Rensburg, 1982; Samish et al., 1993; Smith et al., 1986). La transmisión transovárica también sería de relevancia, dado que miles de larvas presuntamente infectadas podrían acceder a hospedadores susceptibles y transmitir el patógeno. Para

especies del género *Amblyomma* los estudios relacionados a transmisión de *A. marginale* son escasos. En el caso de *Amblyomma americanum*, Anthony & Roby (1966) y Rees (1934) reportaron ausencia de transmisión transovárica y transtadial, al igual que con *Amblyomma mixtum* (nombrada como *Amblyomma cajennense*) y *Amblyomma maculatum* (Rees, 1934). Sanborn & Moe, también en el año 1934 reportaron ausencia de transmisión con las garrapatas *A. americanum* y *A. mixtum*, aunque se desconoce cuáles fueron las vías de transmisión que evaluaron. Finalmente, Gaido et al., (1995) reportaron la ocurrencia de transmisión transtadial de *A. marginale* de ninfas a adultos de *A. neumanni*.

El objetivo general de esta tesis fue aportar conocimientos sobre la epidemiología de la anaplasmosis en Argentina, mediante la evaluación de la capacidad potencial que tienen las principales garrapatas que parasitan a los bovinos para transmitir *A. marginale*, tomando como modelos una especie de garrapata de un solo hospedador (*R. microplus*) y otra de tres hospedadores (*A. tonelliae*).

**Parte I: Transmisión de *Anaplasma marginale* por *Rhipicephalus microplus***

# Capítulo 1: Transmisión transovárica de *Anaplasma marginale* por *Rhipicephalus microplus*

## INTRODUCCIÓN

La evaluación de la transmisión de *A. marginale* por *R. microplus* para dilucidar el rol de esta garrapata en la epidemiología de la anaplasmosis bovina se considera relevante en Argentina dado que la mayor parte del área donde la anaplasmosis es endémica se superpone con el área de distribución de *R. microplus*, aunque también se han reportado casos de anaplasmosis en áreas donde esta garrapata ha sido erradicada (Anziani, 1979; Guglielmone, 1995).

*Rhipicephalus microplus* comienza su fase parasitaria cuando las larvas que se encuentran en la vegetación acceden a un bovino. Las larvas se alimentan de 3 a 5 días, luego de lo cual mudan a ninfas, las cuales se alimentan y hacia el día 9 a 12 mudan a adultos (machos y hembras). Luego de la cópula, las hembras se ingurgitan (momento en que se las suele denominar teleoginas) y finalmente caen al suelo para desovar. La duración de la fase parasitaria completa es de aproximadamente 23 días (Nuñez et al., 1982). La fase no parasitaria de *R. microplus* comprende los períodos de pre-oviposición, oviposición, incubación, eclosión y vida libre de las larvas; su duración es variable y está determinada por factores ambientales. El período de pre-oviposición de *R. microplus* normalmente es de 2 a 6 días. Durante la oviposición las teleoginas ponen entre 2000 y 3000 huevos en un periodo que puede durar entre 13 y 45 días, y finalmente la incubación de los huevos tiene una duración de entre 19 y 51 días. Las larvas de vida libre pueden tener una longevidad de hasta 150 días (Ivancovich et al., 1984; Nuñez et al., 1982). Dado que esta garrapata realiza todo su ciclo parasitario sobre el mismo hospedador, la transmisión transovárica, de suceder, sería la más importante en términos epidemiológicos.

En la epidemiología de las enfermedades transmitidas por garrapatas, la transmisión transovárica de patógenos es una de las vías de transmisión vertical considerada de mayor relevancia dado que miles de larvas de garrapatas infectadas podrían acceder a diferentes hospedadores susceptibles, propagando el patógeno en cuestión. De hecho, constituye un mecanismo esencial en la epidemiología de la fiebre manchada, enfermedad causada por diferentes organismos pertenecientes al género *Rickettsia* de la familia Rickettsiae (Parola, 1993). La transmisión transovárica de *R.*

*rickettsii* y *Rickettsia parkeri* por garrapatas de los géneros *Amblyomma* y *Dermacentor*, y de *Rickettsia massiliae* por garrapatas del complejo *Rhipicephalus sanguineus* se encuentra bien documentada (Burgdorfer & Brinton, 1975; Matsumoto et al., 2005; Soares et al., 2012; Tarragona et al., 2016; Wright et al., 2015).

En cuanto a otros organismos del género *Anaplasma*, Parola (1993) afirmó que en el caso de *Anaplasma phagocytophylum* ocurre transmisión transestadial, pero que la transmisión transovárica no ocurre o es muy ineficiente. Sin embargo, otros autores han detectado ADN de *A. phagocytophylum* en larvas de garrapatas sin alimentar, sugiriendo la ocurrencia de transmisión transovárica. Tal es el caso de Baldrige et al., (2009) que detectaron el patógeno en un 36% de larvas de *Dermacentor albipinctus* nacidas de hembras infectadas; y Hauck et al., (2020) que reportaron un 6% de infección en aoves de *Ixodes ricinus* recolectados de vegetación.

En el caso de *A. marginale*, Howell et al., (1941) y Kuttler (1971) reportaron transmisión transovárica por *D. andersoni* y *R. annulatus* respectivamente. Rees (1934) reportó transmisión transovárica de *A. marginale* por *R. annulatus* en uno de siete experimentos realizados; y ausencia de transmisión transovárica en garrapatas de los géneros *Amblyomma* y *Dermacentor*. Anthony y Roby (1966), Kocan et al., (1981) y Stich et al., (1989) reportaron ausencia de transmisión transovárica de *A. marginale* en garrapatas del género *Dermacentor*; y Potgieter (1979) reportó ausencia de transmisión transovárica en las especies *Rhipicephalus simus*, *Rhipicephalus decoloratus* y *Hyalomma rufipes*.

En cuanto al potencial rol de *R. microplus* como vector biológico de *A. marginale*, existen estudios que demuestran que el patógeno es capaz de invadir y replicar en células de esta especie de garrapata (dos Santos et al., 2019; Esteves et al., 2009; Ribeiro & Lima, 1996; Scoles et al., 2007). Y si bien se ha demostrado que *R. microplus* es capaz de transmitir *A. marginale* transestadialmente (Aguirre et al., 1994) los resultados de estudios de transmisión transovárica de *A. marginale* por *R. microplus* son contradictorios. Rosenbusch & González (1923) reportaron que *R. microplus* es capaz de transmitir transováricamente *A. marginale* en condiciones cálidas de más 34 °C de temperatura; y autores como de Moura et al., (2003) y Shimada et al., (2004) reportaron presencia de ADN de *A. marginale* en huevos y larvas de *R. microplus*, e incluso transmisión del patógeno a bovinos susceptibles (Estrada et al., 2020). Mientras tanto, otros autores consideran que la transmisión transovárica de *A. marginale* por *R. microplus* es improbable (Connell & Hall, 1972; Uilenberg 1968; Thompson & Roa,

1978; Potgieter 1979; Potgieter & Stoltsz, 2004; Esteves et al., 2015). Algunos trabajos dedicados al estudio de la transmisión transovárica de *A. marginale* por *R. microplus* coinciden en que la misma podría estar influenciada por factores la temperatura durante el desarrollo de la fase no parasitaria del ciclo, los niveles de rickettsemia del hospedador vertebrado, el momento de alimentación de la garrapata y la cepa de *A. marginale* involucrada (Esteves et al., 2015; Estrada et al., 2020; Ribeiro & Lima, 1996; Ruiz et al., 2005; Shimada et al., 2004). En estudios de transmisión intraestadial y transestadial realizados con garrapatas del género *Dermacentor*, se ha demostrado que existen diferencias en la capacidad de transmitir el patógeno dependiendo de la cepa de *A. marginale* involucrada (Kocan et al., 2008; Scoles et al., 2006). En Argentina, se ha demostrado que la cepa patógena S1P de *A. marginale* es transmitida transestadialmente por las garrapatas *R. microplus* y *A. neumanni* (Aguirre et al., 1994; Gaido et al., 1995).

Con el fin de contribuir a un conocimiento más preciso del papel de *R. microplus* en la epidemiología de la anaplasmosis bovina y teniendo en cuenta los puntos mencionados, se llevaron a cabo tres ensayos diferentes pero complementarios para evaluar la competencia vectorial de *R. microplus* para transmitir transováricamente *A. marginale*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Experimento 1**

Para evaluar la competencia vectorial de *R. microplus* para transmitir transováricamente *A. marginale* en este experimento, se adoptaron los criterios de Barker y Reisen (2019) que consisten en alimentar el potencial artrópodo vector en un hospedador vertebrado infectado con *A. marginale*, otorgarle condiciones para la oviposición, alimentar las larvas eclosionadas después de la incubación en un hospedador vertebrado no infectado y susceptible y examinar al hospedador vertebrado para determinar si adquirió la infección.

#### **1.1. Bovinos**

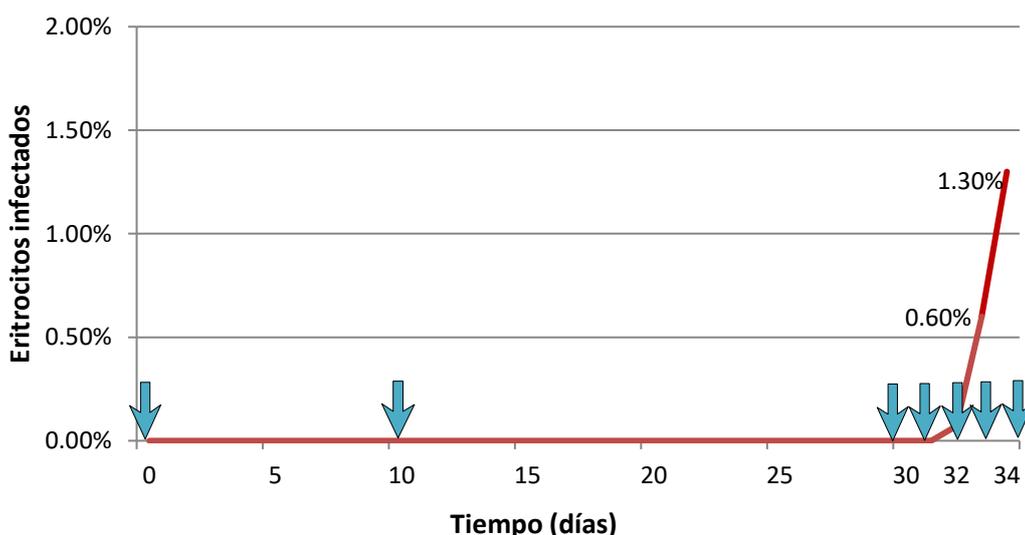
Se obtuvieron tres terneros Holstein (caravanas 479, 514 y 518) de cuatro meses de edad de un establecimiento libre de *Anaplasma* de la provincia de Buenos Aires,

región no infestada por garrapatas en Argentina. Se confirmó la negatividad de los terneros a *A. marginale* y *A. centrale* mediante ELISA doble paratope (dpELISA) (Sarli et al., 2019) y PCR anidada utilizando cebadores específicos para una región conservada de *msp1b* en el caso de *A. marginale* y *msp2* en el caso de *A. centrale* (Molad et al., 2006). Los terneros se mantuvieron en boxes de aislamiento en el Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA) del INTA, ubicado en la provincia de Buenos Aires en una zona no endémica de anaplasmosis. Los boxes tenían nivel de bioseguridad 2 con ventanas de vidrio fijo y sistema de ventilación artificial para evitar tanto la entrada de dípteros que pudieran interferir en la transmisión, como la fuga de garrapatas.

## 1.2. Procedimiento experimental

Se inoculó el ternero 479 mediante inyección subcutánea de  $10^8$  eritrocitos infectados con la cepa S1P de *A. marginale* aislada de la provincia de Salta, Argentina, criopreservada en nitrógeno líquido (de Ríos et al., 1988). Se controló la reacción clínica en el ternero diariamente, comenzando 17 días después de la inoculación mediante registro de temperatura rectal en grados Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ), medición del índice de hematocrito y recuento de eritrocitos infectados (rickettsemia) a través de observación microscópica de extendidos de sangre teñidos con Giemsa (aumento 1000x). Se realizó detección serológica y molecular para confirmar infección con *A. marginale*. El día 10 después de la inoculación, se infestó el ternero con larvas de *R. microplus* libres de *Babesia* spp. y *Anaplasma* spp. pertenecientes a una colonia libre mantenida desde el año 2009 en el Instituto de Patobiología (CICVyA-INTA). Las garrapatas se alimentaron normalmente, es decir no se colocaron bolsas ni cápsulas. La infección experimental con *A. marginale* en el ternero 479 se confirmó el día 17 posterior a la inoculación mediante PCR y se detectó por observación directa de extendidos sanguíneos a partir del día 32 post inoculación. El ciclo parasitario de las garrapatas en el ternero 479 tuvo una duración de 20 a 24 días. Las hembras ingurgitadas desprendidas se recolectaron durante los días 30, 31, 32, 33 y 34, cuando la rickettsemia del ternero era de entre un 0 a 1,3% (Figura 5). Luego del desprendimiento y recuperación de todas las hembras ingurgitadas, el ternero 479 fue tratado con una solución de Amitraz al 12,5% por aspersión. De las hembras ingurgitadas recuperadas en esta infestación, veinte se analizaron al momento de recolección mediante PCR

anidada para confirmar la ingestión de *A. marginale*. El resto de las garrapatas se incubaron a 25 ° C y 85% de humedad relativa (HR) para la oviposición. Los huevos se separaron en dos grupos: antes del día 10 de oviposición (G1) y después del día 10 de oviposición (G2). Transcurrida la incubación, y 15 días después de la eclosión, 20 *pools* de 100 larvas del G1 y 4 *pools* de 100 larvas de G2 se analizaron mediante PCR. Dos terneros susceptibles esplenectomizados fueron infestados con 80.000 larvas de ambos grupos. En ambos terneros susceptibles se evaluó temperatura rectal, índice de hematocrito, porcentaje de eritrocitos infectados, niveles de anticuerpos contra *Anaplasma* y presencia de ADN de *A. marginale* en los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84 y 91 después del desprendimiento de garrapatas. Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (protocolo CICUAE-INTA número 024/2012).



**Figura 5.** Niveles de rickettsemia (porcentaje de eritrocitos infectados con *Anaplasma marginale*) en ternero 479 infectado con cepa “S1P” de *A. marginale* e infestado con *Rhipicephalus microplus*. Con flechas azules se indican los momentos de inoculación experimental con *A. marginale* (día 0), infestación con larvas de *R. microplus* (día 10) y recolección de hembras de *R. microplus* (días 30, 31, 32, 33 y 34).

### 1.3. Purificación de ADN

Para la purificación de ADN a partir de muestras de sangre, se realizó lisis de 800  $\mu$ L de la muestra con buffer lisis de eritrocitos (0,14 M NH<sub>4</sub>Cl, 0,17 M Tris-HCl). La hemoglobina se eliminó mediante lavados con agua destilada. Se añadieron 400  $\mu$ L

de solución tamponada de proteinasa K para la digestión proteolítica. La mezcla se incubó a 58 °C durante 8 h. El ADN se extrajo con fenol / cloroformo / alcohol isoamílico, se precipitó con alcohol isopropílico y se lavó con etanol al 75%. Luego de la centrifugación, se dejó secar el sedimento y se re-suspendió en agua ultra-pura estéril (Invitrogen). Esta suspensión se almacenó a -20 °C hasta su uso. Para la purificación de ADN de las garrapatas, las hembras ingurgitadas se lavaron con hipoclorito de sodio al 10% durante 15 minutos y se enjuagaron con agua destilada. Cada garrapata se procesó individualmente mediante ruptura del idiosoma con tijeras en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. En el caso de las larvas, se conformaron *pools* de 100 larvas y se rompieron con tijeras en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Los procedimientos de lisis, extracción y precipitación fueron los descritos anteriormente.

#### 1.4. Análisis molecular

Las muestras de ADN se analizaron individualmente mediante una PCR anidada capaz de detectar hasta 50 eritrocitos infectados con *A. marginale* por mililitro de sangre (Molad et al., 2006). Los cebadores externos utilizados fueron AM456/AM1164, y los cebadores internos AM100/AM101 los cuales amplifican un fragmento 246 pares de bases (pb) del gen *mSP1b* específico de *A. marginale*. Cada ciclo de PCR incluyó un control negativo (agua) y un control positivo (ADN de *A. marginale*). Los amplicones se visualizaron en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio (Promega).

## 2. Experimento 2

Dado que se ha sugerido que la transmisión de *A. marginale* podría estar relacionada con la cepa, se realizó un experimento para evaluar la transmisión transovárica alimentando *R. microplus* en bovinos infectados con diferentes cepas de *A. marginale*. Este experimento se llevó a cabo en un establecimiento en Quimili, provincia de Santiago del Estero, Argentina, en una zona endémica de *R. microplus* (Guglielmone, 1992). Se seleccionaron dos terneros Brangus de cuatro meses de edad (caravanas 51 y 52) cuya infección natural fue confirmada mediante dpELISA (Sarli et al., 2019) y PCR (Primo et al., 2021). Los terneros se inocularon además mediante inyección subcutánea con  $10^8$  eritrocitos infectados con la cepa S1P de *A. marginale* aislada de la provincia de Salta, criopreservada en nitrógeno líquido (de Ríos et al., 1988). El día 28 después de la inoculación experimental, los terneros fueron infestados

con larvas de *R. microplus* de una colonia obtenida a partir de garrapatas colectadas del mismo campo con el objetivo de lograr una infestación significativa y coordinada. Luego de 22 días de infestación y transcurrido el ciclo parasitario, se recolectaron las hembras ingurgitadas. En este momento el porcentaje de eritrocitos infectados en los terneros 51 y 52 era <0,5 %, contabilizado en frotis de sangre teñidos con Giemsa.

Las hembras ingurgitadas recolectadas se incubaron a 25 °C y 85 % de HR. Al finalizar la oviposición (21-25 días después del momento de recolección) se analizaron 30 hembras mediante nPCR para detectar *A. marginale*. Transcurridos 15 días de la eclosión, 30 *pools* de 100 larvas de cada hembra se analizaron mediante nPCR para detectar *A. marginale*.

Con el propósito de describir los genotipos de *A. marginale* existentes en los terneros durante la alimentación de las garrapatas, se realizó un análisis molecular de la sangre de los terneros al inicio y al final de la infestación.

## 2.1. Análisis molecular

Los genotipos de *A. marginale* en los terneros 51 y 52 se identificaron mediante la caracterización del gen *mSP1a*, el cual codifica para la proteína mayor de superficie 1a (MSP1a). Las secuencias de repeticiones en tándem de MSP1a han sido utilizadas para proveer información sobre cepas de *A. marginale* en diferentes partes del mundo (de la Fuente et al., 2007). Para la caracterización del gen *mSP1a* en este ensayo se realizó una PCR utilizando los cebadores MSP1 $\alpha$ 1-1603F/MSP1 $\alpha$ 2-2926R (Primo et al., 2021). Los productos de PCR obtenidos se purificaron con Wizard® SV Gel y PCR Clean-Up System y se clonaron con la metodología descrita en Primo et al., (2021). Se enviaron a secuenciar cinco clones de cada muestra utilizando los cebadores del vector promotor SP6 y T7 (Instituto de Biotecnología, INTA CICVyA, Argentina y Macrogen, Seúl). Las secuencias fueron alineadas, editadas y analizadas utilizando BioEdit (Hall, 1999). El análisis de las repeticiones en tándem se realizó según Cabezas-Cruz et al., (2013) y de la Fuente et al., (2007). El microsatélite (ms) 5'-UTR localizado entre la secuencia putativa Shine-Dalgarno (GTAGG) y el codón de inicio de la traducción (ATG) fueron utilizados para asignar el genotipo (Estrada-Peña et al., 2009). Su estructura es (G/A TTT) $m$  (GT) $n$  T ATG. La distancia SD-ATG se calculó en nucleótidos como  $(4 \times m) + (2 \times n) + 1$  (Cabezas-Cruz et al., 2013; Estrada-Peña et al.,

2009). Se utilizó el software RepeatAnalyzer (Catanese et al., 2016) para identificar repeticiones del *msp1a*.

Las hembras y los *pools* de larvas de *R. microplus* se analizaron mediante la PCR anidada anteriormente descrita para amplificar un fragmento del gen *msp1b* según Molad et al., (2006). Los procedimientos de lavado, lisis, extracción y precipitación para obtención del ADN fueron los mismos descriptos anteriormente.

### 3. Experimento 3

Se recolectaron larvas de vida libre de *R. microplus* en establecimientos con presencia de bovinos portadores de *A. marginale*, para determinar si existe infección natural con cepas locales de *A. marginale* en estos estadios, lo cual sería resultado de una transmisión transovárica. Se utilizó la técnica de *dragging*, que consiste en arrastrar un paño de tela blanca de 1,0 × 1,5 m por la vegetación por períodos de 30 min, durante los cuales las garrapatas colectadas se van retirando del paño cada 10 m. Se procesaron *pools* de larvas para la purificación de ADN tal lo descripto anteriormente. Las muestras de ADN se examinaron para detectar infección por *Anaplasma* mediante una PCR tiempo real utilizando los cebadores AE2-Fw/AER, los cuales fueron diseñados para amplificar un fragmento de 177 pb del gen *16S rRNA* de la familia Anaplasmataceae (Monje et al., 2019). Las muestras positivas a la PCR en tiempo real se analizaron a su vez mediante diferentes PCRs. En primer lugar, las muestras positivas se analizaron mediante una PCR que amplifica un fragmento de 360 pb del gen *16S rRNA* de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* utilizando los cebadores GE2'F2'/HE3 (Aguiar et al., 2008). Las muestras que resultaron positivas a esta PCR se analizaron a su vez utilizando dos ensayos de PCR descritos previamente por Weisburg et al., (1991) y Parola et al., (2000) que amplifican el gen *16S rRNA* casi completo. Los pares de cebadores utilizados fueron fD1/Ehr16SR y Rp2/Ehr16SD. En las PCRs mencionadas se utilizó ADN de *Anaplasma centrale*. y *Ehrlichia canis* como controles positivos y agua ultrapura como control negativo. Tras la purificación de los amplicones de PCR (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) las muestras se enviaron a la Unidad de Genómica del INTA Castelar para su secuenciación. Las secuencias parciales obtenidas se editaron utilizando BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) con edición manual cuando fue necesario y se unieron para lograr la secuencia casi completa de *16S rRNA*. Las secuencias se compararon con aquellas disponibles en el GenBank

por medio de BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las muestras positivas se analizaron mediante PCR anidada para amplificar un fragmento del gen *msp1b* específico de *A. marginale* según Molad et al., (2006).

## RESULTADOS

Los períodos de preoviposición, oviposición e incubación en el Experimento 1 fueron de 3-6, 10-13 y 30 días, respectivamente. Todas las hembras recolectadas resultaron positivas a la presencia del gen *msp1b* de *A. marginale* por PCR, amplificando el fragmento de 246 pb. Estos resultados confirmaron que las garrapatas ingirieron *A. marginale* al alimentarse del ternero 479. No se detectó la presencia de *A. marginale* en los *pools* de larvas progenie (Tabla 1). Las larvas no fueron capaces de transmitir la infección a los terneros susceptibles esplenectomizados 514 y 518. Durante el monitoreo de 90 días, no se detectó *A. marginale* mediante PCR ni observación directa en los terneros susceptibles. No se detectó aumento de la temperatura rectal, anemia ni síntomas clínicos de anaplasmosis. Los niveles de anticuerpos en terneros susceptibles permanecieron por debajo del punto de corte de la prueba, considerándose negativos durante todo el experimento.

**Tabla 1.** Prevalencia de infección con *Anaplasma marginale* en hembras ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* y su progenie (larvas G1 y G2). Las muestras de ADN se analizaron por PCR anidada para el gen *msp1b* de *A. marginale*. G1, larvas de huevos ovipuestos antes del día 10 de oviposición; G2, larvas de huevos ovipuestos después del día 10 de oviposición;

Estadio de garrapata	Muestras positivas
Hembras ingurgitadas	20/20
Larvas G1	0/20*
Larvas G2	0/4*

\**pools* de 100 larvas.

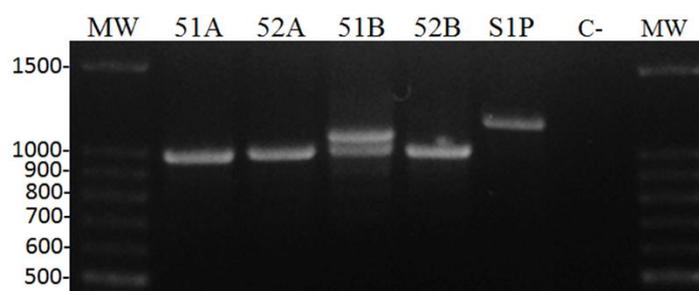
En el Experimento 2, el fragmento *msp1a* de *A. marginale* amplificado por PCR en los terneros 51 y 52 mostró bandas de  $\approx 1000$  pb (Figura 6). Los genotipos encontrados después de la clonación y la secuenciación se encuentran descritos en la Tabla 2. En este estudio se describió por primera vez una nueva secuencia de repetición en tándem de *A. marginale* MSP1a (ADSSSASGQQQESSCLPSGQASASSQLG) a la cual se le asignó el nombre “Q1”. Al finalizar la oviposición, se detectó el gen *msp1b* de

*A. marginale* en cinco de 30 (16,6 %) hembras recolectadas. La progenie de larvas en su totalidad resultó negativa a la amplificación del fragmento *msp1b* de *A. marginale*.

**Tabla 2.** Genotipos de *msp1a* de *Anaplasma marginale* definidos por microsatélites (ms) y secuencias de repetición en tándem (TRS) en terneros infectados naturalmente de Quimili, Santiago del Estero. La estructura de los microsatélites fue definida siguiendo a Primo et al., (2021).

Ternero	Número de clones	ms	TRS
51 <sup>a</sup>	3	C	13 18 18 100
51 <sup>a</sup>	1	C	13 F
52 <sup>a</sup>	4	E	$\tau$ 22-2 13 18
52 <sup>a</sup>	1	E	18
51 <sup>b</sup>	2	E	$\alpha$ $\beta$ $\beta$ $\gamma$
52 <sup>b</sup>	3	C	13 18 18 100
52 <sup>b</sup>	1	E	$\tau$ Q1 X4 M
52 <sup>b</sup>	1	E	$\tau$ 22-2 13 18

<sup>a</sup>muestras obtenidas al momento de infestación con larvas de *Rhipicephalus microplus*;  
<sup>b</sup>muestras obtenidas al momento de recolección de hembras ingurgitadas de *R. microplus* (día 22 post infestación).



**Figura 6.** Productos de PCR de fragmentos del gen *msp1a* de *Anaplasma marginale* separados en gel TAE-agarosa al 1 %. MW: 100-pb DNA ladder (PB-L Productos Bio-Lógicos®, Argentina); 51A, 52A: muestras de terneros 51 y 52 obtenidas al momento de infestación con larvas de *Rhipicephalus microplus*; 51B, 52B: muestras de terneros 51 y 52 obtenidas al momento de recolección de hembras ingurgitadas de *R. microplus* (22 días después de la infestación); S1P: muestra de un ternero infectado experimentalmente con la cepa S1P de *A. marginale*; C-: control negativo (agua).

En el Experimento 3, se recolectaron de vegetación un total de 2,310 larvas de *R. microplus*, las cuales fueron agrupadas en *pools* (Tabla 3). 19/47 *pools* resultaron positivos para la amplificación del fragmento de 177 pb del gen *16S rRNA* en la PCR de tiempo real. Los valores de Ct obtenidos fueron de 30 a 35. Siete de estas 19 muestras positivas resultaron positivas a la primera PCR convencional de Aguiar et al., (2008). Estas siete muestras se analizaron utilizando las dos PCRs que amplifican el gen *16S rRNA* casi completo (Weisburg et al., 1991; Parola et al., 2000). Tres de las siete secuencias obtenidas (número de acceso de GenBank: ON986301, ON986303, ON986304) tenían alta identidad (99,85 % - 99,89 %) con secuencias de *Anaplasma* que no pertenecen a *A. marginale* (número de acceso de GenBank: KU586169.1, KX987336.1) mientras que el porcentaje de similitud de estas secuencias con *A. marginale* str. St. Marie fue 97,73 % - 98,73 % (número de acceso de GenBank: CP000030.1). Las cuatro secuencias restantes correspondieron a bacterias del suelo. Las 19 muestras positivas a la PCR en tiempo real fueron analizadas por nPCR específica de *A. marginale* (Molad et al., 2006) con resultados negativos (Tabla 3).

Además de las larvas, durante el *dragging* en Colonia Benítez se recolectó un macho de *R. microplus* de vegetación.

**Tabla 3.** Resultados de análisis molecular de larvas de *R. microplus* recolectadas de vegetación analizadas con PCR en tiempo real para amplificación de un fragmento del gen *16S rRNA* y PCR anidada para un fragmento del gen *mSP1b* específico de *A. marginale*.

Localidad/Provincia	Latitud/Longitud	Mes de recolección	Muestras Positivas a PCR en tiempo real gen <i>16S rRNA</i>	Muestras positivas a PCR anidada gen <i>mSP1b</i>
Tabay (Corrientes)	S28°18'/W58°17'	Abril	10/22*	0/10
San Martín (Chaco)	S26°53'/W59°30'	Julio	9/19*	0/9
C. Benítez (Chaco)	S29°18'/W59°12'	Diciembre	0/1**	-
Goya (Corrientes)	S27°20'/W58°56'	Diciembre	0/5*	-

\**pools* de 50 larvas. \*\**pool* de 10 larvas.

## DISCUSIÓN

Para ser transmitida transováricamente, una rickettsia necesita ingresar y multiplicarse en células del intestino y luego pasar a la hemolinfa, alcanzar los ovarios e infectar los ovocitos con suficiente rapidez antes de la formación de la membrana vitelina quitinosa (Burgdorfer & Brinton, 1975; Randolph, 1998). Algunos autores demostraron que *A. marginale* es capaz de invadir y replicarse en células de *R. microplus* (dos Santos et al., 2019; Esteves et al., 2009; Scoles et al., 2007). Ribeiro & Lima (1996) analizaron intestinos de hembras de *R. microplus* alimentadas en bovinos infectados con *A. marginale*, detectando colonias de *A. marginale* en las células intestinales de las hembras a partir del día 10 de oviposición. Sin embargo, las larvas de estas hembras infectadas no fueron capaces de transmitir *A. marginale* a bovinos susceptibles (Ribeiro et al., 1996). En el presente estudio, las larvas se separaron en dos grupos: aquellas nacidas de huevos ovipuestos hasta el día 10 de oviposición, y aquellas nacidas de huevos ovipuestos después del día 10 de oviposición. Ambos grupos resultaron negativos tanto en el análisis molecular como en la transmisión a los terneros susceptibles, lo que indica que el patógeno no superó algunos de los procesos mencionados como necesarios para lograr la infección de larvas.

Uno de los factores que determina la eficiencia de la transmisión transovárica de un patógeno es el nivel del mismo en el hospedador vertebrado (Burgdorfer & Brinton, 1975). En el presente ensayo de competencia vectorial, las hembras ingurgitadas se alimentaron con niveles de rickettsemia de hasta 1,3%, con resultados de transmisión negativos. Estos valores podrían considerarse representativos e incluso algo más altos a los encontrados en áreas endémica para *A. marginale*, donde se han descrito niveles de rickettsemia inferiores al 0,02% en animales portadores (Aguirre et al., 1988). Otros estudios han reportado que incluso con altos niveles de infección por *A. marginale*, característica distintiva de la anaplasmosis aguda, no se produce transmisión transovárica en *R. microplus* (Esteves et al., 2015; Ruiz et al., 2005). En el caso de organismos de la familia Rickettsiae, se ha demostrado que la infección de las larvas progenie aumenta cuando las garrapatas hembras adquieren la infección durante la etapa larvaria o ninfal (Burgdorfer & Brinton, 1975; Tarragona et al., 2016). En el segundo experimento de este trabajo, se detectó ADN de *A. marginale* en el 16,6% de las hembras analizadas, lo que confirmó la ingestión del patógeno. El bajo porcentaje de garrapatas positivas puede estar relacionado con una degradación del ADN debido al momento de la extracción del ADN (21-25 días después del desprendimiento). No es

posible afirmar si el ADN detectado en las hembras correspondía a residuos de *A. marginale* ingerido en la luz intestinal, o a una infección ya establecida en los tejidos de las garrapatas analizadas. Sin embargo, la detección de garrapatas positivas confirmó que las mismas efectivamente habían ingerido el patógeno en alguna de sus etapas ya sea larvaria, ninfal o adulta, dado que, el día en que se sembraron las larvas, los terneros 51 y 52 ya se encontraban infectados con *A. marginale*. Sin embargo, no ocurrió transmisión. Este resultado se encuentra en consonancia con Ruiz et al., (2005) que demostraron ausencia de transmisión transovárica a partir de hembras de *R. microplus* que se habían alimentado durante las etapas larvaria, ninfal y adulta en un bovino con rickettsias de entre un 28 % y 72 %.

La temperatura de incubación de las garrapatas durante el periodo de pre-oviposición podría influir en la transmisión transovárica, pero las hipótesis sobre el efecto de esta variable son contradictorias. En el presente estudio, con temperaturas de 25 °C y periodos de pre-oviposición de 3 a 6 días, la progenie analizada resultó negativa al análisis molecular e incapaz de transmitir *A. marginale*. Shimada et al., (2004) amplificaron por PCR ADN específico de *A. marginale* en huevos y larvas de garrapatas hembras incubadas a 18 °C, concluyendo que los periodos prolongados de pre-oviposición debido a bajas temperaturas aumentarían la probabilidad de que el patógeno invada embriones de garrapatas. Este resultado es inconsistente respecto a los obtenidos por Esteves et al., (2015) y Estrada et al., (2020) quienes incubaron hembras a 18 °C durante la pre-oviposición, con resultados negativos de PCR y transmisión. Respecto a la detección de ADN de *A. marginale* en huevos de garrapata, es importante tener en cuenta que la desinfección previa a la extracción de ADN debe ser rigurosa, dado que al momento de ovipositar la hembra lleva cada uno de los huevos a su aparato bucal para contactar con el órgano de Gené (Diehl et al., 1982). En esta instancia los huevos pueden verse contaminados con ADN de *A. marginale* de la cavidad bucal, proveniente de la ingestión reciente de sangre infectada o de la misma saliva de la hembra.

Considerando que la temperatura en condiciones de campo podría afectar los períodos de pre-oviposición y de incubación de los huevos, en el Experimento 3 se recolectaron larvas de *R. microplus* en su fase de vida libre en pasturas de tres establecimientos con anaplasmosis endémica, en diferentes épocas del año. Las larvas fueron analizadas por PCR para detectar *A. marginale*, con resultados negativos. Si bien en este último ensayo el período de pre-oviposición no fue registrado, en Argentina las

investigaciones sobre la ecología de *R. microplus* han reportado periodos de pre-oviposición de 8 a 10 días en los meses más fríos (Nava et al., 2020). Esta cantidad de días es similar a la propuesta por Shimada et al., (2004) como necesaria para la transmisión transovárica; sin embargo, las larvas de huevos ovipuestos e incubados en estas condiciones tienen una corta longevidad o directamente no eclosionan (Canevari et al., 2017; Esteves et al., 2015; Nava et al., 2013, 2022). Además, aunque la transmisión transovárica fuera posible durante la estación fría en latitudes subtropicales, la abundancia de garrapatas que infestan al ganado hacia el final del invierno es baja (Canevari et al., 2017; Nava et al., 2020) lo que minimiza la probabilidad de que un bovino se infecte con *A. marginale* a través de larvas de *R. microplus* presuntamente infectadas. Estrada et al., (2020) reportaron transmisión transovárica de *A. marginale* en *R. microplus* incubadas a 28 °C, pero este estudio contiene inconsistencias metodológicas como la falta de análisis por PCR de las hembras para verificar la infección tras alimentarse en terneros infectados. Por el contrario, Esteves et al., (2015) reportaron resultados de PCR negativos con una incubación de 28 °C y Ruiz et al., (2005) ausencia de transmisión y multiplicación de la rickettsia en el intestino de garrapatas incubadas a 27 °C. Ribeiro & Lima (1996) observaron colonias de *A. marginale* en células intestinales de garrapatas, pero estas habían sido incubadas a 37 °C durante 60 h antes de la disección, situación que parece improbable bajo condiciones naturales en áreas subtropicales. A pesar de que la temperatura podría afectar la tasa de transmisión transovárica de *A. marginale*, los resultados de campo y de laboratorio informados en este trabajo y en trabajos anteriores (Connell & Hall, 1972; Leatch, 1973; Potgieter, 1979, 1981; Thompson & Roa, 1978; Ribeiro et al., 1996; Ruiz et al., 2005; Esteves et al., 2015) y las condiciones ecológicas descritas para *R. microplus* sugieren que la transmisión transovárica de *A. marginale* es poco probable.

Estudios previos sobre la transmisión transtadial e intraestadial de *A. marginale* por *Dermacentor* spp. y *Rhipicephalus* spp., han sugerido que la eficiencia de la transmisión de *A. marginale* por garrapatas dependería de la cepa de *A. marginale*. (Scoles et al., 2006; Scoles et al., 2007; Smith et al., 1986; Wickwire et al., 1987). Esta hipótesis podría explicar los resultados opuestos de estudios previos sobre la transmisión transovárica de *A. marginale* por *R. microplus*, como Esteves et al., (2015) y Estrada et al., (2020) que utilizaron condiciones de incubación similares pero distintas cepas de *A. marginale*. Actualmente la identificación de cepas de *A. marginale* de diferentes orígenes geográficos se realiza mediante secuenciación de un fragmento del

gen *m脾1α*. Este gen, que codifica para la proteína MSP1a, posee un fragmento con un número variable de repeticiones (Allred et al., 1990) que es conservado durante la multiplicación de la rickettsia en el bovino y en el artrópodo (Bowie et al., 2002; Palmer et al., 2001). La mayor heterogeneidad de genotipos de *A. marginale* se ha observado en áreas endémicas, lo cual puede ser explicado por movimientos del ganado y eventos independientes de transmisión, con la consecuente introducción de múltiples genotipos (Aubry & Geale, 2011; de la Fuente et al., 2007). En el caso de Argentina la diversidad genética para el gen *m脾1α* es mayor en áreas geográficas con presencia de *R. microplus*, existiendo incluso casos de superinfecciones (Ruybal et al., 2009) fenómeno reportado previamente por Palmer et al., (2004) en Estados Unidos.

La cepa S1P de *A. marginale* utilizada en esta tesis, cuyos genotipos se encuentran descritos en Primo et al., (2021) es transmitida transtadialmente por *R. microplus* y *A. neumanni* (Aguirre et al., 1994; Gaido et al., 1995). Sin embargo, esto no necesariamente implica transmisión transovárica, tal como lo demostraron Connell & Hall (1972), Leatch (1973) y Potgieter (1979, 1981) con otras cepas de *A. marginale*. En el presente trabajo, la colonia de *R. microplus* mantenida en el CICVyA-INTA durante diez años fue incapaz de transmitir transováricamente la cepa S1P de *A. marginale*. La falta de amplificación de ADN de *A. marginale* en las larvas de *R. microplus* fue consistente con los resultados negativos. En el Experimento 2 se trabajó con genotipos de campo de *A. marginale*, los cuales se describieron mediante secuenciación de clones de *m脾1α* obtenidos de los terneros 51 y 52 al inicio y al final de la infestación con *R. microplus* (Tabla 2). Al amplificar y clonar fragmentos de *m脾1α*, generalmente solo se pueden secuenciar las bandas principales (es decir, el genotipo más abundante) (Primo et al., 2021). De los genotipos obtenidos en el Experimento 2 ninguno correspondía a la cepa S1P, lo cual llevaría a pensar que los genotipos de esta cepa no prosperaron o bien se encontraban en muy baja cantidad respecto a los genotipos de campo presentes al momento del muestreo para ser detectados en las pruebas de PCR. Es decir que en el Experimento 2, no es posible dilucidar si las hembras ingirieron genotipos de la cepa S1P de *A. marginale*, con lo cual tampoco se puede afirmar que no los transmitieron. Sin embargo, es posible afirmar que la transmisión transovárica de los genotipos de *A. marginale* descritos en la Tabla 2, resultó negativa. La evaluación de la competencia vectorial de *R. microplus* para transmitir transováricamente otros genotipos de *A. marginale* sería un trabajo de

investigación pertinente pero difícil, debido a la gran diversidad de genotipos de *A. marginale* reportados (dos Santos et al., 2019; Hove et al., 2018; Ruybal et al., 2009).

Aunque algunas excepciones indican lo contrario (Rosenbusch & Gonzalez, 1923; Estrada et al., 2020; Shimada et al., 2004), la evidencia obtenida en este trabajo, en consonancia con investigaciones previas (Connell & Hall, 1972; Esteves et al., 2015; Leatch, 1973; Potgieter, 1979, 1981; Ribeiro et al., 1996; Ruiz et al., 2005; Thompson & Roa, 1978) sugiere fuertemente que la transmisión transovárica de *A. marginale* por *R. microplus* no es un evento viable.

## Capítulo 2: Migración de adultos de *Rhipicephalus microplus*

### INTRODUCCIÓN

Un aspecto importante a considerar en la transmisión de *A. marginale* por *R. microplus* es que ésta es una garrapata que realiza todo su ciclo sobre un único hospedador, es decir: no se desprende del hospedador cada vez que muda. Con lo cual, además de la transmisión transovárica, la otra vía posible de transmisión de un patógeno que adquiere importancia es la intraestadial, la cual ocurre cuando una garrapata migra de un hospedador infectado a otro no infectado y allí le transmite el patógeno. La transmisión intraestadial de *A. marginale* por *R. microplus* ha sido demostrada experimentalmente en diferentes estudios, al igual que la transmisión transestadial (Aguirre et al., 1994; Connell & Hall, 1972; Futse et al., 2003; Leatch, 1973; Thompson & Roa, 1978). Ambas formas de transmisión serían relevantes en caso de ocurrir migración de garrapatas entre bovinos, donde los especímenes migrantes podrían portar una infección obtenida transestadialmente a partir del estadio anterior.

En el caso de otras especies de la familia Ixodidae, Stiller et al., (1989) demostraron que machos de *D. andersoni* migraron de tres bovinos donantes a cinco bovinos receptores en condiciones semi-naturales. La migración de machos de *D. andersoni* también fue demostrada por Lysyk (2013) quien incluso describió la influencia de diferentes variables como la temperatura ambiente, la intensidad de infestación y la edad de las garrapatas hembras sobre la tasa de migración. En estos trabajos la migración de otros estadios (larvas, ninfas o hembras) no fue evaluada. En un estudio realizado con una especie del complejo *R. sanguineus* se evidenció transferencia de especímenes adultos entre perros (Little et al., 2007).

Los reportes de migración de especímenes de *R. microplus* entre bovinos son escasos, y la tasa de migración y los factores que influyen sobre la misma son desconocidos (Connell & Hall 1972; Mason & Norval 1981; Uilenberg, 1970; Guglielmone, 1995). Connell & Hall (1972) observaron presencia de todos los estadios en bovinos inicialmente no infestados que convivieron con un bovino infestado, aunque la cantidad de especímenes hallados no fue cuantificada. Estos autores también mencionaron el hallazgo de ocho hembras ingurgitadas de *R. microplus* en un ternero de 5 días de edad, que evidentemente se infestó con adultos jóvenes. Mason y Norval (1981) reportaron migración de larvas y adultos de *R. microplus* entre bovinos.

Para determinar la relevancia epidemiológica de *R. microplus* en la transmisión de *A. marginale*, es fundamental conocer los factores que inciden en la dinámica migratoria de *R. microplus*. Para ello, se realizó un ensayo donde se evaluó la tasa de migración de especímenes adultos de *R. microplus* entre bovinos alojados en potreros con diferente carga animal.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Para evaluar la dinámica de migración de *R. microplus* entre bovinos, se realizó un ensayo en un predio del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Colonia Benítez, Colonia Benítez, Provincia del Chaco, Argentina. Esta región presenta un promedio anual de precipitaciones de 1200 mm y está clasificada como favorable para el desarrollo de *R. microplus* (Guglielmone, 1992). El ensayo se realizó en junio de 2018 (finales de otoño). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Cuidado Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (Protocolo número 443/18).

Treinta y cinco bovinos Braford se distribuyeron en dos grupos con diferente carga animal en sendos potreros de pastizales de *Setaria sphacelata*. El potrero del Grupo 1 tuvo una carga de dos bovinos por hectárea, mientras que el potrero del Grupo 2 tuvo una carga de cinco bovinos por hectárea. En ambos grupos, la prevalencia inicial de infestación por *R. microplus* (bovinos infestados / total de bovinos) fue del 20%. El Grupo 1 se conformó con dos bovinos infestados (donantes) y ocho bovinos no infestados (receptores), mientras que el Grupo 2 se conformó con cinco donantes y veinte receptores. Todos los bovinos receptores fueron tratados con una formulación de flumetrina al 1% (BAYTICOL®; Bayer SA, Argentina) y fipronil (ECTOLINE®; Boehringer Ingelheim) 16 días y dos días antes del día 0, respectivamente. El efecto residual absoluto de estos acaricidas es de 9 y 1 días para flumetrina y fipronil, respectivamente, lo que permitiría la fijación de potenciales garrapatas migratorias desde el inicio del ensayo. El día 0, los bovinos receptores se revisaron minuciosamente para verificar la ausencia de garrapatas, y se contaron las hembras de *R. microplus* de 4.5–8.0 mm en un lado de cada una de los bovinos donantes para estimar la intensidad de la infestación (número de garrapatas / número de bovinos infestados). Posteriormente, los donantes y receptores se agruparon en los dos grupos descritos anteriormente, en los cuales convivieron durante 13 días, momento en que finalizó el ensayo. En los bovinos receptores se contabilizó mediante una exhaustiva revisión la

presencia de garrapatas machos y hembras de *R. microplus* los días 2, 6, 9 y 13. La fase parasitaria de *R. microplus* tiene una moda de aproximadamente 23 días y los primeros machos adultos y hembras no alimentados (neandros y neoginas según la terminología utilizada por Nuñez et al., 1982) se observan en los días 13.5 y 14.5, respectivamente (Nuñez et al., 1982). Para evitar el recuento de adultos procedentes de larvas adheridas a los bovinos a partir del día 0, el ensayo tuvo una duración de 13 días. Se calculó la incidencia acumulada (bovinos receptores infestados / total de bovinos receptores examinados) y se determinó la significación estadística para la incidencia acumulada mediante la prueba de Chi-cuadrado. La tasa de infestación de ambos grupos se calculó mediante la prueba de supervivencia de Kaplan-Meier (MedCalc). Las diferencias se consideraron significativas con valores de  $P < 0,05$ .

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La intensidad de infestación en las vaquillonas donantes fue de 240 garrapatas ( $DE \pm 90$ ). La incidencia acumulada el día 13 fue del 25% (2/8) en el Grupo 1 y del 65% en el Grupo 2 (Tabla 5). Si bien la diferencia en la incidencia acumulada entre grupos no fue estadísticamente significativa ( $P = 0,13$ ) se consideró biológicamente relevante. La tasa de infestación (Figura 7) fue mayor en el Grupo 2 con diferencias significativas entre los grupos ( $P = 0,05$ ). De todas las garrapatas adultas registradas en los animales receptores, el 35% fueron machos y el 65% hembras (valores obtenidos a partir de Tabla 4).

**Tabla 4.** Registro de especímenes adultos de *Rhipicephalus microplus* hallados en bovinos que al Día 0 se encontraban no infestados y comenzaron a convivir con bovinos infestados con *R. microplus*. Al Día 0 la prevalencia de infestación (bovinos infestados / total de bovinos) era del 20% en ambos grupos. El Grupo 1 tenía una carga animal de 2 bovinos por hectárea y el Grupo 2 tenía una carga animal de 5 bovinos por hectárea.

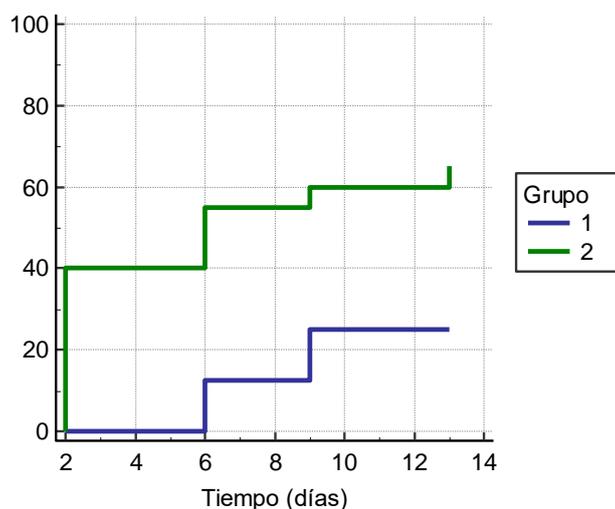
GRUPO	ID	DÍA 2	DÍA 6	DÍA 9	DÍA 13
GRUPO 1	13				
	18			1 Macho	2 Hembras
	19				
	24				
	70				
	250		1 Macho, 3 Hembras	1 Hembra	
	990				
	5771				
GRUPO 2	4		1 Macho, 1 Hembra		
	20				
	23				
	29				
	34	1 Hembra	2 Machos		
	35	1 Hembra			
	71				
	262	1 Hembra	1 Hembra		
	977			1 Macho	
	980	1 Hembra			
	993				
997				1 Macho, 1 Hembra	

GRUPO	ID	DÍA 2	DÍA 6	DÍA 9	DÍA 13
GRUPO 2	998	2 Hembras	1 Macho		
	5770				
	B337	1 Hembra			
	B378				
	B391		1 Macho		
	B414	1 Hembra			
	B440		1 Macho		
	B452	2 Hembras			1 Macho, 1 Hembra

**Tabla 5.** Incidencia acumulada de infestación con adultos de *Rhipicephalus microplus* en grupos de bovinos con diferente carga animal (animales por hectárea). La incidencia acumulada se calculó como bovinos receptores infestados / total de bovinos receptores examinados.

Grupo	Carga	Día 2	Day 6	Day 9	Day 13
1	2 a/ha	0/8	1/8 (12,5%)	2/8 (25%)	2/8 (25%)
2	5 a/ha	8/20 (40%)	11/20 (55%)	12/20 (60%)	13/20 (65%)

a/ha: animal por hectárea.



**Figura 7.** Tasa de infestación con adultos de *Rhipicephalus microplus* calculada con prueba de supervivencia de Kaplan-Meier en grupos de bovinos con diferente carga animal. El Grupo 1 tenía una carga animal de 2 bovinos por hectárea y el Grupo 2 tenía una carga animal de 5 bovinos por hectárea.

Los especímenes observados en los bovinos receptores el día 13 del presente trabajo fueron neoginas, partenoginas y teleoginas. Nuñez et al., (1982) observaron las primeras hembras no distendidas (neoginas) el día 14,5 del ciclo, es decir un día y medio después del final de este ensayo. Durante un estudio sobre el ciclo parasitario de *Rhipicephalus australis* (anteriormente conocido como *R. microplus*) Hitchcock (1955) observó machos desde el día 11,9 y hembras no distendidas desde el día 12,9. Incluso si esta información fuera extrapolada a *R. microplus*, el hallazgo de garrapatas adultas en los bovinos receptores en los días 2, 6 y 9 en el presente trabajo demuestra que estos especímenes no pudieron haber llegado de la pastura como larvas.

Los resultados de este trabajo coinciden con hallazgos previos que informaron la migración de garrapatas *R. microplus* entre bovinos en condiciones experimentales. Uilenberg (1970) reportó una migración de garrapatas del 1%. Mientras que en el caso de Mason & Norval (1981) el porcentaje de migración estimado fue igual o mayor a 0,24%. En condiciones de campo, Guglielmone (1995) reportó migración del 0,01% de *R. microplus* en un potrero de bovinos con una carga de 1 an/ha. En este último estudio, el 16,6% (1/6) de los bovinos inicialmente no infestados se infestaron el día 8 del ensayo (datos no publicados). En el presente trabajo, se calculó una incidencia acumulada similar (12,5%) el día 6 en el G1, cuya carga animal era de 2 an/ha. En Uilenberg (1970) y Connell & Hall (1972) las dimensiones del espacio donde los

bovinos se alojaban no fueron descritas, pero puede suponerse que se trataba de espacios reducidos dado que eran ensayos de transmisión de *Anaplasma* que requerían condiciones de aislamiento. En el caso de Mason & Norval (1981) trabajaron en potreros donde la carga animal era de 5 a 7 an/ha, similar al G2 del presente trabajo, y la incidencia de infestación en los bovinos receptores fue del 42% (3/7). En el presente trabajo la incidencia de infestación acumulada fue del 25% en el grupo con menor carga animal (2 an/ha) y de un 65% en el grupo con mayor carga animal (5 an/ha). Stiller et al., (1989) evaluaron la migración de machos de *D. andersoni* entre bovinos dadores (3) y receptores (5) que convivieron durante 17 días en un potrero con una carga de 160 an/ha, y encontraron que el 100% de los bovinos receptores resultó infestado.

En cuanto a los estadios sobre los que se reportó migración, Connell & Hall (1972) indicaron la presencia de todos los estadios de *R. microplus* en un ternero inicialmente no infestado con garrapatas que fue alojado con un ternero infestado. Bennett (1974) recolectó del suelo ejemplares de *R. microplus* que caían de bovinos infestados, encontrando larvas, ninfas y adultos vivos, lo que llevaría a suponer que los estadios “desprendidos” son capaces de acceder a un nuevo hospedador y completar su ciclo. Mason & Norval (1981) confinaron bovinos infestados (donantes) de *R. microplus* con bovinos no infestados (receptores) durante periodos de tiempo determinados, y reportaron el hallazgo de 69 especímenes (13 ninfas, 5 machos y 51 hembras) en los receptores que habían estado expuestos a los donantes en los días 1 a 7 (cuando las larvas estaban presentes) y 2 machos en uno de los tres bovinos receptores que habían estado expuestos los días 14 a 36 (cuando los adultos estaban presentes en los donantes). No se recuperaron *R. microplus* de los bovinos receptores que habían estado expuestos los días 7 a 14 (cuando había ninfas en los donantes). Estos autores concluyeron que los especímenes migrantes fueron larvas y adultos. Es improbable que los especímenes hallados hayan provenido de larvas del suelo, dado que 24 h después de la infestación inicial los bovinos dadores fueron trasladados a un potrero diferente y limpio, donde fueron confinados con los bovinos receptores.

En uno de los experimentos realizado por Uilenberg (1970) a los tres días de infestar un ternero donante con larvas de *R. microplus* y tras realizar limpieza del suelo se colocó un bovino receptor para que convivieran. El bovino dador murió a los 10 días post infestación, momento en el que había ninfas presentes, y no se halló ningún espécimen de garrapata en el bovino receptor, lo que llevaría a pensar que no ocurrió migración de larvas, a diferencia de lo sugerido por Mason & Norval (1981). En otro

experimento similar Uilenberg (1970) encontró 10 hembras ingurgitadas en un bovino receptor que había convivido con un bovino dador de *R. microplus*. La diferencia en los resultados entre ambos experimentos pudo deberse a que no sucede migración de larvas, pero sí de ninfas o adultos, o bien a que en el primer experimento de Uilenberg (1970) la infestación del bovino dador se realizó con 90.000 larvas, mientras que la del segundo experimento fue considerablemente mayor, con 360.000 larvas.

Los resultados del presente trabajo sumados a los de Uilenberg (1970) y el hallazgo de teleoginas en un ternero de 5 días de vida reportado por Connell & Hall (1972) indicarían que es probable que las hembras de *R. microplus* también manifiesten un comportamiento migratorio. En general, tanto los trabajos dedicados a evaluar la migración de especímenes de garrapatas como aquellos dedicados a evaluar transmisión intraestadial de *A. marginale* por *Rhipicephalus* o *Dermacentor*, fueron diseñados bajo la premisa de que el comportamiento migratorio se encuentra limitado a los machos de garrapata (Connell & Hall, 1972; Leatch, 1973; Lysyk, 2013; Futse et al., 2003; Scoles et al., 2007; Stiller et al., 1989; Thompson & Roa, 1978). Sin embargo, en la búsqueda bibliográfica realizada para la confección de esta tesis no se encontraron antecedentes que excluyan a las hembras de garrapata, incluso a las ninfas, de este comportamiento migratorio.

Considerando que varios estudios no lograron demostrar la transmisión transovárica de *A. marginale* por *R. microplus*, la migración de garrapatas entre hospedadores adquiere especial relevancia en la epidemiología de este patógeno. Connell & Hall (1972) informaron que bovinos susceptibles y libres de garrapatas alojados con bovinos infectados con *A. marginale* e infestados con *R. microplus* terminaron infectándose con el patógeno e infestándose con la garrapata. Estos datos deben interpretarse con cautela respecto a detalles como la posible intervención de otros vectores mecánicos de *A. marginale* (dípteros hematófagos) y la sensibilidad de las pruebas utilizadas para asegurar la negatividad de los bovinos susceptibles al inicio de los experimentos. En condiciones experimentales, *R. microplus* es capaz de transmitir *A. marginale* con solo tres adultos infectados transestadialmente a partir de ninfas alimentadas en un ternero con 0,3% de rickettsemia (Aguirre et al., 1994). En el presente trabajo se demostró no sólo que la migración de adultos de *R. microplus* ocurre, sino también que la carga animal afecta a la tasa de infestación. Considerando la evidencia disponible sobre la capacidad vectorial de *R. microplus* para transmitir *A.*

*marginale*, la transmisión intraestadial parece ser la vía principal por la cual esta garrapata está involucrada en la epidemiología de la anaplasmosis.

**Parte II: Transmisión de *Anaplasma marginale* por *Amblyomma tonelliae***

## INTRODUCCIÓN

En Argentina existen al menos 9 especies de garrapatas que parasitan con frecuencia a los bovinos (Nava et al., 2017) pero cuatro de ellas, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Amblyomma neumanni*, *Amblyomma sculptum* y *Amblyomma tonelliae*, son relevantes para la producción ganadera no solo porque pueden generar altos niveles de infestación en los bovinos, sino también porque todos los estadios parasíticos se alimentan sobre este hospedador y, por ende, pueden ser potenciales transmisores de *A. marginale* (Guglielmone et al., 1990; Nava et al., 2006, 2017; Tarragona et al., 2015b).

En el caso de *R. microplus*, la transmisión intraestadial y transestadial de *A. marginale* han sido demostradas (Aguirre et al., 1994; Connell and Hall, 1972; Futse et al., 2003) y existen estudios sobre transmisión transovárica, los cuales fueron abordados en el Capítulo 1 de esta tesis. Además, diferentes autores han reportado que *A. marginale* es capaz de invadir y replicarse en células de *R. microplus* mediante propagación en cultivos *in vitro*, observación de tejidos de garrapatas por microscopía o análisis molecular (Ribeiro & Lima, 1996; Scoles et al., 2007; Esteves et al., 2009). En cambio, la información sobre el potencial rol transmisor de las garrapatas del género *Amblyomma* es escasa.

Las garrapatas del género *Amblyomma* evolucionaron en las regiones neotropicales del continente en ausencia del bovino como hospedador. Tras la colonización y el desplazamiento o extinción de la fauna, los bovinos se convirtieron en nuevos hospedadores para algunas garrapatas neotropicales como *A. neumanni*, *A. sculptum* y *A. tonelliae*, las cuales se adaptaron a este hospedador recientemente introducido en sus áreas de distribución (Guglielmone & Nava, 2013). Actualmente algunas especies de este género, además de parasitar a diferentes mamíferos silvestres, domésticos y al propio ser humano, son capaces de desarrollar todos sus estadios parasíticos sobre el bovino, incluso provocando infestaciones masivas en el mismo (Nava et al., 2006, 2017; Tarragona et al., 2015b) lo que las convierte en garrapatas con potencial para transmitir *A. marginale*.

Para el estudio de la transmisión de *A. marginale* por garrapatas de tres hospedadores, se seleccionó como modelo la especie *A. tonelliae*. Esta garrapata pertenece al complejo *Amblyomma cajennense* el cual se distribuye en zonas semiáridas de la región biogeográfica del Chaco en Argentina, Bolivia y Paraguay (Nava et al., 2014; Estrada-Peña et al., 2014; Tarragona et al., 2015b). *Amblyomma tonelliae* realiza

un ciclo anual, encontrándose especímenes de *A. tonelliae* en actividad durante todo el año. Desde principios de otoño hasta mediados de invierno se encuentran larvas, durante el invierno y la primavera ninfas, y durante todo el año se pueden encontrar adultos, los cuales alcanzan su mayor abundancia y actividad durante la primavera y el verano (Tarragona et al., 2015b).

Al igual que *A. neumanni* y *A. sculptum*, *A. tonelliae* realiza ciclos de tres hospedadores. Es decir, completan su fase parasítica sobre diferentes animales (que pueden ser o no de la misma especie) desprendiéndose para realizar la muda u oviposición al finalizar la alimentación de cada uno de los estadios (larva, ninfa y adulto). De este modo, todas las ninfas y adultos pueden acceder a diferentes bovinos lo que, de ser competentes para transmitir transestadialmente *A. marginale*, amplificaría la difusión de la anaplasmosis en un rodeo. En la etapa final del ciclo, las hembras adultas fecundadas se desprenden de su hospedador, y protegidas por la vegetación ponen huevos de los que nacerán las larvas que infestarán nuevos hospedadores para continuar el ciclo. Si dichas hembras estuviesen infectadas con *A. marginale*, la infección podría transmitirse a su progenie por vía transovárica.

La transmisión transestadial de *A. marginale*, una de las vías de transmisión mejor descritas, la garrapata ingiere eritrocitos infectados con *A. marginale*, el cual ingresa y se replica en las células intestinales de la misma para posteriormente infectar las glándulas salivales (Kocan et al., 2004). Cuando la garrapata se alimenta por segunda vez, *A. marginale* se replica en las células acinares de las glándulas salivales de la garrapata favoreciendo la transmisión al hospedador vertebrado mediante la inoculación de saliva (Kocan et al., 1993). La transmisión transestadial de *A. marginale* ha sido demostrada para las garrapatas *A. neumanni* (Gaido et al., 1995), *D. albipictus* (Boyton et al., 1936; Ewing et al., 1997), *D. andersoni* (Kocan et al., 1981; Wickwire et al., 1987), *D. variabilis* (Kocan et al., 1981; Smith 1986), *Ixodes scapularis* (Rees, 1934), *Rhipicephalus annulatus* (Samish et al., 1993), *Rhipicephalus bursa* (Brumpt, 1931), *R. microplus* (Aguirre et al., 1994; Thompson & Roa, 1978), *Rhipicephalus sanguineus* (Rees, 1934) y *R. simus* (Potgieter & Van Rensburg, 1982). Se ha afirmado que la transmisión transestadial de *A. marginale* ocurriría tanto a partir de animales con infección aguda como de portadores crónicos (Kocan et al, 1981). Es importante mencionar que, si bien algunas garrapatas pueden transmitir diferentes cepas de *A. marginale*, tal como lo demostró Samish et al., (1993) con tres cepas de *A. marginale*

morfológica y geográficamente distintas, no todas parecen ser transmisibles por garrapatas (Wickwire et al., 1987; Scoles et al., 2006; Smith et al., 1986).

Con respecto a la transmisión de *A. marginale* por garrapatas del género *Amblyomma*, existen cuatro estudios. Anthony & Roby (1966) y Rees (1934) evaluaron transmisión transestadial de *A. marginale* en *A. americanum*, con resultados negativos, al igual que en *A. mixtum* (nombrada como *A. cajennense*) y *A. maculatum* (Rees, 1934); mientras que Gaido et al., (1995) demostró la ocurrencia de transmisión transestadial de *A. marginale* por *A. neumanni*. Sólo existen dos estudios donde se evaluó transmisión transovárica de *A. marginale*, Anthony & Roby (1966) con resultados negativos para *A. americanum* y Rees (1934) con resultados también negativos para las especies *A. americanum*, *A. mixtum* (nombrada como *A. cajennense*) y *A. maculatum*. Sanborn & Moe, también en el año 1934 reportaron ausencia de transmisión con las garrapatas *A. americanum* y *A. mixtum*, aunque se desconoce cuáles fueron las vías de transmisión que evaluaron.

El objetivo de este trabajo fue determinar la competencia vectorial de *A. tonelliae* para transmitir *A. marginale* transováricamente y transestadialmente. Se seleccionó la especie *A. tonelliae* como modelo de garrapata de tres hospedadores dado que es una de las garrapatas con mayor número de registros de infestación en bovinos en Argentina, y tanto larvas como ninfas y adultos son capaces de parasitar al bovino.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Competencia vectorial**

Para evaluar competencia vectorial de *A. tonelliae* para transmitir transestadialmente y transováricamente *A. marginale* se adoptaron los criterios de Barker y Reisen (2019) que consisten en i) alimentar el potencial artrópodo vector en un hospedador vertebrado infectado por *A. marginale*; ii) otorgarle condiciones para la muda y la oviposición; iii) alimentar los estadios obtenidos tras la muda (ninfas y adultos) y la oviposición (larvas) en un hospedador vertebrado no infectado y susceptible; iv) examinar al hospedador vertebrado para determinar si adquirió la infección.

#### **1.1. Bovinos**

Para la infección experimental de las garrapatas se utilizó un ternero de raza Holstein de 7 meses de edad, caravana 275, proveniente de un establecimiento de la provincia de Santa Fe libre de anaplasmosis bovina. Para la alimentación de los estadios obtenidos tras la muda y oviposición, se esplenectomizaron seis terneros de raza Holstein de 3 meses de edad, caravanas 1057, 6712, 6713, 6714, 6716 y B825 provenientes de la EEA INTA Rafaela, libre de anaplasmosis bovina. Se confirmó la negatividad de los terneros a *A. marginale* y *A. centrale* mediante dpELISA (Sarli et al., 2019) y PCR (Molad et al., 2006).

Los procedimientos realizados sobre los animales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE-CERSAN Protocolo Número 18-005) y el Comité Asesor de Ética y Seguridad (FCV-UNL Protocolo Número 443/18).

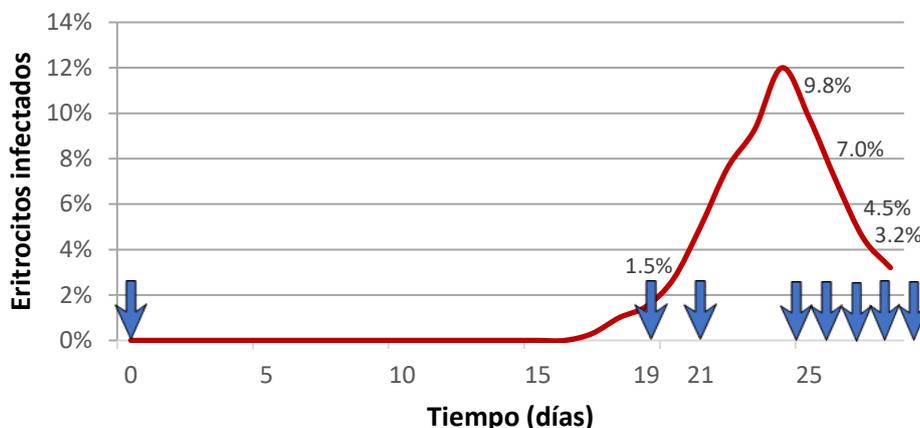
## 1.2. Garrapatas

Las garrapatas utilizadas provenían de una colonia de *A. tonelliae* originaria de la provincia de Salta y mantenida en el Laboratorio de Inmunología y Parasitología de la EEA INTA Rafaela.

## 1.3. Procedimiento experimental

Se inoculó al ternero 275 con la cepa S1P de *A. marginale* aislada de la provincia de Salta, Argentina, criopreservada en nitrógeno líquido (de Ríos et al., 1988) mediante inyección subcutánea de 1 ml de dosis infectante constituida por  $1 \times 10^8$  eritrocitos infectados diluidos en solución isotónica PBS. El mismo día de inoculación (día 0) se registraron los parámetros de temperatura rectal y hematocrito del ternero 275. A partir del día 13 post inoculación se monitoreó diariamente la reacción clínica del ternero inoculado mediante índice de hematocrito y temperatura rectal. Además, se tomó diariamente una muestra de sangre yugular para caracterizar la dinámica de la infección con *A. marginale* mediante la observación y registro del porcentaje de eritrocitos infectados (rickettsemia) en extendido sanguíneo, PCR y serología para confirmar infección. Se detectó ADN de *A. marginale* y anticuerpos contra *Anaplasma* a partir del día 13 post inoculación. La rickettsemia se hizo patente a partir del día 17 con 0,3% de los eritrocitos infectados. El día 19 post inoculación, cuando la rickettsemia alcanzaba el 1,5%, se infestó el ternero con 60 parejas de adultos de *A. tonelliae*; y el día 21 post inoculación, cuando la rickettsemia alcanzaba el 5%, se

infestó el ternero con aproximadamente 9000 larvas y 600 ninfas. Para la infestación se realizó tricotomía e higiene de la piel con alcohol, y luego se pegaron las cápsulas contenedoras de garrapatas.



**Figura 8.** Niveles de rickettsemia (eritrocitos infectados) en ternero 275 infectado con la cepa SIP de *Anaplasma marginale* e infestado con *Amblyomma tonelliae*. Flechas azules indican los momentos de inoculación experimental con *A. marginale* (día 0), infestación con adultos de *A. tonelliae* (día 19), infestación con larvas y ninfas de *A. tonelliae* (día 21) y recolección de larvas, ninfas y adultos de *A. tonelliae* (días 25, 26, 27, 28 y 29).

Finalizado el periodo de alimentación, se recolectaron larvas y ninfas ingurgitadas los días 25, 26 y 27 post inoculación, con valores de rickettsemia del 9,8%, 7% y 4,5% respectivamente; y adultos ingurgitados los días 27, 28 y 29 post inoculación con valores de rickettsemia de 4,5%, 3,2% y 2,4% respectivamente (Figura 8).

Los procedimientos que se describen a continuación se encuentran resumidos de manera esquemática en la Figura 9. Una alícuota de garrapatas ingurgitadas alimentadas en el ternero 275 fue analizada por PCR para verificar la ingestión de *A. marginale*. Se analizaron 11 *pools* de 100 larvas y 11 ninfas el mismo día de recolección, y 11 adultos al finalizar la oviposición (22-24 días post recolección). El resto de los ejemplares fue llevado a incubadora para permitir los procesos de muda y oviposición. Las condiciones de incubación fueron a temperatura de 25° C, 85% de humedad relativa y fotoperiodo de 12h luz-12h oscuridad.

Transcurrida la incubación, una alícuota larvas, ninfas y adultos obtenidos tras los procesos de muda y oviposición fueron analizados por PCR para evaluar la presencia de *A. marginale*. Se analizaron molecularmente 40 *pools* de 2 ninfas cada uno,

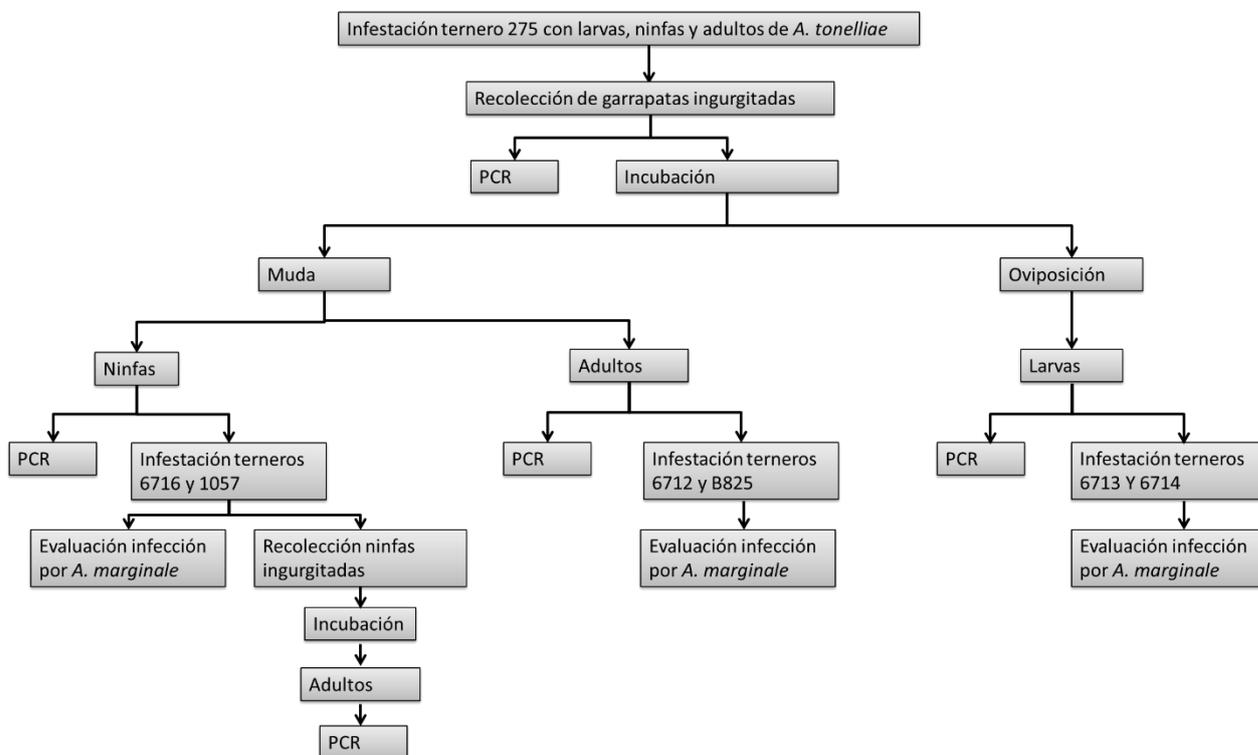
40 glándulas salivales de adultos, y 22 *pools* de 100 larvas cada uno. En esta etapa del experimento, para las muestras procesadas como *pools* se calculó la tasa mínima de infección, entendida como número de *pools* positivos/total de especímenes x 100 (Barker y Reisen, 2019).

El resto de las ninfas, adultos y larvas obtenidos se alimentaron sobre los terneros susceptibles esplenectomizados. Se infestaron dos terneros (caravanas 6716 y 1057) con 450 ninfas de *A. tonelliae* cada uno, dos terneros (caravanas 6712 y B825) con 35 parejas de adultos cada uno y dos terneros (caravanas 6713 y 6714) con aproximadamente 3000 larvas cada uno. Transcurrida la alimentación, las garrapatas ingurgitadas fueron recolectadas y los terneros susceptibles fueron monitoreados mediante registro de la temperatura rectal, índice de hematocrito, observación de extendidos sanguíneos, PCR y serología a partir de sangre yugular para evaluar infección con *A. marginale* en los días 0, 12, 19, 26, 33, 40, 48, 55, 62, 69, 74, 83, 90 y 97 post infestación en el caso de los terneros infestados con ninfas y adultos; y los días post infestación 14, 21, 29, 36, 43, 50, 56, 64, 71, 78, 85, 92 y 99 en el caso de los terneros infestados con larvas.

Una alícuota de ninfas ingurgitadas del ternero 1057 fue llevada a estufa para realizar la muda, con el objetivo de evaluar persistencia de infección de *A. marginale* de larva a adulto mediante análisis molecular. Transcurrida la muda, se analizaron por PCR glándulas salivales de 23 adultos mudados.

La totalidad del ensayo se realizó en la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Rafaela, Santa Fe, en boxes de aislamiento para evitar la transmisión por otros vectores que pudieran interferir en los resultados del experimento, así como la fuga de garrapatas al ambiente. Las medidas de aislamiento con que contaban los boxes eran: tela mosquitera doble en ventanas, única puerta exterior, habitación intermedia separada del interior de los boxes por puerta mosquitera y cortina de aire, lámpara UV para captura de insectos voladores en zona intermedia (1) y en corrales (2). El perímetro del edificio se encontraba rodeado por un metro de grava. Se limitó la entrada al corral a los dos veterinarios encargados del ensayo, que como medida complementaria utilizaron mamelucos descartables y botas. Se implementó pediluvio con cipermetrina 20% en zona intermedia. El ternero infectado experimentalmente con *A. marginale*, una vez finalizada la recolección de las garrapatas (día 29 post inoculación) fue tratado con una formulación pour on de flumetrina al 1% (BAYTICOL®; Bayer SA, Argentina) Bayticol pour-on (flumetrina) y una dosis intramuscular de 20 mg/kpv de oxitetraciclina

larga acción (TERRAMICINA LA®; Zoetis, Argentina). Posteriormente se realizó eutanasia según protocolo N° 002 del CICUAE-CERSAN del INTA.



**Figura 9.** Representación esquemática de la evaluación de la transmisión transestadial y transovárica de *Anaplasma marginale* por *Amblyomma tonelliae*.

#### 1.4. Purificación de ADN

Para la purificación de ADN a partir de muestras de sangre, se realizó lisis de 800 µL de muestra con buffer lisis de eritrocitos (0,14 M NH<sub>4</sub>Cl, 0,17 M Tris-HCl). La hemoglobina se eliminó mediante lavados con agua destilada. Se añadieron 400 µL de solución tamponada de proteinasa K para la digestión proteolítica. La mezcla se incubó a 58 °C durante 8 h. El ADN se extrajo con fenol / cloroformo / alcohol isoamílico, se precipitó con alcohol isopropílico y se lavó con etanol al 75%. Luego de la centrifugación, se dejó secar el sedimento y se re-suspendió en agua ultra-pura estéril (Invitrogen). Esta suspensión se almacenó a -20 °C hasta su uso.

La obtención de ADN de las garrapatas adultas recién mudadas se realizó a partir de glándulas salivales, obtenidas por disección según la metodología descrita en Mastropaolo (2014). En el caso de adultos ingurgitados, *pools* de larvas y ninfas, se lavaron con hipoclorito de sodio al 10% durante 15 minutos y se enjuagaron con agua

destilada. Posteriormente se rompieron con tijeras en tubos de 1,5 mL. Los procedimientos de lisis, extracción y precipitación fueron los mismos que los descritos para muestras de sangre.

### 1.5. Análisis molecular

Las muestras de ADN de sangre se analizaron individualmente mediante una PCR anidada altamente sensible, capaz de detectar hasta 50 eritrocitos infectados con *A. marginale* por mililitro de sangre (Molad et al., 2006). Los cebadores externos utilizados fueron AM456/AM1164 y los cebadores internos AM100/AM101 los cuales amplifican un fragmento 246 pares de bases (pb) del gen *msp1b* específico de *A. marginale*. Cada ciclo de PCR incluyó un control negativo (agua) y un control positivo (ADN de *A. marginale*). Los amplicones obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio (Promega).

Las muestras de ADN de garrapatas se examinaron para detectar infección por *Anaplasma* mediante PCR en tiempo real utilizando los cebadores AE2-Fw/AE-Rv, los cuales fueron diseñados para amplificar un fragmento de 177 pb del gen *16S rRNA* de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* (Monje et al., 2019). Como control negativo de PCR se utilizó agua y como control positivo de PCR se utilizó ADN de *Anaplasma centrale*. Las muestras positivas se analizaron mediante la PCR anidada anteriormente descrita para amplificación del gen *msp1b* específico de *A. marginale* (Molad et al., 2006).

## 2. Garrapatas de vegetación

Con el objetivo de determinar la presencia de *A. marginale* en especímenes de *A. tonelliae* sin alimentar, lo cual implicaría la existencia de transmisión, se recolectaron larvas, ninfas y adultos de vida libre en sitios con presencia de bovinos portadores de *A. marginale*. Se utilizó la técnica de *dragging*, la cual consiste en arrastrar un paño de tela blanca de 1,0 × 1,5 m por la vegetación. Los puntos y momentos de muestreo se definieron según la información consignada en Tarragona et al., (2015b) sobre distribución de la garrapata *A. tonelliae* y reportes de presencia de bovinos con anaplasmosis bovina. Los adultos y ninfas recolectados se procesaron individualmente, mientras que para el procesamiento de las larvas se conformaron *pools* de 50 larvas, excepto en un caso donde se conformó un *pool* de 20 larvas dado que fue el número máximo de larvas recolectadas en el sitio. La purificación de ADN se realizó tal lo descrito anteriormente para muestras de garrapatas del ensayo de competencia

vectorial. Las muestras de ADN se examinaron para detectar infección por *Anaplasma* mediante PCR en tiempo real utilizando los cebadores AE2-Fw/AERv los cuales fueron diseñados para amplificar un fragmento de 177 pb del gen *16S rRNA* de la familia Anaplasmataceae (Monje et al., 2019). Las muestras positivas a la PCR en tiempo real se analizaron a su vez mediante diferentes PCRs. En primer lugar, las muestras positivas se analizaron mediante una PCR que amplifica un fragmento de 360 pb del gen *16S rRNA* de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* utilizando los cebadores GE2'F2'/HE3 (Aguiar et al., 2008). Las muestras que resultaron positivas a esta PCR se analizaron a su vez utilizando dos ensayos de PCR descritos previamente por Weisburg et al., (1991) y Parola et al., (2000) que amplifican el gen *16S rRNA* casi completo. Los pares de cebadores utilizados fueron fD1/Ehr16SR y Rp2/Ehr16SD. En las PCRs mencionadas se utilizó ADN de *Anaplasma centrale*. y *Ehrlichia canis* como controles positivos y agua ultrapura como control negativo. Tras la purificación de los amplicones de PCR (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) las muestras se enviaron a la Unidad de Genómica del INTA Castelar para su secuenciación. Las secuencias parciales obtenidas se editaron utilizando BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) con edición manual cuando fue necesario y se unieron para lograr la secuencia casi completa de *16S rRNA*. Las secuencias se compararon con aquellas disponibles en el GenBank por medio de BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las muestras positivas se analizaron mediante PCR anidada para amplificar un fragmento del gen *msp1b* específico de *A. marginale* según Molad et al., (2006).

## RESULTADOS

### 1. Competencia vectorial

Los periodos de alimentación fueron de 4 a 6 días en larvas y ninfas, y 7 a 9 días en adultos. El período de muda de larvas a ninfas fue de 15 a 17 días y de ninfas a adultos fue de 23 a 24 días. Los periodos de pre-oviposición, oviposición e incubación tuvieron en conjunto una duración de 52 a 54 días. Tanto larvas como ninfas y adultos no fueron capaces de transmitir la infección a los terneros susceptibles esplenectomizados 6713, 6714, 1057, 6716, 6712 y B825. Durante el monitoreo de los terneros susceptibles no se detectó *A. marginale* mediante PCR ni observación directa; tampoco se detectó aumento de la temperatura rectal, anemia o síntomas clínicos de anaplasmosis. Los niveles de anticuerpos en terneros susceptibles permanecieron

durante todo el experimento por debajo del punto de corte de la prueba, considerándose negativos.

Los resultados del análisis molecular se encuentran presentados en la Tabla 6. Se detectó ADN de *A. marginale* en todos los estadios alimentados en el ternero 275, lo que confirmó la ingestión del microorganismo por parte de las garrapatas. Del total de ninfas obtenidas tras la muda, 1 *pool* resultó positivo a la amplificación del gen *msp1b* específico de *A. marginale*, con lo cual la tasa mínima de infección fue del 1,25% (1 *pool* positivo / 80 ninfas). Para descartar la posibilidad de contaminación con ADN del control positivo utilizado en la PCR en tiempo real, se realizó además PCR anidada para amplificar un fragmento de 252 pb del gen *msp2* específico de *Anaplasma centrale* según Molad et al., (2006) (cebadores AC1826/AC2367 y CIS1925/CIS2157) la cual resultó negativa. La totalidad de adultos obtenidos post muda y larvas obtenidas post oviposición resultaron negativos. No se detectó ADN de *A. marginale* en los adultos alimentados como larvas en el ternero 275 para evaluación de persistencia.

**Tabla 6.** Resultados de PCR en tiempo real del gen *16S rRNA* y PCR anidada del gen *msp1b* en muestras de larvas, ninfas y adultos de *Amblyomma tonelliae* involucradas en los ensayos de transmisión transestadial y transovárica de la cepa S1P de *Anaplasma marginale*.

Estadio	Muestras positivas a PCR en tiempo real gen <i>16S rRNA</i>	Muestras positivas a PCR anidada gen <i>msp1b</i>
Larvas <sup>1</sup>	11/11*	11/11
NL	1/40*	1/1
AL	0/23	-
Ninfas <sup>1</sup>	10/11	10/10
AN	0/40	-
Adultos <sup>1</sup>	3/11	2/3
LPO	0/22*	-

<sup>1</sup>Estadios alimentados en ternero infectado con *A. marginale*; NL, ninfas mudadas a partir de larvas alimentadas en ternero infectado con *A. marginale*; AL, adultos mudados a partir de larvas alimentadas en ternero infectado con *A. marginale*; AN, adultos mudados a partir de ninfas alimentadas en ternero infectado; LPO, larvas post oviposición de adultos alimentados en ternero infectado con *A. marginale*; \**pools* de 2 (ninfas) y 100 (larvas).

## 2. Garrapatas de vegetación

Se recolectaron de vegetación un total de 109 adultos, 67 ninfas y 1070 larvas de *A. tonelliae*. Un total de 3/67 ninfas resultaron positivas para la amplificación del

fragmento de 177 pb del gen *16S rRNA* en la PCR de tiempo real (Tabla 7). Los valores de Ct fueron entre 35 y 37. Las muestras positivas fueron analizadas mediante la PCR convencional de Aguiar et al., (2008) y las dos PCRs que amplifican el gen *16S rRNA* casi completo (Weisburg et al., 1991; Parola et al., 2000). Las tres secuencias amplificadas correspondieron a bacterias del suelo. Estas tres muestras positivas a la PCR en tiempo real fueron analizadas mediante PCR anidada para amplificar un fragmento específico del gen *msp1b* de *A. marginale*, con resultados negativos (Tabla 7).

**Tabla 7.** Resultados de análisis molecular de larvas, ninfas y adultos de *A. tonelliae* recolectadas de vegetación analizadas con PCR en tiempo real para amplificación del gen *16S rRNA*, y PCR anidada para amplificación del gen *msp1b* de *A. marginale*.

Sitio (Provincia)	Coordenadas geográficas	Estadio	Mes de recolección	Muestras positivas PCR tiempo real <i>16S rRNA</i>	Muestras positivas PCR anidada gen <i>msp1b</i>
Río Bermejito (Chaco)	S25°3'/O61°8'	Adultos	Enero	0/10	-
Norte Pompeya (Chaco)	S24°30'/O61°16'	Adultos	Enero	0/7	-
Parque Fuerte Esperanza (Chaco)	S25°11'/O61°53'	Adultos	Enero	0/1	-
José Dean (Chaco)	S25°20'/O61°25'	Adultos	Enero	0/13	-
El Albay-PN Copo (Santiago del Estero)	S25°34'/O61°25'	Adultos	Enero	0/66	-
Frente a El Albay (Chaco)	S25°34'/O61°25'	Adultos	Enero	0/12	-
José Dean (Chaco)	S25°20'/O61°25'	Ninfas	Julio	0/10	-
El Albay-PN Copo (Santiago del Estero)	S25°34'/O61°25'	Ninfas	Julio	3/38	0/3
Frente a El Albay (Chaco)	S25°34'/O61°25'	Ninfas	Julio	0/19	-
El Albay-PN Copo (Santiago del Estero)	S25°34'/O61°25'	Larvas	Junio	0/1*	-

Sitio (Provincia)	Coordenadas geográficas	Estadio	Mes de recolección	Muestras positivas PCR tiempo real <i>16S rRNA</i>	Muestras positivas PCR anidada gen <i>msp1b</i>
PN Copo-Ingreso Sur (Santiago del Estero)	S25°58'/O61°57'	Larvas	Junio	0/5**	-
Parque Fuerte Esperanza-Sitio 2 (Chaco)	S25°2'/O61°43'	Larvas	Junio	0/16**	-

\*pool de 20 larvas. \*\*pools de 50 larvas.

## DISCUSIÓN

La competencia vectorial de algunas especies de garrapatas Ixodidae para transmitir transestadialmente *A. marginale* ha sido demostrada. En el caso de la transmisión por *R. microplus*, la infestación con sólo tres adultos mudados a partir de ninfas alimentadas en un ternero infectado con esta cepa, fueron capaces de transmitir la infección a un ternero susceptible (Aguirre et al., 1994). En dicho estudio, los niveles de rickettsemia en los terneros infectados el día de recolección de las ninfas fueron de 0,3% y 1%, mientras que las ninfas alimentadas en un ternero con rickettsemia < 0,01 % no lograron transmitir. Al igual que Aguirre et al., (1994) otros autores han concluido que niveles altos de circulación de *A. marginale* en sangre favorecerían la transmisión por garrapatas. Kocan et al., (1983a) reportó que en la transmisión a partir de animales que cursaban anaplasmosis aguda, el periodo prepatente era menor respecto a la transmisión a partir de animales con anaplasmosis crónica sin rickettsemia detectable. Sin embargo, en el presente trabajo, con niveles de rickettsemia de entre 4,5 % y 9,8% al momento de recolección de larvas y ninfas, la transmisión transestadial a los terneros susceptibles no ocurrió.

Según Futse et al., (2003) para la transmisión no sólo es crítica la habilidad de la garrapata para adquirir la infección, sino también la habilidad del patógeno para replicarse en sus glándulas salivales. En estudios de infección de garrapatas, se ha demostrado que la eficiencia para transmitir el patógeno depende de su alimentación en el hospedador vertebrado (Futse et al., 2003; Kocan et al., 1983a). Potgieter & Van

Rensburg (1982) evaluaron eficiencia de la transmisión transestadial de *A. marginale* por *R. simus* inoculando macerados de especímenes adultos recién mudados en distintas condiciones: sin alimentar, con una alimentación previa de 72 h en un bovino, o incubados a 37 °C por 96 h (lo que emularía una pre alimentación). Observaron que todos los macerados eran infectantes, pero los macerados de adultos sin alimentar presentaban un período prepatente más largo respecto a aquellos pre alimentados o incubados a 37°. Resultados similares obtuvieron Kocan et al. (1981) con adultos de *Dermacentor* spp. infectados transestadialmente a partir de ninfas. Es decir que, si la garrapata se infectó transestadialmente, la multiplicación del patógeno en las glándulas salivales del nuevo estadio se hará efectiva cuando éste comience a alimentarse (Kocan et al., 2008) aumentando la eficiencia de la transmisión. En el presente trabajo al evaluar la transmisión transestadial de larva a ninfa, uno de los *pools* de ninfas resultó positivo por PCR a *A. marginale*. Al utilizar el concepto de tasa mínima de infección, que en este caso resultó del 1,25%, se asume que al menos una de las dos ninfas del *pool* positivo estaría infectada con *A. marginale*. Este hallazgo sugiere que es probable que *A. marginale* sea capaz de invadir y replicarse en los tejidos de *A. tonelliae*; lo cual debería comprobarse mediante la observación de colonias del patógeno por microscopía electrónica, inmunohistoquímica o citología. Aunque se interpretara este hallazgo bajo la premisa de Futse et al., (2003) de que la transmisión existe, pero no es eficiente porque la garrapata necesita alimentarse para que el patógeno se replique en su interior, es evidente que la probabilidad de transmisión en este caso es ínfima. En primer lugar, porque una tasa mínima de infección del 1,25% de ninfas es un porcentaje bajo siendo que provenían de una población donde el 100% de los *pools* de larvas resultó positivo. En segundo lugar, porque los elevados niveles de rickettsemia con que se infectaron las larvas solamente se encuentra en animales que cursan enfermedad aguda, cuando para zonas endémicas de anaplasmosis la mayor parte de los animales poseen niveles de rickettsemia menores al 0,02% (Aguirre et al., 1988). Y, finalmente, porque la infección no se transmitió a los terneros susceptibles.

Al igual que lo discutido en el capítulo anterior para la transmisión por *R. microplus*, la diferencia en la transmisibilidad de cepas de *A. marginale* es un aspecto a considerar. Smith et al. (1986) compararon la capacidad de *D. variabilis* para transmitir transestadialmente dos cepas de *A. marginale* logrando transmisión con una de ellas (cepa Virginia) mientras que la cepa Illinois no se transmitió luego de varios intentos. La transmisión transestadial de ninfas a adultos de la cepa SIP de *A. marginale* ha sido

demostrada para las garrapatas *R. microplus* y *A. neumanni* (Aguirre et al., 1994; Gaido et al., 1995). En el caso de Gaido et al. (1995) la discrepancia en los resultados con el presente trabajo podría deberse a que se trataba de una garrapata del mismo género, pero diferente especie, aunque también es importante considerar la elección de los terneros susceptibles. Para asegurar que los terneros susceptibles no estaban infectados con *A. marginale* al inicio del desafío, los autores utilizaron la técnica de aglutinación en placa para detectar anticuerpos contra *Anaplasma*, y la observación de extendido sanguíneo para identificar la rickettsia en sangre. Actualmente existen técnicas diagnósticas con mayor sensibilidad analítica. La PCR utilizada en el presente trabajo (Molad et al., 2006) es capaz de detectar niveles de infección con *A. marginale* en sangre de 50 eritrocitos infectados por ml, lo cual es más sensible que el extendido sanguíneo, cuya sensibilidad para detectar *A. marginale* recién se manifiesta a partir de  $10^6$  eritrocitos infectados por ml de sangre (Torioni et al., 1998). Es importante considerar además que en el trabajo de Gaido et al. (1995) los terneros susceptibles provenían de zona endémica de anaplasmosis, circunstancia que no se considera ideal en un experimento donde la elección de animales negativos debe ser rigurosa.

Los resultados negativos de transmisión transovárica de *A. marginale* por la garrapata *A. tonelliae* obtenidos en este trabajo coinciden con estudios realizados con *R. microplus* donde a pesar de haberse alimentado sobre bovinos con altos niveles de rickettsemia, no ocurrió transmisión transovárica (Esteves et al., 2015; Ruiz et al., 2005). En el presente trabajo las hembras fueron recolectadas cuando el ternero 275 presentaba entre 2,4 - 4,5% de eritrocitos infectados. Para corroborar que las hembras habían efectivamente ingerido el patógeno, 11 hembras fueron analizadas por PCR al final de la oviposición (22-24 días post recolección) detectándose ADN de *A. marginale* en un 18% de ellas. Es probable que esta diferencia en el porcentaje de garrapatas positivas, que en el caso de larvas y ninfas alcanzaron casi el 100%, se deba a una degradación del ADN de *A. marginale* debido al tiempo transcurrido entre la recolección de las garrapatas y su procesamiento para la extracción de ADN. Sin embargo, se consideró que estos resultados eran suficientes para confirmar que las hembras habían ingerido el patógeno.

Respecto al análisis de garrapatas de vida libre, es importante considerar que en ciertos patógenos las prevalencias de infección son muy bajas a pesar de la ocurrencia de transmisión. Por ejemplo, se estima que la prevalencia de infección de *R. rickettsii* en estadios de vida libre de *A. cajennense* es de alrededor del 1% (Guedes et al., 2005).

Tarragona et al., (2015a) evaluó 68 especímenes de vida libre de *A. tonelliae* para detectar *Rickettsia*, con resultados negativos a pesar de haber demostrado que esta garrapata es capaz de transmitir el patógeno. Si se quisiera estimar un n muestral suficiente como para detectar una prevalencia de, por ejemplo, el 1%; sería necesario contar con información de la población total de garrapatas, un valor prácticamente imposible de estimar en poblaciones naturales de artrópodos. En este trabajo se analizaron en total 109 adultos, 67 ninfas y 1070 larvas de *A. tonelliae* de vida libre. A pesar de las limitaciones del muestreo, que depende de variables difíciles de estimar como la prevalencia de infección y la población de garrapatas, en el presente trabajo la ausencia de infección con *A. marginale* en especímenes recolectados de vegetación refuerza los resultados del estudio experimental, donde se demostró que *A. tonelliae* no es capaz de transmitir *A. marginale*.

En conclusión, los resultados indican que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, *A. tonelliae* no posee competencia vectorial para transmitir transestadialmente ni transováricamente la cepa S1P de *A. marginale*. Los resultados coinciden con información preliminar obtenida por integrantes del grupo de trabajo de la EEA INTA Rafaela que evaluaron transmisión transestadial y transovárica de *A. marginale* por *A. tonelliae* y *A. sculptum* a partir de terneros inoculados experimentalmente con la cepa M1 de *A. marginale* y naturalmente con cepas de campo (Mazzucco Panizza et al., 2022). Tanto la transmisión a terneros susceptibles como el análisis por PCR de glándulas salivales de 100 adultos mudados y de larvas progenie de hembras alimentadas como ninfas en el ternero infectado, resultaron negativos. Los resultados del presente trabajo se encuentran además en concordancia con tres de los cuatro únicos antecedentes existentes sobre transmisión de *A. marginale* por garrapatas del género *Amblyomma* (Anthony & Roby, 1966; Rees, 1934; Sanborn & Moe, 1934).

La metodología y los resultados de este trabajo sientan antecedentes para futuros estudios sobre el rol de las garrapatas de tres hospedadores en la epidemiología de la anaplasmosis bovina, tales como *A. sculptum* y *A. neumanii*.

## Discusión general y conclusiones

*Anaplasma marginale* es una rickettsia transmitida biológicamente por garrapatas. Es decir que es capaz de invadir y replicarse en tejidos del artrópodo, para luego ser transmitida a un hospedador vertebrado. El ciclo de *A. marginale* en garrapatas ha podido ser estudiado gracias a la observación microscópica (con microscopio óptico y electrónico e inmunohistoquímica como técnica complementaria), cultivos *in vitro* de células de garrapatas y diagnóstico molecular. Así, la presencia de colonias de *A. marginale* en intestino y glándulas salivales de garrapatas ha sido demostrada para *D. andersoni* (Futse et al., 2003; Kocan et al., 1980; Scoles et al., 2007), *D. variabilis* (Smith 1986), *R. annulatus* (Scoles et al., 2007), *R. microplus* (dos Santos et al., 2019; Esteves et al., 2009; Ribeiro & Lima, 1996; Scoles et al., 2007), *R. simus* (Potgieter, 1981) y, además, se ha demostrado fehacientemente que estas especies poseen competencia vectorial para transmitir transestadialmente, intraestadialmente y en algunos casos transováricamente a esta rickettsia a un hospedador vertebrado (Aguirre et al., 1994; Futse et al., 2003; Kocan et al., 1981, 2004; Kuttler, 1971; Potgieter, 1981; Samish et al., 1993; Scoles et al., 2006, 2007; Wickwire, 1987). Pero la correlación entre capacidad de infectar tejidos o células de la garrapata y competencia vectorial no es igual para todas las garrapatas presuntamente involucradas en la transmisión de *A. marginale* y para los distintos tipos de transmisión.

En el Capítulo 1 de esta tesis se abarcaron estudios relacionados a la transmisión de *A. marginale* por *R. microplus*. En primer lugar, se evaluó la transmisión transovárica, forma de transmisión que, de suceder, tendría mayor relevancia en la epidemiología de la anaplasmosis bovina. Para ello, se realizó un ensayo de competencia vectorial bajo estrictas condiciones de aislamiento para evitar el ingreso de dípteros hematófagos, y se utilizaron bovinos susceptibles provenientes de establecimientos y zonas libres de anaplasmosis, los cuales además fueron analizados mediante técnicas serológicas y moleculares para asegurar su negatividad a *Anaplasma* antes de comenzar el ensayo. Estos animales, además, fueron esplenectomizados para aumentar su susceptibilidad al patógeno y favorecer su potencial multiplicación. Al finalizar el ensayo, las larvas nacidas a partir de hembras alimentadas en un ternero infectado con la cepa S1P de *A. marginale* no fueron capaces de transmitir el patógeno a los terneros susceptibles, y no se detectó ADN de *A. marginale* en las mismas. Tampoco

resultaron infectadas aquellas larvas nacidas de garrapatas alimentadas en terneros de zona endémica de anaplasmosis, previamente infectados con otras cepas de *A. marginale* además de la cepa S1P. Factores como la rickettsemia, el momento en que se infectó la garrapata y la temperatura del ambiente pueden influenciar en la eficiencia de la transmisión, estos factores fueron discutidos en el Capítulo 1. La evidencia presentada en esta tesis sumada a la de trabajos anteriores sugiere fuertemente que *A. marginale* no se transmite transováricamente por *R. microplus*. Si se amplía la discusión hacia otras especies de garrapatas involucradas como vectores de *A. marginale*, la transmisión transovárica tampoco pudo ser demostrada en *D. andersoni*, *D. variabilis*, *Hyalomma rufipes*, *Rhipicephalus decoloratus*, *Rhipicephalus simus* (Anthony & Roby 1966; Kocan et al., 1981; Potgieter, 1979; Stich, 1989). Los únicos trabajos que reportan transmisión transovárica además de los citados para *R. microplus*, son Howell (1941) para *D. andersoni* y Kuttler (1971) para *R. annulatus*. Incluso algunos autores dan por sentado que, en líneas generales, *A. marginale* no se transmite transováricamente (Brayton, 2012; Kocan et al., 2008).

Dado que la zona endémica de anaplasmosis coincide en gran parte con la zona endémica de *R. microplus*, es inevitable pensar que esta especie de garrapata cumpla un rol en la transmisión de *A. marginale*, y sería apresurado descartarla como potencial vector, lo cual conduce a discutir sobre otras formas de transmisión: la transmisión intraestadial y transestadial de *A. marginale*. Si bien estas formas de transmisión efectivamente suceden en *R. microplus* (Aguirre et al., 1994; Connell & Hall, 1972; Futse et al., 2003; Leatch, 1973; Thompson & Roa, 1978) existen otros aspectos (ecológicos y conductuales) además de la competencia vectorial que influyen en la capacidad de un artrópodo para transmitir un patógeno determinado (Parola, 1993). Cabe recordar que *R. microplus* realiza su ciclo parasitario por completo sobre el mismo hospedador; sin embargo, los reportes de migración de especímenes de *R. microplus* entre bovinos invitan a pensar en la posible participación de *R. microplus* en la diseminación de la anaplasmosis, prescindiendo de la transmisión transovárica. Tanto Uilenberg (1970) como Connell & Hall (1972) tras demostrar luego de 25 y 6 intentos respectivamente que la transmisión transovárica no ocurría, concluyeron que era más probable que *A. marginale* se transmitiera mediante la transferencia de garrapatas de un animal a otro durante una alimentación interrumpida o un tiempo después de la muda. El ensayo realizado en esta tesis para evaluar la migración de *R. microplus* entre bovinos demostró que las garrapatas adultas migran de un bovino a otro y que la

magnitud de ese movimiento depende de la carga animal de modo que, a mayor carga animal, más rápido se infestan los animales con garrapatas “migrantes”. Incluso en este ensayo puede especularse que, en el grupo de menor carga animal, tarde o temprano la totalidad de los animales terminaría infestada con especímenes “migrantes” de *R. microplus*. Estos resultados son relevantes si se considera que tres adultos infectados transestadialmente a partir de ninfas pueden transmitir la infección a un bovino susceptible (Aguirre et al., 1994). Algunos autores (Connell & Hall, 1972; Leatch, 1973; Thompson & Roa, 1978) demostraron transmisión intraestadial de *A. marginale* transfiriendo de manera casi inmediata adultos de *R. microplus* entre animales, por lo que no se descarta una transmisión mecánica en estos casos. Sin embargo, Futse et al. (2003) y Scoles et al. (2007) demostraron transmisión intraestadial transfiriendo machos de *R. microplus* luego de 2 a 3 días de haberse alimentado en un ternero infectado con *A. marginale*. Estos últimos autores detectaron, además, colonias de *A. marginale* en glándulas salivales de estas garrapatas, y un aumento significativo en el número de copias de ADN de *A. marginale* entre la primera y segunda alimentación de las mismas, concluyendo que el patógeno lograba replicarse en las glándulas salivales. Futse et al., (2003) también demostró la transmisión intraestadial a partir de bovinos portadores crónicos de *A. marginale*, cuya rickettsemia era indetectable mediante microscopía. Uilenberg (1970) no sólo informó que un 1% de las garrapatas había migrado desde un ternero infestado hacia uno limpio, sino que luego de esa migración hubo transmisión de *A. marginale*.

La transmisión intraestadial de *A. marginale* por *R. microplus* es posible, sin embargo, dependería de la tasa de migración de garrapatas entre hospedadores, aspecto discutido en el Capítulo 1 de esta tesis. Integrantes del grupo de trabajo de la EEA INTA Rafaela han encontrado de manera fortuita adultos de *R. microplus* en vegetación en la provincia de Formosa, lo que se suma al hallazgo de un macho de *R. microplus* en pastura en Colonia Benítez, provincia de Chaco, en el marco de este trabajo. Estos hechos confirmarían que ocurre el desprendimiento de especímenes de *R. microplus* de su hospedador, tal lo reportado por Bennett (1974). Connell & Hall (1972) hacia el final de su trabajo comentan que hallaron ocho hembras ingurgitadas de *R. microplus* en un ternero de 5 días de edad, el cual seguramente se infestó con garrapatas adultas. La información recopilada y los resultados del ensayo de migración de adultos de *R. microplus* presentados en esta tesis motivan a trazar nuevas líneas de investigación que permitan describir la transmisión intraestadial de *A. marginale*, evaluando aspectos

como tasa de infección en ninfas y adultos. Kocan et al., (1986) encontraron colonias de *A. marginale* en machos de *D. andersoni* que habían permanecido 6 meses sin alimentarse. En un trabajo posterior, Kocan et al., (1992a) demostraron que la presencia de colonias de *A. marginale* en intestino de machos de *D. andersoni* sin alimentar es persistente, y que dichas colonias servirían como fuente de infección del patógeno en las garrapatas, multiplicándose y transmitiéndose al hospedador vertebrado cada vez que ésta se alimenta. Si bien esta descripción corresponde a *D. andersoni*, ilustra el proceso de la transmisión intraestadial y es una dinámica que resultaría interesante de evaluar en detalle en especímenes adultos de *R. microplus*.

Los resultados negativos de los ensayos de transmisión transestadial y transovárica de *A. tonelliae* indicarían que esta especie de garrapata no posee competencia vectorial para transmitir *A. marginale*. Aunque el conjunto de los resultados del Capítulo 2 de este trabajo son contundentes en cuanto a transmisión, la detección de ADN de *A. marginale* en una muestra de ninfas sin alimentar podría considerarse un indicio de que el patógeno es, al menos, capaz de infectar células de *A. tonelliae*. También se ha reportado que, en algunos casos, aunque el patógeno haya mostrado capacidad de invasión o incluso replicación en las células de la garrapata, no necesariamente termina transmitiéndose (Scoles et al., 2007).

Se ha reportado que la eficiencia de la transmisión por garrapatas varía con distintas cepas de *A. marginale* (Scoles et al., 2006, 2007; Smith et al., 1986; Wickwire et al., 1987). La evaluación de la competencia vectorial de diferentes cepas de *A. marginale* podría ser una línea de investigación a desarrollar. Sin embargo, en base a la genotipificación del gen *msp1a* de *A. marginale* se han descrito hasta el momento 224 cepas, 11 genotipos y 193 secuencias de repetición en tándem según lo revisado por Rar et al., (2021) lo que dificultaría el alcance de un estudio de estas características. Además, es importante mencionar que a pesar de las diferencias entre cepas, la transmisión de *A. marginale* ha sido demostrada para distintas especies de un mismo género de garrapatas, tal es el caso de la transmisión transestadial de *A. marginale* por *D. albipictus*, *D. andersoni* y *D. variabilis* (Boyton et al., 1936; Ewing et al., 1997; Kocan et al., 1981; Wickwire et al., 1987, Kocan et al., 1981; Smith 1986), *R. annulatus*, *R. bursa*, *R. microplus*, *R. sanguineus* y *R. simus* (Aguirre et al., 1994; Brumpt, 1936; Potgieter & Van Rensburg, 1982; Rees, 1934; Samish et al., 1993; Thompson & Roa, 1978). Sin embargo, ese no es el caso de *Amblyomma*, dado que, a excepción de *A. neumanni* (Gaido et al., 1995) en ninguno de los estudios realizados

con diferentes especies del género se reportó transmisión de *A. marginale*, tal es el caso de *A. americanum* (Anthony & Roby, 1966; Rees, 1934; Sanborn & Moe, 1934), *A. mixtum* (nombrada como *A. cajennense*) (Rees, 1934; Sanborn & Moe, 1934) y *A. tonelliae* en el presente trabajo.

Según Parola (1993) la transmisión transestadial es un componente necesario para establecer que una garrapata posee competencia vectorial. Si además el patógeno se transmite de manera eficiente transováricamente por la garrapata, se puede establecer que la misma servirá como reservorio, y la distribución del patógeno será similar a la de la garrapata. En el caso del género *Anaplasma*, este autor sostiene que el patógeno se mantendría en las garrapatas por transmisión transestadial, pero no transovárica, concluyendo que las garrapatas actuarían como vectores, pero no reservorios. En el caso de *A. marginale*, Brayton (2012) afirma en una revisión que la transmisión dependería del hospedador vertebrado, que actuaría como reservorio y fuente de la infección hacia las garrapatas.

Tal lo mencionado en este trabajo sobre las garrapatas que parasitan a los bovinos en Argentina, sería pertinente abordar estudios de transmisión de *A. marginale* por las garrapatas *A. sculptum* y *A. neumanni*, especies que son capaces de desarrollar todos sus estadios sobre los bovinos y cuyas infestaciones además suelen ser masivas. Los únicos trabajos que han abordado la transmisión de *A. marginale* por garrapatas del género *Amblyomma* son los de Anthony & Roby (1966), Rees (1934), Sanborn & Moe (1934) y Gaido et al. (1995), discutidos en el Capítulo 2 de esta tesis. Dados los avances en la sensibilidad de los métodos diagnósticos existentes actualmente sería interesante re evaluar la competencia vectorial de *A. neumanni* para la transmisión transestadial de ninfa a adulto, además de abordar la transmisión transestadial de larva a ninfa y la transmisión transovárica.

A modo de conclusión, los resultados negativos tanto en el análisis molecular de larvas de *R. microplus* como en los ensayos de transmisión, sumado a la evidencia de migración de especímenes adultos entre bovinos, indican que el rol de *R. microplus* en la epidemiología de la anaplasmosis bovina estaría más relacionado a transmisión intraestadial y transestadial que a transmisión transovárica. En el caso de *A. tonelliae* se demostró que esta especie de garrapata no tendría capacidad para transmitir *A. marginale* por medio de ninguna de las vías descriptas, aunque dado el resultado de una tasa mínima de infección del 1,25% en ninfas, no se descarta la posibilidad de transmisión transestadial. Si bien estos resultados no necesariamente son extrapolables a

otras especies del género *Amblyomma*, dado que la especie evaluada se tomó como modelo de garrapata de tres hospedadores es probable que el rol de este género de garrapatas no sea de impacto en la epidemiología de la anaplasmosis bovina.

# Bibliografía

Abdala, A.A., Mangold, A.J., de Echaide, S.T., 1992. Transmisión experimental de *Anaplasma marginale* por palpación rectal. Rev. Vet. Arg. 9, 683-685.

Aguiar, D. M., Hagiwara, M. K., & Labruna, M. B., 2008. In vitro isolation and molecular characterization of an *Ehrlichia canis* strain from São Paulo, Brazil. Braz. J. Microbiol. 39, 489–493.

Aguirre, D.H., Bermúdez, A.C., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., 1988. Infección natural con *Anaplasma marginale* en bovinos de raza Hereford, Criolla y Nelore en Tucumán, Argentina. Rev. Latinoam. Microbiol. 30, 37–42.

Aguirre, D.H., Gaido, A.B., Vinabal, A.E., De Echaide, S.T., Guglielmone, A.A., 1994. Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different levels of rickettsaemia. Parasite 1, 405–407.

Aguirre, D., Neumann, R., Torioni de Echaide, S., & Mangold, A., 2011. Pérdidas económicas directas por un brote de anaplasmosis bovina en un rodeo de cría del noroeste argentino. Revista Argentina de Producción 31, 145–153.

Allen, P.C., Kuttler, K.L., Amerauld, T.E., 1981. Clinical chemistry of anaplasmosis: blood change in infected mature cows. Am. J. Vet. Res. 42, 322-325.

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*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87, 3220–3224.

Anthony, D.W. & Roby, T.O., 1966. The experimental transmission of bovine anaplasmosis by three species of North American ticks. Am. J. Vet. Res. 27, 191–198.

Anziani, O.S. Anaplasmosis en áreas libres de garrapatas. Memoria de la Reunión Anual de Información técnica, EEA INTA Rafaela, Argentina, 1979. p 63–68.

Anziani, O.S., Tarabla, H.D., y Hadani, A. 1982. Inoculación de vaquillonas con cepas de campo de *Anaplasma marginale*. Evaluación de la inmunidad conferida a través del desafío experimental. Rev. Med. Vet. 63, 249-256.

- Araoz, V., Micheloud, J.F., Gaido, A.B., Salatin, A.O., Aguirre, D.H., 2017. Brotes de babesiosis y anaplasmosis bovina diagnosticados en el INTA Salta, Argentina: período 2006-2016. *Rev. FAVE* 16(2), 101–105.
- Aubry, P. & Geale, D.W., 2011. A review of Bovine anaplasmosis. *Transbound. Emerg. Dis.* 58, 1–30.
- Baldrige, G.D., Scoles, G.A., Burkhardt, N.Y., Schloeder, B., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., 2009. Transovarial transmission of Francisella-like endosymbionts and *Anaplasma phagocytophilum* variants in *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 46, 625-632.
- Barker, C.M., & Reisen, W.K., 2019. Chapter 4: Epidemiology of Vector-Borne Diseases. In: Mullen, G., Durden, L., *Medical and Veterinary Entomology*. Ed. Elsevier Inc, USA. p 33-49.
- 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.
- Bennett, G.F., 1974. *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acaridae: Ixodidae) on the bovine host. I. Mortality during the developmental cycle. *Acarologia*, 16(4), 643–650.
- Boyton, W.H., Hermes, W.B., Howell, D.E. & Woods, G.M., 1936. Anaplasmosis transmission by three species of ticks in California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 88, 500–502.
- 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.
- Bram, R.A., 1975. Tick-borne livestock diseases and their vectors. 1. The global problem. *World Anim. Rev.* 6, 1-5.
- Brayton, K.A., 2012. Transmisión de *Anaplasma marginale* por garrapatas. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias* 3(1), 41–50.
- Brown, D.C.G., 1997. Dynamic and impact of tick-borne diseases of cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* 29, 1S–3S.
- Brumpt, E., 1931. Transmission d'*Anaplasma marginale* par *Rhipicephalus bursa* et par *margraopus*. *Annals de Parasitologie* 9, 4–9.

Burgdorfer, W. & Brinton, L.P., 1975. Mechanisms of Transovarial Infection of Spotted Fever Rickettsiae in Ticks. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 266, 61–72.

Burkart, R., Bárbaro, O., Sánchez, R.O. & Gómez, D.A., 1999. Eco-regiones de la Argentina. Administración de Parques Nacionales, Secretaría de Recursos Naturales y Desarrollo Sustentables, Buenos Aires.

Cabezas-Cruz, A., Passos, L.M.F., Lis, K., Kenneil, R., Valdés, J.J., Ferrolho, J., Tonk, M., Pohl, A.E., Grubhoffer, L., Zweygarth, E., Shkap, V., Ribeiro, M.F.B., Estrada-Peña, A., Kocan, K.M., de la Fuente, J., 2013. Functional and immunological relevance of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a sequence and structural analysis. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0065243.

Canevari, J.T., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., Nava, S., 2017. Population dynamics of the cattle tick *Rhipicephalus* ( *Boophilus* ) *microplus* in a subtropical subhumid region of Argentina for use in the design of control strategies. *Med. Vet. Entomol.* 31, 6–14.

Catanese, H.N., Brayton, K.A., Gebremedhin, A.H., 2016. RepeatAnalyzer: a tool for analysing and managing short-sequence repeat data. *BMC Genomics* 17, 1–13.

Connell, M. & Hall, W.T.K., 1972. Transmission of *Anaplasma marginale* by the cattle tick *Boophilus microplus*. *Aust. Vet. J.* 48, 477.

de la Fuente, J., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., Kocan, K.M., 2001a. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. *Int. J. Parasitol.* 31, 145–153.

de la Fuente, J., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., McEwen, B.R., Clawson, D., Kocan, K.M., 2001b. Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of *Anaplasma marginale*. *Int. J. Parasitol.* 31, 1705–1714.

de la Fuente, J., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., Kocan, K.M., 2003. Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells. *Vet. Microbiol.* 91(2–3), 265–283.

de la Fuente, J., Ruybal, P., Mtshali, M.S., Naranjo, V., Shuqing, L., Mangold, A.J., Rodríguez, S.D., Jiménez, R., Vicente, J., Moretta, R., Torina, A., Almazán, C., Mbatia, P.M., de Echaide, S.T., 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 Moura, A.B., Vidotto, O., Yamamura, M.H., Vidotto, M.C., Pereira, A.B. da L., 2003. Studies on the *Anaplasma marginale* Theiler, 1910 infection in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887 ) using Nested PCR. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 12, 27–32.

de Ríos, L.G., Pipano, E., Mangold, A.J., Aguirre, D.H., Gaido, A.B., Guglielmone, A.A., 1988. *Anaplasma marginale* con apéndice aislados en el noroeste argentino. *Rev. Med. Vet.* 69, 248–252.

Diehl, P. A., Aeschlimann, A. A., Obenchain, F. D., 1982. Tick Reproduction: Oogenesis and Oviposition. In: *Physiology of Ticks*. Vol 1. Pergamon Press. Oxford.

dos Santos, P.N., de Almeida Valim, J.R., Matos, P.C.M., da Silva, J.B., da Fonseca, A.H., 2019. Molecular characterization of the msp1  $\alpha$  AmRio1 strain of *Anaplasma marginale* in calves and experimentally infected ticks. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* 16, 100268.

Dumler, J.S., Barbet A.F., Bekker C.P.J., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa, Y., & Rurangirwa, F.R., 2001. Reorganization of the 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 “HGEagent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2145–2165.

Esteves, E., Bastos, C. V., Zivkovic, Z., de La Fuente, J., Kocan, K., Blouin, E., Ribeiro, M.F.B., Passos, L.M.F., Daffre, S., 2009. Propagation of a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale* with appendage in a tick cell line (BME26) derived from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol.* 161, 150–153.

Esteves, E., Pohl, P.C., Klafke, G.M., Reck, J., Fogaça, A.C., Martins, J.R., Daffre, S., 2015. Low temperature affects cattle tick reproduction but does not lead to transovarial transmission of *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.* 214, 322–326.

Estrada, I.A., García-Ortiz, M.A., Preciado de la Torre, J.F., Rojas-Ramírez, E.E., Hernández-Ortiz, R., Alpírez-Mendoza, F., Rodríguez Camarillo, S.D., 2020.

Transmission of *Anaplasma marginale* by unfed *Rhipicephalus microplus* tick larvae under experimental conditions. Rev. Mex. Ciencias Pecu. 11, 116–131.

Estrada-Peña, A., Naranjo, V., Acevedo-Whitehouse, K., Mangold, A.J., Kocan, K.M., de la Fuente, J., 2009. Phylogeographic analysis reveals association of tick-borne pathogen, *Anaplasma marginale*, Msp1a sequences with ecological traits affecting tick vector performance. BMC Biol. 7, 57.

Estrada-Peña, A., Tarragona, E.L., Vesco, U., Meneghi, D. de, Mastropaolo, M., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., and Nava, S., 2014. Divergent environmental preferences and areas of sympatry of tick species in the *Amblyomma cajennense* complex (Ixodidae). Int. J. Parasitol. 44, 1081–1089.

Ewing, S.A., Panciera, R.J., Kocan, K. M., Ge, N.L., Welsh, R.D., Olson, R.W., Barker, R. & Rice, L.E., 1997. A winter outbreak of anaplasmosis in a non-endemic area of Oklahoma: a possible role for *Dermacentor albipictus*. J. Vet. Diagn. 9, 206–208.

Foil, L.D., 1989. Tabanids as vectors of disease agents. Parasitol. Today 5, 88-96.

Futse, J.E., Ueti, M.W., Knowles, 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, 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 Parasitol. (Praha). 42, 72.

Guedes, E., Leite, R.C., Prata, M.C.A., Pacheco, R.C., Walker, D.H. & Labruna, M.B., 2005. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 100, 841–845

Guglielmone, A.A., 1992. The level of infestation with the vector of cattle babesiosis in Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 87, 133–137.

Guglielmone, 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, 133–153.

- Guglielmone, A.A. & Nava, S., 2013. Epidemiología y control de las garrapatas de los bovinos en la Argentina, in: Enfermedades Parasitarias Con Importancia Clínica y Productiva En Rumiantes: Fundamentos Epidemiológicos Para Su Diagnostico y Control. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, pp 441–456.
- Guglielmone, A.A., Mangold, A.J., Aguirre, D.H., Gaido, A.B., 1990. Ecological aspects of four species of ticks found on cattle in Salta, Northwest Argentina. *Vet. Parasitol.* 35, 93–101.
- Guglielmone, A.A., Anziani, O.S., Mangold, A.J., Volpogni, M.M.; Vogel, A., 1996. Enrofloxacin to control *Anaplasma marginale* infections. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 791(1), 471-472.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Hauck, D., Jordan, D., Springer, A., Schunack, B., Pachnicke, S., Fingerle, V., & Strube, C., 2020. Transovarial transmission of *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* under field conditions extrapolated from DNA detection in questing larvae. *Parasites and Vectors*, 13 (1), 1-11.
- Hawkins, J.A., Love, J.N., Hidalgo, D.V.M., 1982. Mechanical transmission of anaplasmosis by tabanids (Diptera: Tabanidae). *Am. J. Vet. Res.* 43(4), 732–734.
- Hitchcock, L.F., 1955. Studies on the non-parasitic stages of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). *Aust. J. Zool.* 3, 295–311.
- Hove, P., Khumalo, Z.T.H., Chaisi, M., E, Oosthuizen, M, C., Brayton, K.A., Collins, N.E., 2018. Detection and characterisation of *Anaplasma marginale* and *A. centrale* in South Africa. *Vet. Sci.* 5, 26.
- Howell, D.E., Stiles, G.W., Moe, L.H., 1941. The hereditary transmission of anaplasmosis by *Dermacentor andersoni* Stiles. *Am. J. Vet. Res.* 2, 165-166.
- Ivancovich, J.C., Braithwaite, G.B., Barnett, S.F., 1984 Comportamiento de los estados no-parasitarios de la garrapata del ganado - *Boophilus microplus* (Canestrini). *Boletín EERA-INTA Pres. Roque Saenz Peña, Argentina* 88(3), 129.
- Kieser, S.T., Eriks I.S., Palmer, G.H., 1990. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. 1. *Infect. Immun.* 58(4), 1117-1119.

Kocan, K.M. & de la Fuente, J., 2003. Co-feeding studies of ticks infected with *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.* 112, 295–305.

Kocan, K.M., Teel, K.D., Hair, J.A., 1980. Demonstration of *Anaplasma marginale* Theiler in ticks by tick transmission, animal inoculation, and fluorescent antibody studies. *Am. J. Vet. Res.* 41, 183-186.

Kocan, K.M., Hair, J.A., 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., Holbert, D., Ewing, S.A., Hair, J. A., Barron, S. J., 1983a. Influence of parasitemia level at feeding on development of *Anaplasma marginale* Theiler in *Dermacentor andersoni* Stiles. *Am. J. Vet. Res.* 44(4), 554–557.

Kocan, K. M., Holbert, D., Ewing, S.A., Hair, J.A., Barron, S.J., 1983b. Development of colonies of *Anaplasma marginale* in the gut of incubated *Dermacentor andersoni*. *Am. J. Vet. Res.* 44, 1617-1620.

Kocan, K.M., Holbert, D., Edwards, W., Ewing, S.A., Barron, S.J. and Hair, J.A., 1986. Longevity of colonies of *Anaplasma marginale* in midgut epithelial cells of *Dermacentor andersoni*. *Am. J. Vet. Res.* 47, 1657–1661.

Kocan, K.M., Goff, W.L., Stiller, D., Claypool, P.L., Edwards, W., Ewing, S.A., Hair, J.A., Barron, S.J., 1992a. Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible cattle. *J. Med. Entomol.* 29, 657–668.

Kocan, K.M., Stiller, D., Goff, W.L., Claypool, P.L., Edwards, W., Ewing, S.A., McGuire, T.C., Hair, J.A., Barron, S.J., 1992b. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from infected to susceptible cattle. *Am. J. Vet. Res.* 5, 499–507.

Kocan, K.M., Goff, W.L., Stiller, D., Edwards, W., Ewing, S.A., Claypool, P.L., McGuire, T.C., Hair, J.A. and Barron, S.J., 1993. Development of *Anaplasma marginale* in salivary glands of male *Dermacentor andersoni*. *Am. J. Vet. Res.* 54, 107–112.

Kocan, K.M., Blouin, E.F., Barbet, A.F., 2000. Anaplasmosis control: past, present and future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916, 501–509.

- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Guglielmo, A.A., Meléndez, R.D., 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 698–712.
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Blouin, E.F., Garcia-Garcia, J.C., 2004. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitol.* 129, S285–S300.
- Kocan, K.M., De La Fuente, J., Blouin, E.F., 2008. Advances toward understanding the molecular biology of the *Anaplasma*-tick interface. *Front. Biosci.* 13, 7032–7045.
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Blouin, E.F., Coetzee, J.F., Ewing, S.A., 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.* 167, 95–107.
- Krinsky, W.L., 1976. Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera: Tabanidae). *J. Med. Entomol.* 13, 225–275
- Kuttler, K.L., Graham, O.H., Johnson, S.R., 1971. Apparent Failure of *Boophilus annulatus* to Transmit Anaplasmosis to White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*). *J. Parasitol.* 57, 657.
- Leatch, G., 1973. Preliminary Studies on the Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*. *Aust. Vet. J.* 49, 16–19.
- Little, S.E., Hostetler, J., Kocan, K.M., 2007. Movement of *Rhipicephalus sanguineus* adults between co-housed dogs during active feeding. *Vet. Parasitol.* 150, 139-145.
- Lysyk, T.J., 2013. Movement of Male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) Among Cattle . *J. Med. Entomol.* 50, 977–985.
- Mason, C.A. & Norval, R.A.I., 1981. The transfer of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) from infested to uninfested cattle under field conditions. *Vet. Parasitol.* 8, 185–188.
- Mastropaolo, M., 2014. Epidemiología de la Babesiosis de los bovinos causada por *Babesia bigemina* (Smith y Kilborne, 1893) en el sudoeste de la provincia del Chaco. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Litoral.
- Matsumoto, K., Ogawa, M., Brouqui, P., Raoult, D., Parola, P., 2005. Transmission of *Rickettsia massiliae* in the tick, *Rhipicephalus turanicus*. *Med. Vet. Entomol.* 19, 263–270.

Mazzucco Panizza M., Sebastian P., Canevari J., Primo M.E., Amherdt P., Nava S., Mangold A., Wuattier M., Sarli M., Tarragona E. Resultados preliminares de transmisión de *Anaplasma marginale* por las garrapatas *Amblyomma tonelliae* y *Amblyomma sculptum*. IX Congreso Argentino de Parasitología, Salta, Argentina, 2022.

Meléndez, R.D., 2000. Future perspectives on veterinary hemoparasite research in the tropics at the start of this century. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916, 253–258.

Molad, T., Mazuz, M.L., Fleiderovitz, L., Fish, L., Savitsky, I., Krigel, Y., Leibovitz, B., Molloy, J., Jongejan, F., Shkap, V., 2006. Molecular and serological detection of *A. centrale* and *A. marginale*-infected cattle grazing within an endemic area. *Vet. Microbiol.* 113, 55–62.

Monje, L.D., Fernandez, C., Percara, A., 2019. Detection of *Ehrlichia* sp. strain San Luis and Candidatus *Rickettsia andeanae* in *Amblyomma parvum* ticks. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 10, 111–114.

Nava, S., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., 2006. The natural hosts for larvae and nymphs of *Amblyomma neumanni* and *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 40, 123–131.

Nava, S., Mastropaolo, M., Guglielmone, A.A., Mangold, A.J., 2013. Effect of deforestation and introduction of exotic grasses as livestock forage on the population dynamics of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in northern Argentina. *Res. Vet. Sci.* 95, 1046–1054.

Nava, S., Beati, L., Labruna, M.B., Cáceres, A.G., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., 2014. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 5, 252–276.

Nava, S., Venzal, J.M., Gonzalez-Acuña, D., Martins, T.F., Guglielmone, A.A. *Ticks of the southern cone of America*. Ed. Elsevier Inc. London. 2017.

Nava, S., Rossner, M. V., Torrents, J., Morel, N., Marinez, N.C., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., 2020. Management strategies to minimize the use of synthetic chemical acaricides in the control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) in an area highly favourable for its development in

Argentina. Med. Vet. Entomol. 34, 264–278.

Nava, S., Gamietea, I.J., Morel, N., Guglielmone, A.A., Estrada-Peña, A., 2022. Assesment of habitat suitability for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in temperate areas. Res. Vet. Sci. 150, 10-21.

Núñez, J.L., Muñoz Cobeñas, M. & Moltedo, H., 1982. *Boophilus microplus*: La Garrapata Común del Ganado Vacuno. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires.

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 (7), 281-286.

Palmer, G.H., Rurangirwa, F.R., McElwain, T.F., 2001. Strain composition of the ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a mammalian reservoir for tick transmission. J. Clin. Microbiol. 39, 631–635.

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* strains in a herd with high prevalence of *Anaplasma* infection. J. Clin. Microbiol. 42, 5381–5384.

Parola, P., 1993. Rickettsial Diseases. Ed. Informa Healthcare, New York.

Parola, P., Roux, V., Camicas, J.L., Baradji, I., Brouqui, P., Raoult, D., 2000. Detection of ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 94(6), 707-708.

Potgieter, F.T., 1979. Epizootiology and control of anaplasmosis in South Africa. J. S. Afr. Vet. Assoc. 50, 367-372.

Potgieter, F.T., 1981. Tick transmission of anaplasmosis in South Africa. In: Whitehead, G.B., Gibson, J.D., Tick biology and control. Grahamstown, South Africa: Tick Research Unit, Rhodes University. pp 53-56.

Potgieter, F.T., & Van Rensburg, L., 1982. The effect of incubation and prefeeding of infected *Rhipicephalus simus* nymphae and adults on the transmission of *Anaplasma marginale*. Onderstepoort J. Vet. Res. 49, 99-101.

Potgieter, F.T. & Stoltz W.H., 2004. Bovine anaplasmosis. In: Infectious Diseases of Livestock, Vol I, 2<sup>nd</sup> edition. Oxford University Press, South Africa. pp 594-616.

- 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, 119-122.
- Potgieter, F.T., Kocan, K.M., Mc New, R.W., Ewing, S.A., 1983. Demonstration of colonies of *Anaplasma marginale* in the midgut of *Rhipicephalus simus*. Am. J. Vet. Res. 44, 2256-2261.
- Primo, M.E., Thompson, C.S., Valentini, B.S., Sarli, M., Novoa, M.B., Mangold, A.J., De Echaide, S.T., 2019. Development of a novel fusion protein with *Anaplasma marginale* and A. Centrale MSP5 improved performance of Anaplasma antibody detection by cELISA in infected and vaccinated cattle. PLoS One 14, 1–13.
- Primo, M.E., Sarli, M., Thompson, C.S., Torioni, S.M., Echaide, I.E., 2021. Sensitivity of *Anaplasma marginale* genotypes to oxytetracycline assessed by analyzing the *msp1*  $\alpha$  gene in experimentally infected cattle. Ticks Tick. Borne. Dis. 12, 101787.
- Randolph, S.E., 1998. Ticks are not insects: Consequences of contrasting vector biology for transmission potential. Parasitol. Today 14, 186–192.
- Rar, V., Tkachev, S., Tikunova, N., 2021. Genetic diversity of Anaplasma bacteria: Twenty years later. Infect. Genet. Evol. 91, 104833.
- Rees, C.W., 1934. Transmission of anaplasmosis by various species of ticks. U.S. Dept. Agric., 418, 17.
- Ribeiro, M.F.B. & Lima, J.D., 1996. Morphology and development of *Anaplasma marginale* in midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. Vet. Parasitol. 61, 31–39.
- Ribeiro, M.F.B., Lima, J.D., Salcedo, J.H.P., 1996. Attempted transmission of *Anaplasma marginale* by infected *Boophilus microplus*. Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec. 48, 397–402.
- Roberts, R.H., Pund, W.A., McCrory, H.F., Scales, J.W., Collins, J.C., 1969. Culicidae and tabanidae as potential vectors of anaplasmosis in Mississippi. Ann. Entomol. Soc. 62(4), 863–868.
- Rosenbusch, F. & Gonzalez, R., 1923. Garrapatización y Tristeza. Rev. Med. Vet. 6, 683-703.

- Ruiz, P.M.G., Passos, L.M.F., Barbosa Ribeiro, M.F., 2005. Lack of infectivity of a Brazilian *Anaplasma marginale* isolate for *Boophilus microplus* ticks. *Vet. Parasitol.* 128, 325–331.
- Ruybal, P., Moretta, R., Perez, A., Petrih, 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, 176–180.
- Sanborn, C.E. & Moe, L.H., 1934. Anaplasmosis investigations. Rept. Okla. Agr. Expt. Sta., 275–279.
- Samish, M., Pipano, A., Hadani, A., 1993. Intrastadial and interstadial transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus annulatus* ticks in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 54, 411–414.
- Sarli, M., Thompson, C.S., Novoa, M.B., Valentini, B.S., Mastropaolo, M., Echaide, I.E., de Echaide, S.T., Primo, M.E., 2019. Development and evaluation of a double-antigen sandwich ELISA to identify *Anaplasma marginale*-infected and *A. centrale*-vaccinated cattle. *J. Vet. Diagnostic. Investig.* 1–7.
- Scoles, G.A., McElwain, T.F., Rurangirwa, F.R., Knowles, D.P., Lysyk, T.J., 2006. A Canadian bison isolate of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) is not transmissible by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae), whereas ticks from two Canadian *D. andersoni* populations are competent vectors of a U.S. isolate. *J. Med. Entomol.* 43, 971–975.
- Scoles, G., Ueti, M.W., Noh, S.M., Knowles, D.P., Palmer, G.H., 2007. Conservation of transmission phenotype of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) strains among *Dermacentor* and *Rhipicephalus* ticks (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 44, 484–491.
- Shimada, M.K., Yamamura, M.H., Kawasaki, P.M., Tamekuni, K., Igarashi, M., Vidotto, O., Vidotto, M.C., 2004. Detection of *Anaplasma marginale* DNA in larvae of *Boophilus microplus* ticks by polymerase chain reaction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1026, 95–102.
- Smith, T. & Kilborne, F.L., 1893. Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. Washington: Government printing office. Report No.: 1.

Smith, R.D., Levy, M.G., Kuhlenschmidt, M.S., Adams, J.H., Rzechula, D.L., Hardt, T.A., Kocan, K.M., 1986. Isolate of *Anaplasma marginale* not transmitted by ticks. Am. J. Vet. Res. 47(1), 127-129.

Soares, J.F., Soares, H.S., Barbieri, A.M., Labruna, M.B., 2012. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. Med. Vet. Entomol. 26, 139–151.

Sonenshine, D.E., Lane, R.S., Nicholson, W.L., 2002. Chapter 24: Ticks (Ixodida). In: Mullen, G., Durden, L., Medical and Veterinary Entomology, Ed. Elsevier Science, Amsterdam. pp 517-558.

Spath, E.J.A., Guglielmone, A.A., Signorini, A.R., Mangold, A.J., 1994. Estimación de las pérdidas económicas directas producidas por la garrapata *Boophilus microplus* y las enfermedades asociadas en la Argentina. Therios 23, 454–468.

Stich, R.W., Kocan, K.M., Palmer, G.H., Ewing, S.A., Hair, J.A., Barron, S.J., 1989. Transstadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentor variabilis*. Am. J. Vet. Res. 50, 1377- 1380.

Stilller, D., Coan, M.E., Goff, W.L., Johnson, L.W., McGuire, T.C., 1989. The importance and putative role of *Dermacentor* spp. males in anaplasmosis epidemiology: transmission of *Anaplasma marginale* to cattle by ad libitum interhost transfer of *D. andersoni* males under semi-natural conditions. In Proceedings of Eighth National Veterinary Hemoparasite Disease Conference. Program Committee, St. Louis, Mo. P 209.

Tarragona, E.L., Cicuttin, G.L., Mangold, A.J., Mastropaolo, M., Nazarena De Salvo, M., Nava, S., 2015a. Rickettsia infection in *Amblyomma tonelliae*, a tick species from the *Amblyomma cajennense* complex. Ticks Tick. Borne. Dis. 6, 173–177.

Tarragona, E.L., Mangold, A.J., Mastropaolo, M., Guglielmone, A.A., Nava, S., 2015b. Ecology and genetic variation of *Amblyomma tonelliae* in Argentina. Med. Vet. Entomol. 29, 297–304.

Tarragona, E.L., Soares, J.F., Costa, F.B., Labruna, M.B., Nava, S., 2016. Vectorial competence of *Amblyomma tonelliae* to transmit *Rickettsia rickettsii*. Med. Vet. Entomol. 30, 410–415.

Tarragona, E.L., Sebastian, P.S., Saracho-Bottero, M.N., Martínez, E.I., Debárbora,

- V.N., Mangold, A.J., Guglielmo, A.A., Nava, S., 2018. Seasonal dynamics, geographical range size, hosts, genetic diversity and phylogeography of *Amblyomma sculptum* in Argentina. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 9, 1264-1274.
- Theiler, A., 1910. Gall sickness of South Africa (anaplasmosis of cattle). *J. Comp. Pathol. Ther.* 23, 98–115.
- Thompson, K.C. & Roa, J.C., 1978. Transmisión de *Anaplasma marginale* por la garrapata *Boophilus microplus*. *ICA Bogotá XIII*, 131–134.
- Torioni, S., Knowles, D., McGuire, T., Palmer, G., Suarez, C., McElwain, T., 1998. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *J. Clin. Microbiol.* 36, 777–782.
- Ueti, M.W., Reagan, J.O., Knowles, D.P., Scoles, G.A., Shkap, V., Palmer, G.H., 2007. Identification of midgut and salivary glands as specific and distinct barriers to efficient tick-borne transmission of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.* 75, 2959–2964.
- Uilenberg, G., 1968. Notes sur les babésioses et l'anaplasmosse des bovins à Madagascar. I. Introduction. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.*, 21, 467-474.
- Uilenberg, G., 1970. Notes sur les babesioses et l'anaplasmosse des bovins à Madagascar. IV. Note additionnelle sur la transmission. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.*, 23(3), 309–312.
- Vanzini, V.R. & Ramirez, L.M., 1994. Babesiosis y anaplasmosis bovina, epidemiologia y control. *RIA* 25(3), 137–190.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. & Lane, D.J., 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *J. Bacteriol.* 173, 697–703.
- Wickwire, K.B., Kocan, K.M., Barron, S.T., Ewing, S.A., Smith, R.D., Hair, J.A., 1987. Infectivity of three *Anaplasma marginale* isolates for *Demarcentor andersoni*. *Am. J. Vet. Res.* 48, 96–99.
- Wright, C.L., Gaff, H.D., Sonenshine, D.E., Hynes, W.L., 2015. Experimental vertical transmission of *Rickettsia parkeri* in the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum*. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 6, 568–573.

Zaugg, J.L., 1985. Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation. *Am. J. Vet. Res.* 46, 570–572.