

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

DR. JAVIER A. COLEGIO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
DIRECTOR MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA



TESIS:

**"IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE ANAPLASMA EN BOVINOS
POR TÉCNICAS MOLECULARES"**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS

PRESENTA:

José Angel Mariscal Castro

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho

CO-DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Idalia Enríquez Verdugo

ASESORES DE TESIS:

MC. Jaime Eleazar Borbolla Ibarra

MC. Nohemí Castro del Campo

Culiacán, Sinaloa a Junio del 2013

DR. JAVIER ALONSO ROMO RUBIO
DIRECTOR
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

Los abajo firmantes, miembros del Jurado de Grado, hacemos constar que la Tesis:

“IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE ANAPLASMA EN BOVINOS POR TÉCNICAS MOLECULARES”

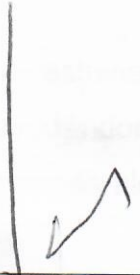
Presentada como requisito parcial para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Agropecuarias por el:

C. JOSÉ ANGEL MARISCAL CASTRO

Ha sido revisada y considerando que cumple con los requisitos necesarios, se otorga el VOTO APROBATORIO, para ser impresa y defendida en el Exámen de Grado en la fecha que la Universidad asigne para ello.

Atentamente

Culiacán. Sinaloa; a 24 de Junio de 2013




MC. Jaime Eleazar Berbolla Ibarra
Presidente



MC. Nohemí Castro del Campo
Secretaria



Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho
Vocal A



Dra. Idalia Enríquez Verdugo
Vocal B

DEDICATORIA

A mis padres José Angel Mariscal Bastidas y Laura Castro Corrales, por estar a mi lado en todo momento, por su apoyo, preocupación y creer en mí y en lo que hago, que gracias a su apoyo y cariño, he sacado adelante mis metas con muchas ganas.

A mi abuela Oralia Moreno Corrales de López, por sus consejos, cariño y apoyo, cada día de mi vida, quien es un motivo de ser alguien preparado y ser alguien de Bien en esta vida.

A mi abuelo Hugo López Pérez † que aunque no se encuentra presente en esta vida, lo llevo conmigo y es una razón de superarme, prepararme y ser una persona de Bien.

A mis hermanas Laura Mariscal Castro y Paulina Mariscal Castro, por su cariño y estar apoyándome y ayudándome en lo que necesite.

A mi novia Samantha Sánchez Sánchez, por su cariño y estar conmigo en este y muchos otros procesos de mi vida, teniendo en ella una razón importante para salir adelante y superarme día a día.

A mis amigos que estuvieron a mi lado en cada parte de mi proceso de ésta maestría, ya sea ayudándome y/o apoyándome con cada trabajo que se presentara, además de hacerme más alegre todo este tiempo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho, MC. Jaime Eleazar Borbolla Ibarra y Dra. Idalia Enríquez Verdugo, por la oportunidad de formarme profesionalmente, de ayudarme y orientarme, de tenerme paciencia y estar siempre disponibles para cualquier inquietud, duda y consejos que necesitara.

A la MC. Nohemí Castro del Campo, MC. Silvia Cota Guajardo, MVZ. Claudia Leonor Barraza Tizoc, Dr. Héctor López Pérez, Dr. Horacio Dávila Ramos y MVZ. Isabel Quintero Osuna, por su amistad y ayuda en la elaboración y revisión de mi tesis, así como sus consejos.

A mis amigos Vladimir López, Heribier Ramos, Ramón Cuén, Daniel Solís, Mayra Ramírez y César Badilla, por su amistad, apoyos y paciencia, para ayudarme en todo este proceso.

A todos mis demás amigos que participaron directa e indirectamente en mi formación.

Al CONACYT por la ayuda brindada y oportunidad que formar parte de la Maestría en Ciencias Agropecuarias generación 2010 – 2012.

CONTENIDO

INDICE	PAGINA
INDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Generalidades de <i>Anaplasma spp.</i>	3
2.1.1. Morfología y Taxonomía.....	3
2.1.2. Factores de Virulencia.....	3
2.1.3. Anaplasmosis.....	4
2.1.3.1. Signología.....	4
2.1.4. Ciclo de Vida.....	5
2.1.5. Vectores y Transmisión.....	6
2.2. Distribución e Importancia Económica.....	7
2.3. Diversidad Genética.....	8
2.3.1. Proteínas de la Superficie de la Membrana (MSP).....	8
2.3.2. Proteínas del Aparato de Secresión Tipo IV (VirB).....	9
2.4. Diagnóstico.....	10
2.4.1. Diagnóstico Clínico.....	10
2.4.2. Diagnóstico de Laboratorio.....	10
2.4.2.1. Extendido de Frotis Sanguíneo Teñido con la Tinción Giemsa - Wright.....	10
2.4.2.2. Pruebas Inmunoenzimáticas Competitiva (cELISA).....	11
2.4.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	11
2.5. Tratamiento y Control.....	12
2.6. Antecedentes Directos.....	13
III. HIPÓTESIS.....	15
IV. OBJETIVOS.....	16
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
VII. CONCLUSIONES.....	23
VIII. ANEXOS.....	24
IX. LITERATURA CITADA.....	28

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
FIGURA 1. Extracción de sangre de un bovino de la vena coccígea.....	24
FIGURA 2. Purificación de ADN.....	24
FIGURA 3. Gel de Agarosa al 1%. Carril 1 y 15, marcador de tamaño 1 kb DNA ladder. Carril: 2-14 y 16-24, DNA de Sangre de Bovino.....	25
FIGURA 4. Gel de Agarosa al 1%. Carril 1 y 15, marcador de tamaño 1 kb DNA ladder. Carril 2-14 y 16-24 amplificación del gen 16S RNAr de <i>A.spp</i>	25
FIGURA 5. Porcentajes del Diagnóstico por PCR anidado de las especies de <i>Anaplasma</i> en Bovinos.....	27
FIGURA 6. Número de Bovinos Diagnosticados por PCR anidado de las especies de <i>Anaplasma</i> en Bovinos.....	27
FIGURA 7. Gel de Agarosa al 1%. Carril 1 y 15, marcador de tamaño 1 kb DNA ladder. Carril 2-14 y 16-24 amplificación de <i>A. marginale</i>	26
FIGURA 8. Gel de Agarosa al 1%. Carril 1, marcador de tamaño 1 kb DNA ladder. Carril 2-10 amplificación de <i>A. bovis</i>	26

RESUMEN

Identificación de las especies de *Anaplasma* en Bovinos por Técnicas Moleculares

José Angel Mariscal Castro

Entre las enfermedades transmitidas por artrópodos hematófagos, como la garrapata, la anaplasmosis representa en las áreas tropicales y subtropicales del mundo, uno de los padecimientos más significativos de los rumiantes, causando grandes pérdidas económicas. El estudio de la identificación de éstos microorganismos, es trascendente para lograr desarrollar mecanismos de control efectivos de la enfermedad, de aquí la importancia de la utilización de técnicas de alta especificidad y sensibilidad como son las técnicas moleculares. Con el objetivo de identificar las especies de *Anaplasma* que provocan la Anaplasmosis bovina mediante la técnica molecular del PCR anidado en el municipio de Culiacán, Sinaloa, se obtuvieron 120 muestras de sangre completa de bovinos de doble propósito, a las cuales se les extrajo el ADN (método Fenol – Cloroformo) y se realizó la identificación de las especies utilizando técnicas moleculares (PCR y PCR anidado). Con el uso de las técnicas empleadas se demostró la presencia de *Anaplasma spp.*, en 50 muestras, de las cuales se identificaron dos especies de ésta Rickettsia, *A. marginale* en 48 muestras (40%) y *A. bovis* en dos muestras (1.67%) que se encontraron infectando al ganado bovino en Culiacán, Sinaloa, lo cual nos indica que es un problema de atención en las explotaciones, y nos obliga a seguir investigando dichas especies con el fin de obtener información que nos lleve a un mejor control de ésta enfermedad.

Palabras claves: *Anaplasma marginale*, *Anaplasma bovis*, Identificación, PCR, Bovinos, Culiacán.

ABSTRACT

Identification of *Anaplasma* species in cattle by Molecular Techniques

José Angel Mariscal Castro

Among the diseases transmitted by blood-sucking arthropods such as ticks, the Anaplasmosis represents in tropical and subtropical areas of the world, one of the most significant ruminants's diseases, causing important economic losses. The study of the identification of these microorganisms, it is important to develop mechanisms to achieve effective control of the disease, hence the importance of using techniques of high specificity and sensitivity such as molecular techniques. In order to identify the species of *Anaplasma* that cause bovine anaplasmosis by nested PCR molecular technique in the city of Culiacan, Sinaloa, blood samples were collected from jugular vein of 120 cattle, the DNA was extracted (phenol – chloroform, method) and the identification was performed of the species, using molecular techniques (PCR and nested PCR). With the use of these techniques, demonstrated the presence of *Anaplasma spp.* in 50 samples, of which identified two species, *A. marginale* in 48 samples (40%) and *A. bovis* in two samples (1.67%) were found infecting cattle in Culiacan, Sinaloa. The results indicate that it is lack of attention problem in the farms, This leads us to investigate these species in order to obtain information that will take better control of this disease.

Keywords: *Anaplasma marginale*, *Anaplasma bovis*, Identification, PCR, Cattle, Culiacán.

I. INTRODUCCIÓN

Anaplasma spp., es una bacteria con forma de cocos pleomórficos, son intracelulares obligadas y gram negativos (Rikihisa, 2006), clasificado en el género *Anaplasma* dentro del orden Rickettsiales y familia Anaplasmataceae (Kocan, *et al.*, 2000; Dumler, *et al.*, 2001; de la Fuente, *et al.*, 2005a) es responsable de la anaplasmosis, que es una enfermedad que representa uno de los padecimientos más importantes en los bovinos y otros rumiantes tanto en zonas tropicales y subtropicales de el mundo causando significativas pérdidas económicas en las explotaciones (Dumler, *et al.*, 2001; Inokuma, 2007). Ésta enfermedad presenta cuatro fases: incubación, desarrollo, convalecencia y portador (Stokka, *et al.*, 2000) en su fase de desarrollo o aguda, se caracteriza por una anemia hemolítica progresiva asociada con la pérdida de peso, fiebre, depresión, disminución tanto en la producción de leche como carne, y en algunos casos aborto y hasta la muerte (Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2004; Zivkovic, *et al.*, 2007), mientras que en la fase de portador, el ganado recuperado de una enfermedad aguda siguen siendo portadores persistentes con baja parasitemia asintomática y pueden servir como reservorios para la transmisión del organismo (Palmer y Brayton, 2007), además, éste padecimiento es producido por varias especies patógenas, de las cuales se tiene a *A. marginale* (Kocan, *et al.*, 2009; Shebish, *et al.*, 2012; Singh, *et al.*, 2012; Ybanez, *et al.*, 2012), *A. bovis* (Jilantai, *et al.*, 2009; Noaman y Shayan, 2010a), *A. centrale* (Molad, *et al.*, 2006) *A. ovis* (Yabsley, *et al.*, 2005; Yabsley, *et al.*, 2006; de la Fuente, *et al.*, 2006a; Razmi, *et al.*, 2006; Torina, *et al.*, 2008b; Psaroulaki, *et al.*, 2009), *A. phagocytophilum* (Alberti, *et al.*, 2005; Granquist, *et al.*, 2010) y *A. platys* (de la Fuente, *et al.*, 2006b; Estrada, *et al.*, 2009), cada o varias especies bacterianas infectan a uno o varias especies animales, como lo son los rumiantes domésticos y salvajes, equinos, perros y al ser humano. Se pueden presentar dos mecanismos de transmisión de ésta infección; uno es por vía biológica realizado por la transferencia de sangre infectada por garrapatas (Kocan, *et al.*, 2008) y el otro por vía mecánica, el cual ocurre por otros insectos hematófagos, por el uso de fómites contaminados con sangre, incluyendo agujas, cierra descornadora, pinzas tatuadoras, aretadoras e instrumentos de castración (Carelli, *et al.*, 2007; Kocan, *et al.*, 2009). Existen métodos de diagnóstico para la identificación de *A. spp.*, el más común es el exámen microscópico de frotis sanguíneo teñidos por el

colorante con Giemsa y Wright, más no para caracterizar las especies de éste microorganismo (Carelli, *et al.*, 2007), otra técnica es la del ensayo inmunosorbente ligada a enzimas competitivo (cELISA), utilizado para el diagnóstico de la infección por *A. marginale* (Ndung'u, *et al.*, 1995; Knowles, *et al.*, 1996; de la Fuente, *et al.*, 2004a; de la Fuente, *et al.*, 2004b), en estudios realizados en Sinaloa mediante ésta técnica, se ha determinado ésta especie en Bovinos (Enríquez, *et al.*, 2009) que, aún cuando presenta una sensibilidad de 96% y especificidad de 95% (Reyna-Bello, *et al.*, 1998), ha mostrado reacción cruzada con otras especies debido a su alta similitud (Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2004; Lin, *et al.*, 2004; de la Fuente, *et al.*, 2004a), por lo cual, se han desarrollado otras técnicas, que presentan mayor especificidad y sensibilidad, como las que se basan en la detección y amplificación del gen del ADN de *Anaplasma spp*, llamadas también de biología molecular, como el de la Reacción en Cadena de la Polimerasa ó anidado (PCR y PCRn) (Molad, *et al.*, 2006) y el de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLPs) (Noaman y Shayan, 2010b). Con la información obtenida a través de investigaciones se tiene que la importancia del uso de técnicas diagnósticas, como las de biología molecular son necesarias para lograr la identificación de las especies existentes de ésta *Rickettsia* en la zona de estudio, lo cual nos lleva a conocer más a fondo sobre éste microorganismo, que, a su vez, es el primer paso para así llegar a dar con las herramientas necesarias para el control efectivo contra la enfermedad, por lo cual, el objetivo de ésta investigación fue identificar las especies de *Anaplasma* que provocan la Anaplasmosis bovina mediante la técnica molecular del PCR anidado en el municipio de Culiacán, Sinaloa.

II. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de *Anaplasma spp*

2.1.1. Morfología y Taxonomía

El género *Anaplasma* abarca un grupo de bacterias intracelulares obligadas que se encuentran en vacuolas de las células eucariotas (Dumler, *et al.*, 2001), además, su tamaño oscila entre 0.3 - 0.5 μm de diámetro y su longitud es de 0.8 – 2 μm , tiene forma de cocos pleomórficos y son gram-negativas (Rikihisa, 2006), pertenecientes al orden Rickettsiales y a la familia *Anaplasmataceae* (de la Fuente, *et al.*, 2005a; Kocan, *et al.*, 2000; Dumler *et al.*, 2001). Su clasificación sistemática se realizó sobre la base de características morfológicas, ecológicas, caracterización epidemiológica y clínica, sin embargo, el desarrollo de métodos moleculares en los últimos años ha permitido el reconocimiento parcial del genoma de estas bacterias y por consiguiente el cambio parcial en su posición sistemática (Rymaszewska y Grenda, 2008), tiene la capacidad de multiplicarse en la sangre de hospederos vertebrados y hemolinfa de artrópodos, principalmente garrapatas (de la Fuente, *et al.*, 2006b). El género *Anaplasma* se divide en varias especies, de las cuales se tiene a *A. marginale* (Kocan, *et al.*, 2009; Shebish, *et al.*, 2012; Singh, *et al.*, 2012; Ybanez, *et al.*, 2012), *A. bovis* (Jilantai, *et al.*, 2009; Noaman y Shayan, 2010a), *A. centrale* (Molad, *et al.*, 2006) *A. ovis* (Yabsley, *et al.*, 2005; Yabsley, *et al.*, 2006; de la Fuente, *et al.*, 2006a; Razmi, *et al.*, 2006; Torina, *et al.*, 2008b; Psaroulaki, *et al.*, 2009), *A. phagocytophilum* (Alberti, *et al.*, 2005; Granquist, *et al.*, 2010) y *A. platys* (de la Fuente, *et al.*, 2006b; Estrada, *et al.*, 2009), de todas las especies, una o varias infectan a uno o varias especies animales, como lo son los rumiantes domésticos y salvajes, equinos, perros y al ser humano.

2.1.2. Factores de Virulencia

Anaplasma posee varios factores de virulencia, entre los que destacan las Proteínas de la Superficie de la Membrana (MSPs), MSP1 α , MSP1 β , MSP2, MSP3, MSP4 y MSP5, las cuales cumplen función de adhesina, para así unirse a las células huésped, también

contienen receptores de transferrina (TfR) quienes se encargan de captar el hierro del plasma sanguíneo para que la bacteria se alimente y así poder replicarse; además, se han encontrado citocinas (TNF alfa e interleucinas 1p – 6) que son producto de los lipopolisacáridos (LPS) encargados de la presencia de fiebre en el animal, presenta también un aparato de secreción tipo IV (Vir B) VirB2, VirB4-1, VirB4-2, VirB6-1, VirB7, VirB8-2, VirB9-1, VirB9-2, VirB10, VirB11, y VirD4, los cuales inyectan en la célula huésped las proteínas que se encargarán de dañarla (Rikihisa, 2003; Suttén, *et al.*, 2009; Morse, *et al.*, 2012).

2.1.3. Anaplasmosis

Es una enfermedad que representa uno de los padecimientos más importantes de los rumiantes causando significativas pérdidas económicas en las áreas tropicales y subtropicales del mundo (Inokuma, 2007), además, éste padecimiento es producido por varias especies patógenas de *Anaplasma*, como *A. marginale* que se unen a los eritrocitos de los bovinos (Kocan, *et al.*, 2009; Shebish, *et al.*, 2012; Singh, *et al.*, 2012; Ybanez, *et al.*, 2012) así como también *A. bovis* que se unen a monocitos en sangre de los bovinos, aunque ha sido poco estudiado (Jilantai, *et al.*, 2009; Noaman y Shayan, 2010a), *A. centrale* en glóbulos rojos de los bovinos, sólo que de forma poco patógena (Molad, *et al.*, 2006); mientras que en los glóbulos rojos de los ovinos y caprinos, la especie infecciosa es *A. ovis* (Razmi, *et al.*, 2006; Torina, *et al.*, 2008b; Psaroulaki, *et al.*, 2009) así como también en pequeños rumiantes silvestres (Yabsley, *et al.*, 2005; Yabsley, *et al.*, 2006; de la Fuente, *et al.*, 2006a); en tanto *A. phagocytophilum* se encuentra en granulocitos de equinos y perros (Alberti, *et al.*, 2005), sin embargo, también infecta a animales salvajes y domésticos, así como a los seres humanos (Granquist, *et al.*, 2010) y *A. platys* localizada en las plaquetas de la sangre de los perros (de la Fuente, *et al.*, 2006b; Estrada, *et al.*, 2009). A su vez, la enfermedad presenta 4 estadios: incubación, desarrollo, convalecencia y portador (Stokka, *et al.*, 2000).

A. marginale es la especie más patógena, y en particular, es la única presente en México (Rodríguez, *et al.*, 2000) mientras que *A. centrale* está estrechamente relacionado con *A. marginale*, aunque presentando leves infecciones en el ganado (Carelli, *et al.*, 2008).

2.1.3.1. Signología

A. marginale es el agente etiológico de la anaplasmosis bovina en fase de desarrollo donde la enfermedad se presenta en estadio agudo ó de desarrollo, provocando el síndrome de la especie bovina que se caracteriza primeramente por fiebre (superior a 39.5), seguido de una depresión, anemia hemolítica progresiva asociada con la pérdida de peso, disminución de la producción de leche y carne, debilidad, se aparta de la manada, baja de apetito, estreñimiento, pérdida de peso y dificultad de mantenerse en pie (Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2004; Zivkovic, *et al.*, 2007). La característica sobresaliente de anaplasmosis clínica es la anemia asociada a la fagocitosis de eritrocitos parasitados. La gravedad de los signos clínicos se asocia con el grado de anemia e incluye palidez de la piel y las membranas mucosas, aumento en frecuencia cardiaca y respiratoria, disminuye el hematocrito, los animales se debilitan, presentan anorexia y letargo. Las vacas preñadas pueden abortar, mientras que los toros pueden desarrollar infertilidad temporal (Aubry y Geale, 2011). El ganado con la enfermedad avanzada desarrolla atonía gastrointestinal, estasis del rumen y estreñimiento, que se asocian a la deshidratación y la pérdida de peso; algunos animales pueden experimentar déficit neurológico, que se han atribuido a los episodios de anoxia cerebral. La ictericia generalmente se desarrolla durante el curso de la enfermedad, siendo más frecuente durante la convalecencia temprana. En el período de convalecencia, el ganado que sobrevive a la enfermedad, pierde peso, las vacas cargadas abortan, y la recuperación se da lentamente, de 2 a 3 meses aproximadamente, en tanto, la recuperación es más común en animales jóvenes, las tasas de mortalidad son del 50-60% en adultos, especialmente cuando los animales más viejos están estresados. Cuando la enfermedad esta muy avanzada y el afectado es obligado a moverlo en exceso puede provocarse una muerte por anoxia, mientras que los hallazgos en necropsia por éste padecimiento basándose en los signos clínicos, consisten en anemia severa, ictericia, esplenomegalia y hepatomegalia, así como hemorragias petequiales se observan con frecuencia en las superficies serosas, especialmente sobre el corazón y el pericardio, que también presenta, a menudo, presencia pálida y consistencia flácida del corazón (Coetzee, *et al.*, 2005). El ganado recuperado de una enfermedad aguda sigue siendo portador

persistente con baja parasitemia asintomática y sirven como reservorios para la transmisión del microorganismo (Kocan, *et al.*, 2010).

2.1.4. Ciclo de Vida

Anaplasma spp puede ser transmitido biológicamente por garrapatas y mecánicamente por picadura de dípteros o con instrumentos quirúrgicos contaminados (Carelli, *et al.*, 2007; Kocan, *et al.*, 2009). En la garrapata primeramente la bacteria ingresa en forma reticular, a las membranas celulares del intestino medio (que es el primer sitio de la infección), en donde se divide por fisión binaria y, posteriormente, se transforma la bacteria a forma densa, que es su forma infecciosa, después la infección pasa a las glándulas salivales y otros tejidos, completando el ciclo de desarrollo, lo que permite la transmisión a hospederos susceptibles durante la alimentación de éste vector (Kocan, *et al.*, 2008). Una vez en la sangre del bovino, el microorganismo penetra en los glóbulos rojos por invaginación de la membrana celular formándose una vacuola; ésta se divide para formar un cuerpo de inclusión (conteniendo hasta ocho cuerpos inicialmente unidos entre sí), los cuerpos de inclusión son más numerosos durante la fase aguda de la infección pero algunos persisten durante años (Aubry y Geale, 2011), provocando así el padecimiento denominado anaplasmosis bovina, el cual esta dividido en 4 etapas. La primer etapa de incubación oscila entre 3 – 8 semanas y dura hasta que el 1% de los glóbulos rojos son infectados, la reproducción de la bacteria es lenta, el bovino permanece sano y no muestra señales de estar infectados. En la etapa de desarrollo, que dura de 4 – 9 días, se empiezan a observar los signos clínicos de la anaplasmosis, empieza la destrucción de glóbulos rojos, entre 35 – 50 %. Los bovinos afectados mueren o empiezan la recuperación de 1 a 4 días después de los primeros signos. En esta etapa de convalecencia, existe un aumento de producción de globulos rojos y de niveles de hemoglobina. El ganado bovino de todas las edades es susceptible a la enfermedad, pero la gravedad aumenta conforme la edad, ganado menor a 6 meses raramente presentan signos que demuestren la infección, en cambio en animales de 6 meses a 3 años de edad, es más susceptible y si no se trata la enfermedad, pueden llegar a la muerte. Después de ésta etapa, el ganado que no se haya tratado adecuadamente, queda como

reservorio de ésta enfermedad, la cual estará latente cuando los animales portadores se junten con ganado susceptible (Stokka, *et al.*, 2000).

2.1.5. Vectores y Transmisión

La anaplasmosis puede ser transmitida por insectos hematófagos, horizontalmente por garrapatas de la familia *Ixodidae* incluidas las del género *Rhipicephalus* *Boophilus spp.* y *Dermacentor spp.* Tanto los vacunos y las garrapatas desarrollan infecciones persistentes con *A. marginale* y por lo tanto pueden servir como reservorios de infección (Estrada-Peña, *et al.*, 2006), *R. Boophilus* es el vector más importante de *A. marginale* en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Estrada-Peña, *et al.*, 2009). En Estados Unidos el vector descrito que transmite *A. marginale* es *D. variabilis*, *D. andersoni* y *D. albipictus* (Dumler, *et al.*, 2001; Kocan, *et al.*, 2004). Además de ser vectores para *A. marginale* las garrapatas del género *Rhipicephalus spp.*, y *Dermacentor spp.*, (Estrada-Peña, *et al.*, 2006), lo son para *A. centrale* y *A. ovis*, así como las del género *Ixodes* lo son para *A. phagocytophilum* (Kocan, *et al.*, 2008) y para *A. bovis* las del género *Hyalomma spp* (Noaman y Shayan, 2010a). Otros artrópodos succionadores de sangre también participan en la infección de ésta enfermedad, como lo son, del género *Stomoxys calcitrans* y *Tabanus spp.* (Scoles, *et al.*, 2005; de la Fuente, *et al.*, 2005a; Hornok, *et al.*, 2007).

Se pueden presentar dos mecanismos de transmisión, una es la biológica que se da por la transferencia de sangre infectada por picadura de la garrapata, éste mecanismo se puede representar con el complejo ciclo de desarrollo de *A. marginale*, que se ha descrito y demostrado ser coordinado con el ciclo de la alimentación de la garrapata, y aproximadamente 20 especies de éstas en todo el mundo han sido considerado como vectores de *A. marginale* (Kocan, *et al.*, 2004). La mayoría de los patógenos que son transmitidos por garrapatas tienen la capacidad de persistir en el cuerpo en espera de ser transmitidos a otros hospederos cuando las garrapatas u otros vectores se alimenten con su sangre (Palmer y Brayton, 2007). A diferencia de la transmisión biológica, donde no importa el nivel de rickettsemia, la transmisión mecánica, llevado a cabo por otros artrópodos hematófagos, como moscas succionadoras de sangre, necesitan un alto nivel

de rickettsia durante su alimentación para transmitir *Anaplasma spp.* (Scoles, *et al.*, 2005).

2.2. Distribución e Importancia Económica

En los Estados Unidos, la anaplasmosis es enzoótica, en todo el sur de los estados del Atlántico, en los de la costa del Golfo, y varios de la región central y occidental (Aubry y Geale, 2011). Este incremento y distribución obedece probablemente al transporte de ganado portador hacia zonas libres, dándose su infección tanto de forma mecánica o biológica (Kocan, *et al.*, 2010) identificándose en bovinos y una gran variedad de vida silvestre en Norte América (de la Fuente, *et al.*, 2005b). En Europa, ésta enfermedad es endémica en varios países mediterráneos como Italia (Ceci y Carelli, 1999; de la Fuente, *et al.*, 2005b), Portugal (Caeiro, 1999) y España (de la Fuente, *et al.*, 2004b), en Suiza (Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2004), Hungría (Hornok, *et al.*, 2007), mientras que en regiones de Asia y África, es endémica (Mtshali, *et al.*, 2007; Kocan, *et al.*, 2010). La anaplasmosis es endémica en países como México, Centroamérica y América del Sur así como en las islas del Caribe (Kocan, *et al.*, 2010), así también, es enzoótica en todos los países de América Latina (Guglielmone, 1995).

La importancia de la anaplasmosis recae en que afecta considerablemente en la producción bovina, ya sea mermando la producción de leche y carne, así como muertes de animales altamente productivos e incidencias altas en los hatos, lo que origina que se refleje notablemente en cuestión económica (Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2004; Kocan, *et al.*, 2010; Felsheim, *et al.*, 2010). Las tasas de seroprevalencia de *A. marginale* varían ampliamente entre los países de América, lo que contribuye al desarrollo de la estabilidad geográfica en regiones enzoóticas, por otro lado, en el año 2003, México cerró sus fronteras a la importación de ganado de los Estados Unidos y Canadá, debido a la encefalopatía esponjiforme bovina (Stack, *et al.*, 2004; Nolen, 2004), las novillas de reemplazo lecheras se obtuvieron de Australia, Nueva Zelanda y otros Estados de México, donde la anaplasmosis es conocida por estar presente, pero no es un problema (Villamar y Olivera, 2005). Además, el movimiento de portadores lecheros con *A.*

marginale a los rebaños libres de la anaplasmosis, provocó graves pérdidas (en producción de leche y muerte) en vacas adultas muy susceptibles debido a la transmisión mecánica; con el fin de reducir las pérdidas, la industria láctea de México inició un programa de sacrificio de portadores de *Anaplasma* en hatos donde las vaquillas prospectos fueron compradas con lo que el número de muestras sanguíneas para determinar la presencia de *A. spp*, aumentó desde unos cientos en 2002 a varios miles entre los años de 2004 y 2008 de los Estados de Chihuahua, Guanajuato, Nuevo León, Durango y Coahuila, donde la enfermedad no es conocida por ser un problema (Rodríguez, *et al.*, 2009). El número exacto de anticuerpos de portadores de *Anaplasma* en todo el país se desconoce, los diagnósticos realizados para determinar la presencia de ésta bacteria, han confirmado sin embargo, que la anaplasmosis es endémica, incluso a grandes altitudes o regiones secas donde no hay garrapatas o sólo pequeñas poblaciones de *Rhipicephalus (Boophilus)* o las garrapatas *Dermacentor* están presentes (Rodríguez, *et al.*, 2009), por el contrario, el ganado altamente especializado y susceptible provenientes de zonas de baja endemicidad están sujetos a grandes riesgos cuando se introduce a zonas de alta endemicidad o lugares donde las poblaciones de garrapatas fluctúa. Este ha sido el caso en Soto la Marina, Tamaulipas, el norte de México, donde hasta un 30% ganado susceptible ha muerto en brotes en particular en 2006 (Almazán, *et al.*, 2008).

Teniendo así, que esta enfermedad es considerada una de las causas principales de bajo rendimiento económico del sector ganadero, en el municipio de Culiacán, Sinaloa, junto con la babesiosis y parásitos gastrointestinales, han llegado afectar la productividad hasta de un 46% de la población bovina, provocando pérdidas variables en carne (de 10 a 100 kg por cabeza en pastoreo) y producción de leche con pérdidas alrededor de 20%, así también, costos indirectos asociados a la asesoría veterinaria para establecer un diagnóstico. Por lo general los productores argumentan que su principal objetivo es disminuir los costos de producción, por lo cual deben incrementar la eficiencia tanto productiva como reproductiva de su ganado, pero estas variables se afectan ya que la incidencia de éstas series de enfermedades como la anaplasmosis bovina tiene aspecto limitante en la eficiencia de los ranchos, debido a que en muchos casos la sanidad es deficiente (Enríquez, 2009).

2.3. Diversidad Genética

La relación de la rickettsia, vector y huésped es compleja ya que tiene la interacción con las células endoteliales y eritrocitos (Carreño, *et al.*, 2007). Una serie de proteínas de la rickettsias y el sistema inmunológico de la especie bovina se han estudiado en detalle, sin embargo, no existe una solución final (vacuna o de otro tipo) para controlar esta enfermedad. *A. marginale* es un organismo con alto grado de variación genética, lo que dificulta su control por medio de vacunas (Palmer, *et al.*, 2000), por lo que aún cuando la vacunación es la forma idónea de control para esta enfermedad, hasta el momento no se cuenta con vacunas inactivadas efectivas, sólo en algunos países usan cepas de *A. marginale* de baja virulencia (Bock, *et al.*, 2003); en México sin embargo, no existen vacunas inactivadas efectivas en el mercado (Jiménez, *et al.*, 2008).

2.3.1. Proteínas de la Superficie de la Membrana (MSPs)

En todo el mundo, la diversidad filogenética de cepas de *Anaplasma* en ganado bovino se caracteriza por estudios de las proteínas de la superficie de la membrana (MSPs), MSP1 α , MSP1 β , MSP2, MSP3, MSP4 y MSP5, (Palmer y McGuire, 1984; Tebele, *et al.*, 1991; de la Fuente, *et al.*, 2004c; de la Fuente, *et al.*, 2007), pero sólo tres (MSP1 α , MSP4 y MSP5) están codificados por genes únicos (*m*sp1 α , *m*sp4 y *m*sp5). La MSP1 α y MSP4 se han utilizado para caracterizar la diversidad genética de las especies de *Anaplasma* y los resultados confirman que MSP1 α no es buen marcador para la caracterización geográfica de los aislamientos de *A. marginale*, mientras el uso de MSP4 proporciona información filogeográfica útil (de la Fuente, *et al.*, 2004c). La proteína MSP4, codificada sólo por el gen *m*sp4, se ha estudiado su variación genética en *A. marginale* (de la Fuente, *et al.*, 2001; de la Fuente, *et al.*, 2002; Lew, *et al.*, 2002), en *A. phagocytophilum* (de la Fuente, *et al.*, 2005c; Barbet, *et al.*, 2006) como también esta especie se ha examinado mediante el uso del gen 16S ARNr (Inokuma, *et al.*, 2005).

Las principales proteínas de la superficie de la membrana (MSP1 α , MSP1 β , MSP2, MSP3, MSP4 y MSP5) han sido ampliamente estudiados para *A. marginale* con el fin de tratar de explicar los posibles mecanismos de la persistencia de la rickettsia en la

naturaleza y su transmisión a nuevos huéspedes (Palmer y McGuire, 1984; Rodríguez, *et al.*, 2009).

En una investigación realizada en México, se caracterizaron 4 cepas de *Anaplasma marginale*, procedentes de los estados de México, Morelos, Veracruz y Yucatán, en base a la virulencia, tiempo que tardan en producir signos clínicos y la capacidad para inducir anticuerpos específicos, mismos que se han caracterizado en términos de la secuencia de las proteínas de la superficie de la membrana (MSPs) (García, *et al.*, 2000; Jiménez, *et al.*, 2008). Mientras que Almazan (2008), describió cuatro nuevas cepas de *Anaplasma marginale* en un brote de anaplasmosis bovina en el estado de Tamaulipas, México, caracterizadas éstas por las *MSP1 α* y *MSP4*. Para éste padecimiento en los bovinos, no se han reportado aislamientos de la especie *A. bovis*, ya que los informes del estudio de las MSPs en ésta especie no se han publicado (de la Fuente, *et al.*, 2005b).

2.3.2. Proteínas del Aparato de Secreción Tipo IV (Vir B)

Las bacterias secretan un gran número de proteínas al medio extracelular entre las que incluyen toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas que se requieren en diferentes aspectos del ciclo de vida bacteriano, como por ejemplo, en la biogénesis de organelos, la adquisición de nutrientes y la expresión de factores de virulencia. La secreción de proteínas en bacterias es un área de investigación que ha sido extensamente estudiada dos décadas, a pesar del número, diversidad y la amplia variedad de funciones que desempeñan las proteínas secretadas (proteólisis, hemólisis, citotoxicidad, reacciones de fosforilación, etc.), éstas son traslocadas utilizando un número limitado en mecanismos. Las vías de secreción en las bacterias gram – negativas han sido clasificadas en cinco grupos principales: secreción tipo I, II, III, IV y autotransportadores (González y Dreyfus, 2003). El sistema de secreción tipo IV (SSTIV) es una vía recientemente identificada, homóloga a los sistemas de conjugación y al sistema de las VirB que facilitan la traslocación de ADN, la importancia del estudio de éste sistema en la bacteria *Anaplasma*, recae en que está compuesto por proteínas con características que las hacen atractivas para ser usadas en vacunas contra *A. marginale*, donde éste sistema consiste de 12 componentes denominados VirB1 a VirB11 y VirD4, que transfieren el complejo proteína – ADN en un solo paso desde el citoplasma hasta la célula (Hernández, *et al.*, 2010).

2.4. Diagnóstico

2.4.1. Diagnóstico Clínico

Un diagnóstico de la anaplasmosis bovina puede darse tentativamente según por la ubicación geográfica, temporada, filiación y la presentación de signos clínicos y / o resultados observados de la necropsia animales infectados (Aubry y Geale, 2011). Brotes clínicos se presentan con mayor frecuencia durante las estaciones cálidas y húmedas, cuando la transmisión vectorial es más frecuente. El ganado en las zonas no endémicas pueden infectarse con la anaplasmosis, tras la introducción de un animal portador de un área endémica (Almazán, *et al.*, 2008).

En cuanto a la filiación, la anaplasmosis clínica es más comúnmente encontrada en el ganado vacuno de más de 1 año de edad (Stokka, *et al.*, 2000). Además, se ha encontrado que las vacas portadoras en avanzado estado de gestación y / o la lactancia puede recaer y desarrolla signos de infección aguda (Aubry y Geale, 2011). Estos hechos pueden estar relacionados con la inmunosupresión asociada con la proximidad al parto en las vacas (Kehrli, *et al.*, 1989). Un estudio informó que el ganado en un alto grado de nutrición desarrolló anaplasmosis más graves que los animales mantenidos en un plano de menor nutrición (Ajayi, *et al.*, 1978). También hay informes contradictorios respecto a las diferencias en la susceptibilidad a la infección por *A. marginale* entre el ganado *Bos indicus* (Cebuino) y *Bos taurus* (Europeo), siendo ambos, igualmente susceptibles (Otim, *et al.*, 1980).

2.4.2. Diagnóstico de Laboratorio

Con el fin de confirmar el diagnóstico de la enfermedad, las pruebas de laboratorio tales como la evaluación microscópica de luz por frotis de sangre teñida y procedimientos de diagnóstico serológico/molecular se requieren. Estos últimos son el único medio de identificación de infección persistente, en ganado portador subclínico (Kocan, *et al.*, 2010).

2.4.2.1. Extendido de Frotis Sanguíneo Teñido con la Tinción Giemsa – Wright

El método más común usado para el diagnóstico de bovinos infectados por *Anaplasma* es el examen de microscopía óptica de los frotis de sangre teñidos con Giemsa – Wright, pero cuando se presenta baja parasitemia en el ganado portador es difícil la diferenciación de *Anaplasma* de otras estructuras, por lo que este método no es recomendado para la caracterización de *Anaplasma spp* de los bovinos infectados persistentemente (Carelli, *et al.*, 2007), aún así, presenta la ventaja de fácil demostración de *Anaplasma* en eritrocitos, sin embargo, una de las razones por la que es confiable es para los casos cuando los animales presentan anemia severa (Potgieter y Stoltsz, 1994), así mismo estas inclusiones intraeritrocitaria también puede ser difícil de encontrar en las muestras obtenidas en la necropsia, por lo que *A. marginale* no suelen ser evidentes en los frotis sanguíneos de bovinos persistentemente infectados tras recuperarse de la infección aguda (Kocan, *et al.*, 2010).

2.4.2.2. Pruebas Inmunoenzimáticas Competitiva (cELISA)

ELISA competitivo se ha utilizado para el diagnóstico de la infección por *A. marginale* en los rumiantes, asimismo, de bovinos, ovinos y ciervos (Ndung'u, *et al.*, 1995; Knowles, *et al.*, 1996; de la Fuente, *et al.*, 2004a; de la Fuente, *et al.*, 2004b). Ésta prueba se utiliza actualmente para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina, desarrollado por Knowles *et al.*, (1996), se basa en el uso de un anticuerpo monoclonal (Mab) ANAF16C1 que reconoce MSP5 de *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis* (Visser, *et al.*, 1992). Sin embargo, hallazgos recientes sugieren que esta prueba (ELISA MSP5), disponible comercialmente en VMRD, Inc. (Pullman, WA, EE.UU.), también puede reconocer anticuerpos de *A. phagocytophilum* en el ganado infectado (Dreher, *et al.*, 2005). La secuencia MSP5 está altamente conservada y por lo tanto es similar entre las cepas de *A. marginale*, así como de *A. centrale* y *A. phagocytophilum*. La reactividad cruzada de la prueba MSP5 con múltiples especies de *Anaplasma* se ha confirmado a través de la identificación de regiones definidos como esenciales para reactividad ANAF16C1 (Munodzana, *et al.*, 1998). En consecuencia, el ELISAc MSP5 no diferencia las especies de *Anaplasma* en las regiones geográficas en las que la co-infección con *A. phagocytophilum*, *A. marginale* y *A. centrale* se producen (Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2004; Lin, *et al.*, 2004; de la Fuente,

et al., 2004a). El ELISA basado en MSP5 recombinante para la detección indirecta de anticuerpos de *A. marginale* fue desarrollado por Morzaria y colaboradores (1999) y está disponible comercialmente a través de Svanova Biotech AB (Uppsala, Suecia), pero el ensayo no se ha evaluado en la reactividad cruzada con otras especies de *Anaplasma*.

2.4.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los métodos de diagnóstico basados en el ADN se han desarrollado para identificar las infecciones de *Anaplasma*, entre los métodos utilizados bajo el uso de técnicas moleculares, destaca el de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés polymerase chain reaction), la cual presenta un alto grado de sensibilidad y especificidad (mayor al 99%) para la identificación del gen 16S ARNr del ADN de *Anaplasma spp.*, y se basan en la amplificación de los genes 16S ARNr y el groEL (Molad, *et al.*, 2006).

Ensayos basados en el uso del PCR en el gen 16S ARNr han sido muy valiosos para la detección de *Anaplasma spp.*, por que son bacterias patógenas difíciles de aislar y crecer en el laboratorio, por lo que determina a partir de secuencias de los genes, ha contribuido en gran medida a la diferenciación de las especies en el género *Anaplasma* (Dumler, *et al.*, 2001; Liu, *et al.*, 2005), ya que *A. marginale* es lo suficientemente divergente para ser considerado una especie distinta, pero, teniendo así que las secuencias del gen 16S ARNr de las cepas de *A. marginale*, *A. ovis* y *A. centrale*, a excepción de una cepa japonesa, son casi idénticos ($99 \pm 1\%$ de similitud) (Dumler, *et al.*, 2001).

En algunos trabajos, el ADN extraído de células de la sangre de bovinos ha sido analizada por PCR y PCR-RFLP, método basado en el gen 16S ARNr para la detección específica de *A. marginale* utilizando los oligonucleótidos derivados del gen 16S ARNr y endonucleasa de restricción Bst1107 I (ésta endonucleasa sólo reconoce la secuencia GTATAC), la cual se encuentra en el producto correspondiente de *A. marginale* cuando se amplifican el gen ribosomal 16S por PCR y la enzima lo corta (Noaman y Shayan, 2010b).

2.5. Tratamiento y Control

En cuanto al tratamiento, tenemos que antes del desarrollo de dipropionato de imidocarb, de antimicrobianos y la tetraciclina, una variedad de agentes quimioterapéuticos, incluyendo arsenicales (Arsenio), antipalúdicos, los derivados de antimonio y colorantes, se utilizaban para tratar la anaplasmosis aguda. Estos compuestos tenían poco o ningún efecto quimioterapéutico (Potgieter y Stoltsz, 1994). Dipropionato Imidocarb se ha utilizado durante más de 30 años para tratar la enfermedad en determinados territorios (McHardy y Simpson, 1974), imidocarb se administra al bovino mediante inyección por vía subcutánea o intramuscular profunda a una dosis de 2,1 mg / kg para la actividad aguda de *A. marginale*. Roby y Mazzola (1972) informó de que dos inyecciones de imidocarb, administrado a 5 mg / kg con 14 días de intervalo, elimina a *A. marginale* de animales portadores. La oxitetraciclina es un derivado de la tetraciclina obtenida de *Streptomyces rimosus*, esta droga no elimina la infección de *A. marginale* en la habitual dosis terapéutica recomendada (Kuttler y Simpson, 1978, Stewart *et al.*, 1979), en estudios previos se ha informado de la liquidación con éxito de infecciones persistentes por *A. marginale* en bovinos, utilizando oxitetraciclina por vía intravenosa a 11-22mg/kg de 5-12 días (Magonigle y Newby, 1982; Roby, *et al.*, 1978). Las tetraciclinas son fármacos bacteriostáticos que funcionan mediante la unión a los ribosomas y el ARNm, la inhibición de la síntesis de proteínas está mediada principalmente por medio de unión reversible con la subunidad 30S ribosomal (Scholar y Pratt, 2000), mientras que Coetzee y colaboradores (2005), utilizaron un tratamiento de 5 días de inyecciones de oxitetraciclina administrada por vía intravenosa a 22 mg / kg, el tratamiento no eliminó la infección de *A. marginale* persistente. Actualmente no hay antimicrobianos etiquetados para la eliminación de infecciones persistentes, el movimiento de animales procedentes de zonas endémicas debe ser restringido como medida de precaución para proteger a los animales cuando la enfermedad no es endémica (Almazan, *et al.*, 2008).

Anaplasma marginale es un organismo con alto grado de variación genética, lo que dificulta su control por medio de vacunas (Palmer, *et al.*, 2000), por lo que aún cuando la vacunación es la forma idónea de control para esta enfermedad, hasta el momento no se cuenta con vacunas inactivadas efectivas, y sólo algunos Países usan cepas de *A.*

marginale de baja virulencia (Bock, *et al.*, 2003; Mass, 2005) en México sin embargo, no existen vacunas comerciales para el control de la enfermedad, pero sí, vacunas para el control del vector más importante para la transmisión de la anaplasmosis, es una vacuna cubana que actúa provocando lesiones irreversibles en las garrapatas cuando éstas se alimentan de bovinos vacunados (Rodríguez, *et al.*, 1999), por otra parte, un método de control para ésta enfermedad es el control de vectores, además de la garrapata, otros artrópodos hematófagos, mediante el uso de baños garrapaticidas e insecticidas (Aubry y Geale, 2011)

La enrofloxacin, un antimicrobiano que inhibe la fluoroquinolona DNAgyrase bacteriana (topoisomerasa II) y la topoisomerasa IV que evitan el super enrollamiento del ADN y desencadenación de los cromosomas originales y réplicas (Blondeau, 2004). Este fármaco es eficaz contra las infecciones agudas de *A. marginale* en las tasas de dosis de 50-10 mg / kg (Schroder, *et al.*, 1991; Guglielmone, *et al.*, 1996), sin embargo, en otro estudio, la enrofloxacin administrada dos veces en dosis de 12,5 mg / kg, 48 h de intervalo, fué eficiente para aliviar infecciones graves por *A. marginale* en becerros esplenectomizados, pero se mantuvo la recuperación de bovinos persistentemente infectados (Coetzee y Apley, 2006); un estudio en cultivo de eritrocitos de bovinos "in vitro" se demostró que por citometría de flujo, como un método de ensayo demostró que la enrofloxacin inhibe *A. marginale* en una forma dependiente de la concentración (4µl/ml) (Coetzee, *et al.*, 2006).

Mientras que en otros informes se ha contradicho el éxito de muchos de los protocolos y sugieren que las posibles diferencias de susceptibilidad entre cepas de *A. marginale* puede existir, y la hipótesis de este es compatible con la reciente identificación de dos mezclas de resistencia a múltiples fármacos en el genoma de *A. marginale*, aunque el significado clínico de estas mezclas todavía no se ha dilucidado (Brayton, *et al.*, 2005).

2.6. Antecedentes directos

Respecto a la prevalencia de ésta *Rickettsia*, se han realizado investigaciones con resultados interesantes, como los de Torina y colaboradores en el 2008b, en Sicilia Italia, un área endémica para *Anaplasma spp.*, encontraron en bovinos una prevalencia del 49.1% para *A. spp.*, de éstos se identificó por PCR el 36.3% para *A. marginale*, el 12.7% para *A. ovis* y el 2.9% para *A. phagocytophilum*; por otro lado en otra investigación realizada por Jilintai y colaboradores en el 2009, en un área también endémica, pero en el continente Asiático, se muestrearon bovinos en el país de Japón, detectándose *A. bovis* y *A. phagocytophilum* mediante el uso de PCR una prevalencia del 15% y 1% respectivamente; en otro trabajo realizado en el mismo continente, pero en el país de Irán, Noaman y Shayan, (2010c) compararon la eficiencia en la detección de *A. marginale*, mediante la tinción de Giemsa versus PCR – RFLP, obteniendo un 91.4% y 76.1% de sensibilidad y especificidad respectivamente contra un 100% de especificidad y sensibilidad obtenido por PCR – RFLP, éstos mismos investigadores (Noaman y Shayan, 2010a) en el mismo año y país, realizaron otro ensayo donde se aisló *A. bovis* en muestras sanguíneas de 150 bovinos, y mediante el uso de PCR anidado basado en el gen 16S ARNr, se encontró un 2.66% (4 bovinos) positivos a ésta cepa. En una zona de Centroamérica un área endémica para ésta bacteria, en el País de Costa Rica, se muestrearon 450 bovinos con presencia de signología para *Anaplasmosis*, de los cuales un 60.7% fue positivo a *A. spp* usando la técnica de frotis sanguíneo (Oliveira, *et al.*, 2009). En el mismo continente, pero en América Latina, en la región Centro-Occidental de Venezuela, un área enzoótica para ésta rickettsia, se encontró en bovinos de todas las edades y razas una prevalencia de 57.7% para *A. marginale*, determinándolo mediante el uso de la técnica de Inmunofluoresencia Indirecta (IFI) (James, *et al.*, 1985). En el País de México, se realizó un trabajo en el estado de Veracruz, para conocer sobre la presencia de anaplasmosis bovina, de 368 bovinos estudiados se obtuvo una prevalencia del 69.2% para *A. marginale*, identificada por PCR (Cossio-Bayugar, *et al.*, 1997). Por otro lado, se buscó la presencia de enfermedades hemoparasitarias transmitidas por garrapatas presentes en el ganado bovino, en los municipios de Culiacán y Navolato, pertenecientes al Estado de Sinaloa, en donde se obtuvo una prevalencia del 24% y 42% para *A. marginale*, respectivamente mediante el uso de cELISA (Enríquez, *et al.*, 2009).

III. HIPÓTESIS

Anaplasma marginale y *Anaplasma bovis* identificados por PCR anidado, son las especies de *Anaplasma* presentes en el municipio de Culiacán, Sinaloa.

Objetivos específicos

Identificar la presencia de *Anaplasma* spp. en muestras del municipio de Culiacán, Sinaloa por medio de PCR

Verificar la presencia de *Anaplasma* spp. que afectan a los bovinos en el municipio de Culiacán, Sinaloa por medio de PCR anidado.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar las especies de *Anaplasma* que provocan la Anaplasmosis bovina mediante la técnica molecular del PCR anidado en el municipio de Culiacán, Sinaloa

Objetivos específicos

Identificar la presencia de *Anaplasma spp* en bovinos del municipio de Culiacán Sinaloa por medio de PCR.

Identificar las especies de *Anaplasma* que infectan a los bovinos domésticos del municipio de Culiacán, Sinaloa mediante PCR anidado.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en la Sierra, Valle y Costa de Culiacán, Sinaloa en rebaños de bovinos cooperantes, a los cuales se les extrajo sangre, se transportaron y se procesaron en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa, ubicados en la ciudad de Culiacán, Sinaloa, México; en las coordenadas 24°48' latitud Norte y 107°23' longitud Oeste, con una altura de 60 msnm, temperatura media anual de 24.8°C, con 33.3 y 16.3°C como temperaturas máximas y mínimas promedio, y 44.5 y 1.5° C de temperatura máxima y mínimas extremas; con 144, 159 y 92 días despejados, medio nublados y nublados al año, respectivamente; precipitación pluvial promedio anual de 675mm, con lluvias en verano (julio a septiembre), el clima de la región es tropical seco (BWh y BSh) de acuerdo a la clasificación de Koeppen (INEGI, 2009).

5.1. Muestreo

El muestreo se realizó de manera aleatoria y con distribución aproximadamente normal (Daniel, 2010).

5.2. Criterios de inclusión

Se realizó un muestreo de sangre de bovinos mayores de 1 año de edad, aleatorio simple, en el que se contemplaron manadas con y sin signos de anaplasmosis en el municipio de Culiacán, Sinaloa (Noaman y Shayan, 2010a).

5.2.1. Toma de muestra

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena yugular o coccígea de cada bovino, se colectaron 5 ml con aguja vacutainer en tubos de vidrio al vacío con anticoagulante (EDTA), cada tubo se rotuló con el nombre y/o número de cada animal muestreado (Noaman y Shayan, 2010a).

5.2.2. Transporte de muestras

Las muestras se colocaron en un contenedor a 4°C y fueron transportadas al Laboratorio de Parasitología de la FMVZ/UAS. Las muestras se guardaron a 4°C, hasta su proceso.

5.3. Análisis de muestras

5.3.1. Extracción de ADN

Se obtuvo el ADN a partir de 300 µl de sangre completa de bovino con *Anaplasma*, con el método de Fenol - Cloroformo. Cada muestra de ADN se diluye en agua miliQ, y se observó en un gel de agarosa al 1% con gel red en luz ultravioleta para observar su pureza (Sambrook, *et al.*, 1989).

5.3.2. PCR

Se realizó la mezcla de reacción a 25 microlitros (1.5 mM MgSO₄, 0.2 mM dNTP, 10 microlitros de amortiguador de reacción, 1.25 U de DNA polimerasa, 1 microlitros de ADN, 50 pM de cada oligonucleótido). La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Noes multigene), por 35 ciclos. El proceso se llevó a cabo primeramente precalentando la mezcla por 3 min a 94°C, las temperaturas de desnaturalización es de 94°C por 30 seg, la alineación a 52°C por 45 seg y la extensión a 72°C por 90 seg, con una extensión final de 72°C por 10 min (Jiménez, *et al.*, 2009). Los oligonucleótidos para identificar *Anaplasma spp* se construyeron a partir del gen 16S ARNr. Forward: 5'-GGCTTTTGCCTCTGTGTTGT-3'. Reverse: 5' CTTGACATCATCCCCACCTT-3 (Molad, *et al.*, 2006). El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, observando el tamaño del fragmento amplificado (732 pb) por comparación con marcadores de tamaño 1 Kb DNA ladder, (Sambrook, 1989; Jiménez, *et al.*, 2009).

5.3.2.1. PCR anidado

5.3.2.1.1. *Anaplasma marginale*

La amplificación se realizó con oligonucleótidos internos: F: 5'-CAGAGCATTGACGCACTACC-3' y R: 5-TTCCAGACCTTCCCTAACTA-3'. El PCR anidado se realizó a un volumen de reacción final de 25 µl (1 µl del producto final del PCR, 25 ng de cada oligonucleótido, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 10 µl de amortiguador de reacción, 1.25 U de DNA polimerasa). La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Noes Multigene), por 35 ciclos. El proceso se llevó a cabo precalentando la mezcla por 3 min a 94°C, las temperaturas de desnaturalización son de 94°C por 30 seg, la alineación a 54°C por 30 seg y la extensión a 72°C por 1 min, con una extensión final de 72°C por 10 min (Noaman y Shayan, 2010b).

El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, observando el tamaño del fragmento amplificado (246-bp) por comparación con marcadores de tamaño (1 Kb DNA ladder), (Molad, *et al.*, 2006).

5.3.2.1.2. *Anaplasma bovis*

La amplificación se realizó con el grupo de oligonucleótidos internos: P1 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y P2 5'-AGCACTCATCGTTTACAGCG-3'. El PCR se realizó a un volumen de reacción final de 25 µl (1 µl del producto final del PCR, 25 ng de cada oligonucleótido, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 10 µl de amortiguador de reacción, 1.25 U de DNA polimerasa). La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Noes multigene), por 35 ciclos. El proceso se llevó a cabo primeramente precalentando la mezcla por 3 min a 94°C, las temperaturas de desnaturalización es de 94°C por 30 seg, la alineación a 60°C por 30 seg y la extensión a 72°C por 30 seg, con una extensión final de 72°C por 5 min (Noaman y Shayan, 2010a).

El producto de PCR anidado se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, observando el tamaño del fragmento amplificado (252 bp) por comparación con marcadores de tamaño (1 Kb DNA ladder), (Molad, *et al.*, 2006).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la sangre que se extrajo a bovinos (Fig. 1), se procesaron 120 muestras de las cuales, se obtuvo el ADN (Fig. 2) por el método de Fenol – Cloroformo, debido a que este método presenta una pureza del 1.96% y una concentración de 100 mg/kg (Fraga, *et al.*, 2004). Verificando lo obtenido en éste proceso, donde el ADN presenta un alto grado de pureza ya que no se observa degradación, ARN y proteínas en el gel (Fig. 3).

De los ADN obtenidos, se realizó PCR para la identificación de *A. spp.*; se observaron en gel de agarosa al 1% donde amplificó una banda de 732 pb (Fig. 4), en 50 muestras, lo cual representó el 41.67% de prevalencia del total muestreado, cifra inferior a la reportada por Torina y colaboradores en el 2008b, quienes de 374 muestras de bovinos obtuvieron un 49.1% a esta *Rickettsia* mediante PCR en Sicilia, Italia. Aún cuando trabajaron con el triple de muestras trabajadas en el presente estudio, su prevalencia fue mayor, probablemente se deba a que la zona donde se llevó la investigación es endémica para ésta bacteria y además, esas muestras, fueron obtenidas de bovinos que presentaban signos de anaplasmosis bovina, por el contrario del presente estudio, donde se muestrearon bovinos con y sin signos de ésta enfermedad. Por otra parte, en Centroamérica, en el país de Costa Rica, Oliveira y colaboradores en el 2009, utilizaron la técnica de frotis sanguíneo, y encontraron una prevalencia de 60.7% para *A. spp.*, mayor a la reportada en el presente estudio, esta cifra mayor se pudiera atribuir a que ellos utilizaron una técnica donde pueden obtener falsos positivos, en cambio nosotros utilizamos el PCR que es más específica, además el tamaño de muestra de 28 bovinos, fue muy pequeño respecto al utilizado en la presente investigación, y los bovinos a los que se les obtuvo las muestras, presentaban garrapatas, debido a que se encontraban dentro de una zona que presentaba un brote de hemoparásitos, mientras que el tamaño de muestra del presente estudio fue de casi 7 veces más que la investigación llevada a cabo en Costa Rica y los bovinos muestreados fueron seleccionados al azar y no por presentar ectoparásitos. Mientras que Noaman y Shayan, 2010b, en Irán, obtuvieron un 33.33% de prevalencia mediante el uso del PCR para *Anaplasma spp.*, cifra menor a la reportada en la presente investigación. Este resultado podría explicarse a que la zona donde se llevo a cabo el estudio no es denominada endémica, y aunque trabajaron con

una cifra similar a la del presente estudio, la época donde se llevó a cabo el muestreo, no favorecía a la presencia de ectoparásitos, los cuales son los vectores para ésta bacteria. Por su parte, Aktas y colaboradores en el 2011, trabajaron con 389 muestras de bovinos y encontraron solamente el 9% de prevalencia para *A. spp*, cifra menor a la obtenida en el presente estudio, este resultado se le pudiera atribuir a que se trabajaron con el triple de muestras más que la presente investigación, y a que el área donde se llevo a cabo el experimento, no es endémica para ésta enfermedad y además el clima no favorece a la prescencia de vectores transmisores de *Anaplasma*. En tanto Torina y colaboradores en el 2008a, encontraron una prevalencia mayor a la del presente estudio, siendo de 60% para *A. spp* mediante PCR de 233 bovinos, aún cuando el tamaño de muestra fue mayor a la de la presente investigación, las muestras provenían en una zona endémica y además eran de bovinos con signos clínicos sospechosos de anaplasma. Con esto se demuestra que este hemoparásito se encuentra infectando al bovino en altas prevalencias alrededor del mundo.

Así mismo, de las 50 muestras positivas para *Anaplasma spp*, 48 de ellas (Fig. 6) se identificó *A. marginale* por medio de la amplificación de un gen de 246 pb (Fig. 7), representando 96% de las muestras positivas a *Anaplasma spp* y un 40% de prevalencia del total muestreado, cifra menor a la reportada por Singh y colaboradores en el 2011, quienes de 104 bovinos muestrearon, obtuvieron una prevalencia de 45.2% utilizando la técnica de PCR – anidado, esta cifra pudiera ser mayor, debido probablemente a que se trabajó con un tamaño de muestra menor, además que los bovinos muestreados presentaban signos clínicos relacionados a la anaplasmosis, por otro lado, Torina y colaboradores en el 2008b, identificaron *A. marginale* utilizando la misma técnica molecular del presente estudio, con lo cual obtuvieron una prevalencia de 36.3% cifra similar a la obtenida en la presente investigación, que aunque utilizaron el triple de muestras respecto a éste estudio, en ambos trabajos, los bovinos se encontraban en un ambiente que favorece a una gran prescencia donde los vectores para esta bacteria, mientras que Noaman y Shayan, 2010, identificaron también *A. marginale* en bovinos en Irán, quienes utilizaron un tamaño de muestra similar, el mismo método diagnóstico y en un área denominada endémica para ésta enfermedad, por lo cual, probablemente, fueron estos factores similares en ambos estudios los que arrojaron resultados similares, de

igual forma. En tanto, Singh y colaboradores en el 2012, trabajaron con un tamaño de muestra similar a la del presente estudio e identificaron *A. marginale* mediante la técnica de PCR anidado, obteniendo un 45.2% de prevalencia, cifra similar a la presentada en ésta investigación, este resultado probablemente se deba a que en ambos estudios se utilizaron tamaños de muestras similares y a que en ambos estudios se trabajaron bovinos de manera aleatoria, mientras que en éste mismo País, en México, pero en el estado de Veracruz, Cossio – Bayugar, y colaboradores en 1997, encontraron un 69.2% de prevalencia de *A. marginale* utilizando el PCR, cifra mayor a la reportada en el presente estudio, talvez se deba a que en ese estudio, se trabajó con un tamaño de muestra menor y en un área denominada endémica, por su parte, Enríquez y colaboradores en el 2009, mediante cELISA, identificó esta especie con una prevalencia de 24% y 42% en los municipios de Culiacán y Navolato Sinaloa, cifras menores a las reportadas en el presente estudio, esto se debe, probablemente a que la técnica utilizada en ese estudio, es de menor especificidad y sensibilidad a la utilizada en el presente trabajo. Tenemos que en diversos estudios realizados alrededor del mundo, así como el presente, *A. marginale* representa la principal especie de esta Rickettsia que provoca la anaplasmosis bovina.

Por otra parte, de las 50 muestras positivas para *Anaplasma spp* (Fig. 6), 2 de ellas amplificaron una banda de 252 pb para *A. bovis* (Fig. 8) representando un 4% de prevalencia del total positivo y un 1.67% del total muestreado (Fig. 5), cifra menor a la reportada por Noaman y Shayan, 2010a, quienes encontraron un 2.66% de 150 bovinos muestreado, utilizando la técnica de PCR anidado, esta diferencia, probablemente se deba a que en el país de Irán, a diferencia de México, se ha identificado garrapatas del género *Hyalomma spp*, la cual es el vector principal para ésta especie de *Anaplasma*, mientras que Jilantai y colaboradores en el 2009, de 78 bovinos muestrados, encontraron un 15% de prevalencia para ésta especie utilizando PCR anidado, cifra mayor a la reportada en el presente estudio, probablemente se deba esta diferencia, a que en Japón, al igual que Irán, se ha identificado el género de las garrapatas que son los vectores principales para ésta especie, y que la muestra de bovinos utilizada fue la mitad de la utilizada en el presente estudio, por otra parte Ooshiro y colaboradores en el 2008, encontraron un 53.3% de prevalencia para *A. bovis* utilizando PCR anidado, este

resultado difiere totalmente a lo encontrado en el presente estudio, posiblemente se deba, a que el tamaño de muestra fue muy pequeño, 15 muestras y que en esa región existen reportes de la presencia del principal vector para esta especie de *Anaplasma*, vector que no se ha reportado aún, en Culiacán, Sinaloa, lugar donde se llevo a cabo la presente investigación. No existen muchos reportes sobre esta especie y a diferencia de la *A. marginale*, que se encuentra infectando los glóbulos rojos, *A. bovis* es considerada un anaplasma leucocitario, ya que se encuentra infectando los globulos blancos.

Otra diferencia entre ambas especies es que la infección por *A. marginale* está asociada a la garrapata del género *Boophilus spp*, mientras que *A. bovis* esta relacionada su transmisión por garrapatas del género *Hyalomma spp*.

El daño que provoca esta enfermedad y la alta frecuencia encontrada en el municipio de Culiacán, Sinaloa, nos indica que es un problema de atención en las explotaciones, ya que disminuye en gran medida su producción. Con la ayuda de la Técnica Diagnóstica utilizada, fue posible identificar que especies son las que provocan la anaplasmosis bovina y en que porcentajes y abre un camino para seguir estudiando a fondo estas dos especies en el municipio para tratar de conocerlas y encontrar medidas de control o tratamientos efectivos contra ellas.

VII. CONCLUSIONES

Se identificó mediante PCR anidado *Anaplasma marginale* con una prevalencia del 40% del total muestreado y *Anaplasma bovis* con 1.67%, como las especies de *Anaplasma* presentes en los bovinos de Culiacán, Sinaloa. La técnica del PCR anidado fue fundamental para identificar las especies de ésta bacteria presentes en éste municipio, ya que nunca se habían reportado, solamente la presencia de *A. spp* mediante el frotis sanguíneo.

VIII. ANEXOS

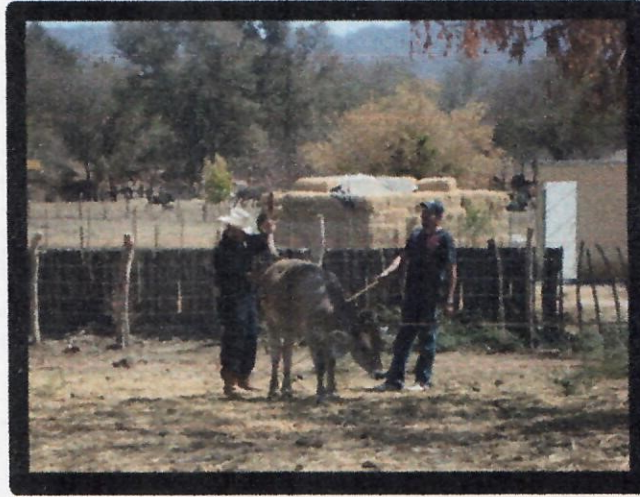


FIGURA 1. Extracción de sangre de un bovino de la vena coccígea.



FIGURA 2. Purificación de ADN

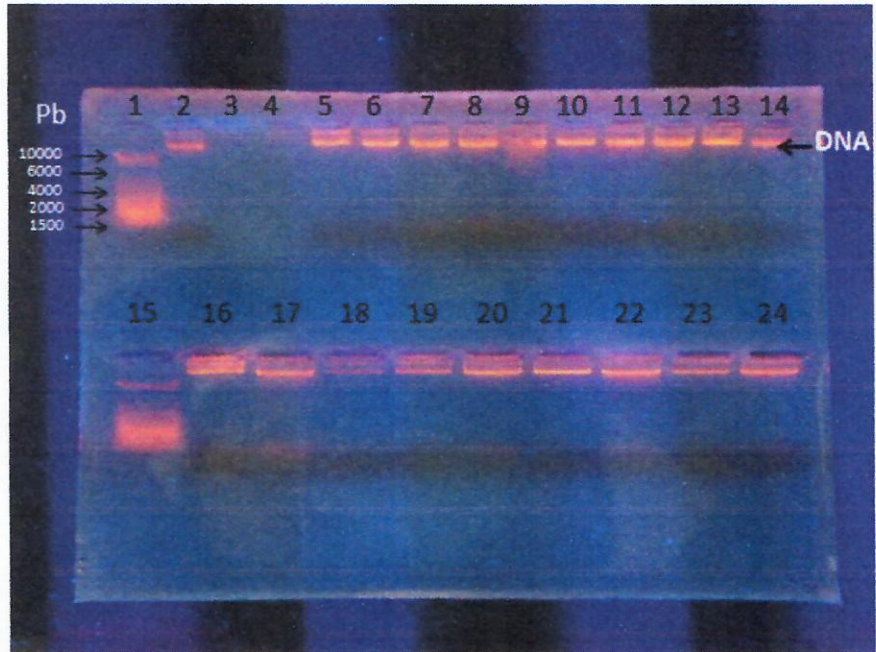


FIGURA 3. Gel de Agarosa al 1%. Carril 1 y 15, marcador de tamaño 1 kb DNA ladder. Carril: 2 – 14 y 16 – 24, DNA de Sandre de Bovino.

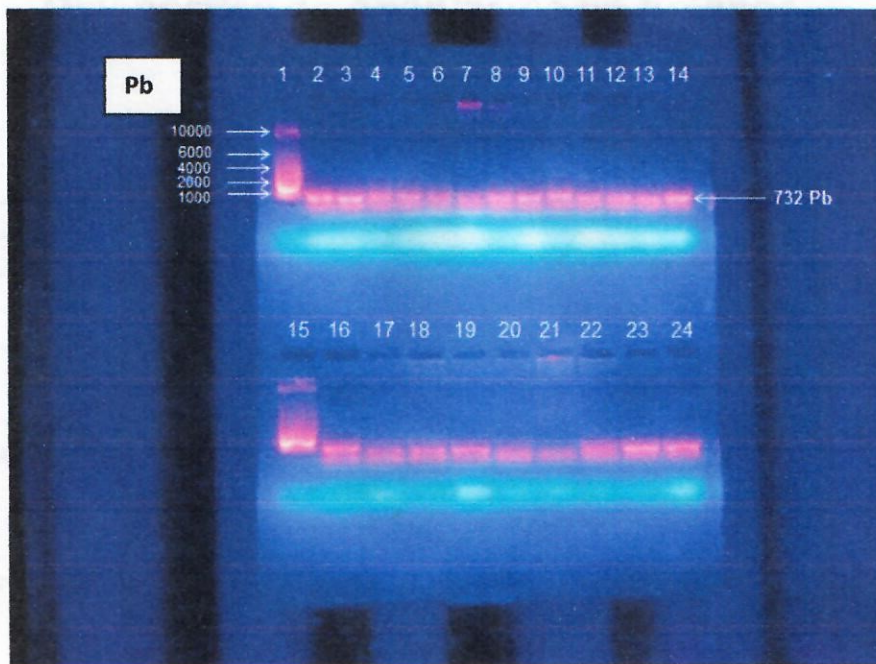


FIGURA 4. Gel de Agarosa al 1%. Carril 1 y 15, marcador de tamaño 1 kb DNA ladder. Carril 2 – 14 y 16 – 24 amplificación del gen 16S RNAr de *A. spp.*

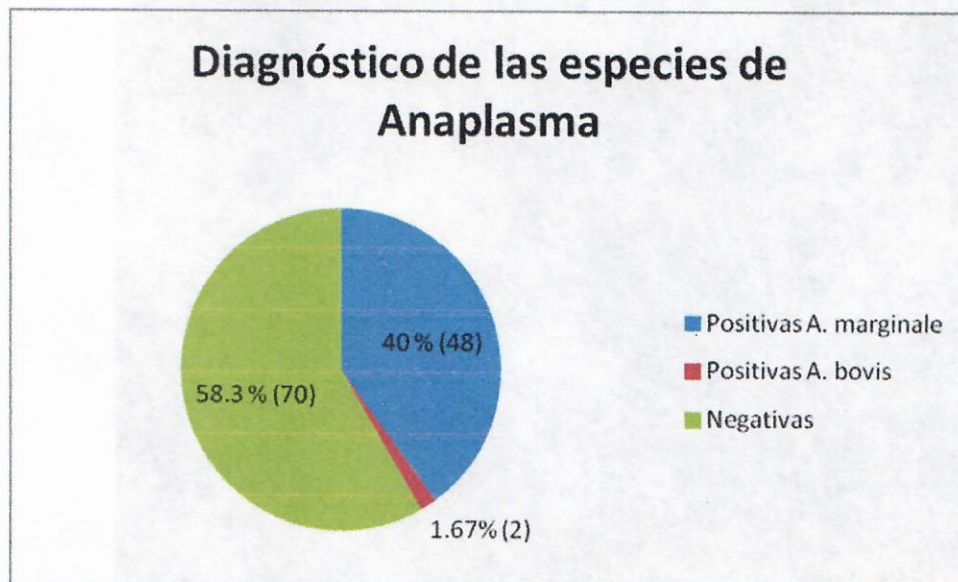


FIGURA 5. Porcentajes del Diagnóstico por PCR anidado de las especies de Anaplasma en Bovinos

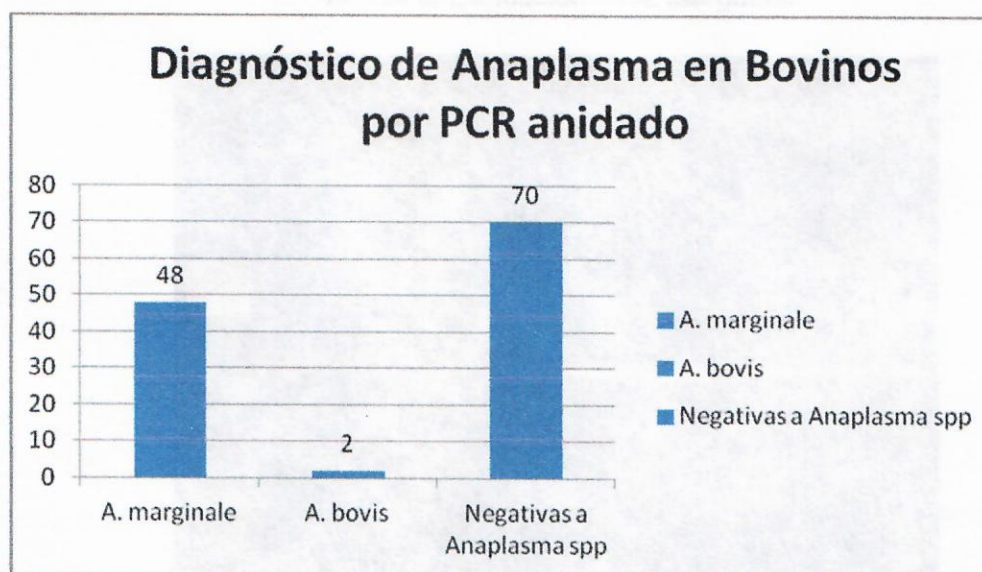


FIGURA 6. Número de Bovinos Diagnosticados por PCR anidado de las especies de Anaplasma en Bovinos.

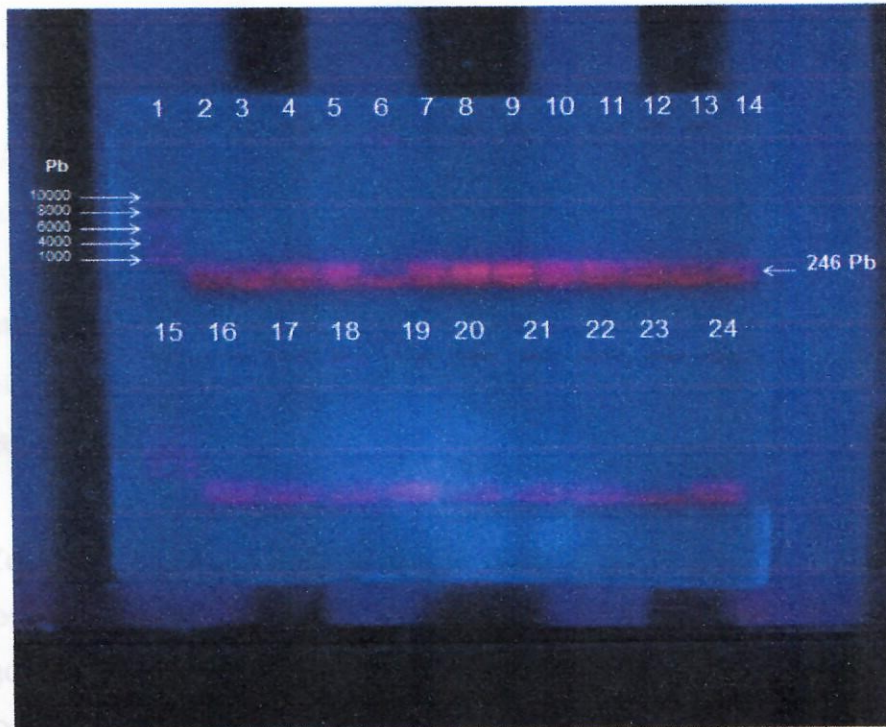


FIGURA 7. Gel de Agarosa al 1%. Carril 1 y 15, marcador de tamaño 1kb DNA ladder. Carril 2 – 14 y 16 – 24 amplificación de *A. marginale*

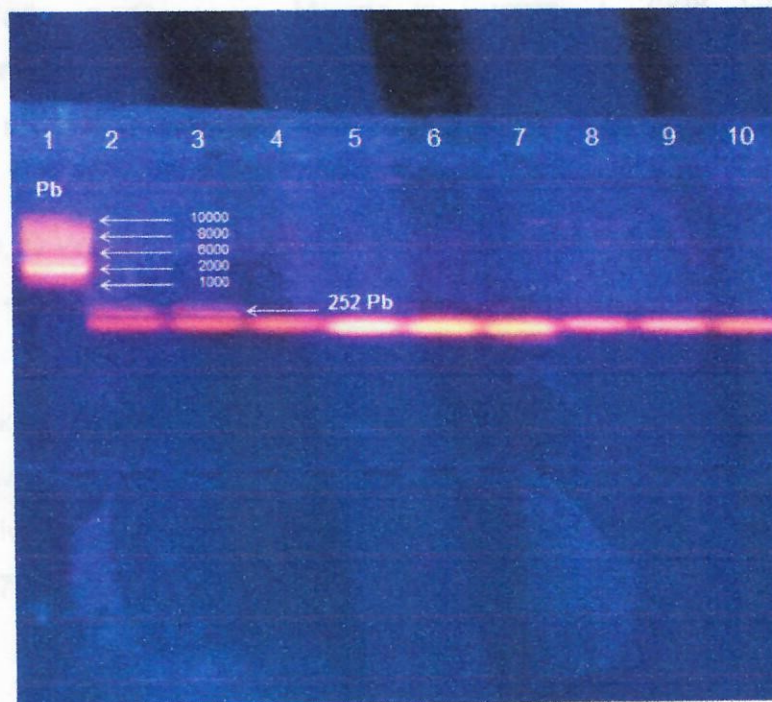


FIGURA 8. Gel de Agarosa al 1%. Carril 1, marcador de tamaño 1 kb DNA ladder. Carril 2 – 10 amplificación de *A. bovis*

IX. LITERATURA CITADA

- Ajayi, S.A., Wilson, A.J., Campbell, R.S.F. 1978. Experimental bovine anaplasmosis: clinico-pathological and nutritional studies. *Res. Vet. Sci.* 25: 76–81.
- Aktas, M., Altay, K., Dumanli, N. 2011. Molecular detection and identification of *Anaplasma* and Ehrlichia species in cattle from Turkey. *Ticks and Tick – borne Diseases.* 2: 62 – 65.
- Alberti, A., Zobba, R., Chessa, B., Addis, M.F., Sparagano, O., Pinna Parpaglia, M.L., Cubeddu, T., Pintori, G., Pittau, M. 2005. Equine and canine *Anaplasma phagocytophilum* strains isolated on the island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States. *Appl Environ Microbiol* 71: 6418-22.
- Almazán, C., Medrano, C., Ortiz, M., de la Fuente, J. 2008. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains from an outbreak of bovine anaplasmosis in an endemic area. *Vet. Parasitol.* 158: 103–109.
- Aubry, P., Geale, D.W. 2011. A review of bovine anaplasmosis. *Transbound Emerg Dis.* 58 (1): 1 – 30.
- Barbet, A.F., Lundgren, A.M., Alleman, A.R., Stuen, S., Bjoersdorff, A., Brown, R.N., Drazenovich, N.L., Foley, J.E. 2006. Structure of the expression site reveals global diversity in MSP2 (P44) variants in *Anaplasma phagocytophilum*. *Infect Immun.* 74: 6429-37.
- Blondeau, J.M. 2004. Fluoroquinolones, mechanism of action, classification and development of resistance. *Survey Ophthalmol.* 49: 73–78.

- Bock, R.E., deVos, A.J., Kingston, T.G., Carter, P.D. 2003. Assessment of a low virulence Australian isolate of *Anaplasma marginale* for pathogenicity, immunogenicity and transmissibility by *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol.* 118: 121-31.
- Brayton, K.A., Kappmeyer, L.S., Herndon, D.R., Dark, M.J., Tibbals, D.L., Pamer, G.H., McGuire, T.C., Knowles Jr., D.P. 2005. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 844–849.
- Caeiro, V. 1999. General review of tick species present in Portugal. *Parassitología.* 41 (1): 11-5.
- Carelli, G., Decaro, N., Lorusso, A., Elia, G., Lorusso, E., Mari, V., Ceci, L., Buonavoglia, C. 2007. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. *Veterinary Microbiology.* 124: 107–104.
- Carelli, G., Decaro, N., Lorusso, E., Paradies, P., Elia, G., Martella, V., Buonavoglia, C., Luigi, C. 2008. First Report of Bovine Anaplasmosis Caused by *Anaplasma centrale* in Europe. *Vet Parasitol.* 1149: 107-10.
- Carreño, A.D., Alleman, A.R., Barbet, A.F., Palmer, G.H., Noh, S.M., Johnson, C.M. 2007. In vivo endothelial cell infection by *Anaplasma marginale*. *Vet. Pathol.* 44: 116–118.
- Ceci, L., Carelli, G. 1999. Tick – borne diseases of livestock in Italy: general review and results of recent studies carried out in the Apulia region. *Parassitologia.* 41 (1): 25 – 9.

- Cossio – Bayugar, R., Rodríguez, S.D., García – Ortiz, M.A., García – Tapia, D., Aboytes – Torres, R. 1997. Bovine anaplasmosis prevalence in northern Veracruz state, Mexico. *Prev vet Med.* 32 (3 – 4): 165 – 70.
- Coetzee, J.F., Apley, M.D., Kocan, K.M., Rurangirwa, F.R., Van Donkersgoed, J. 2005. Comparison of three oxytetracycline regimens for the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infections in beef cattle. *Vet. Parasitol.* 127: 61–73.
- Coetzee, J.F., Apley, M.D. 2006. Efficacy of enrofloxacin against severe experimental *Anaplasma marginale* infections in splenectomized calves. *Vet. Ther.* 7: 319–328.
- Coetzee, J.F., Apley, M.D., Kocan, K.M., Jones, D.E., 2006. Flow cytometric evaluation of selected antimicrobial efficacy for clearance of *Anaplasma marginale* in short-term erythrocyte cultures. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 29: 173–183.
- Daniel, W.W. 2010. *Bioestadística: Bases para el análisis de las ciencias de la salud. Muestreo a partir de poblaciones que no siguen una distribución normal.* 4ª edición. Edit. LIMUSA WILEY. México, D.F. pág: 129 – 130.
- de la Fuente, J., Van Den Bussche, R.A. y Kocan, K.M. 2001. Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). *Vet Parasitol.* 97: 65-76.
- de la Fuente, J., Van Den Bussche, R.A., García-García, J.C., Rodríguez, S.D., García, M.A., Guglielmone, A.A., Mangold, A.J., Friche, P.L.M., Barbosa, R.M.F., Blouin, E.F., Kocan, K.M. 2002. Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. *Vet Microbiol.* 88: 275-85.

- de la Fuente, J., Naranjo, V., Ruiz-Fons, F., Vicente, J., Estrada-Peña, A.N., Almazán, C., Kocan, K.M., Martín, M.P., Gortázar, C. 2004a. Prevalence of tick-borne pathogens in ixodid ticks (Acari: Ixodidae) collected from wild boar (*Sus scrofa*) and Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) in central Spain. *Eur. J. Wildlife Res.* 50: 187–196.
- de la Fuente, J., Vicente, J., Höfle, U., Ruiz-Fons, F., Fernández de Mera, I.G., Van Den Bussche, R.A., Kocan, K.M., Gortázar, C. 2004b. *Anaplasma marginale* infection in free-ranging Iberian red deer in the region of Castilla La Mancha, Spain. *Vet. Microbiol.* 100: 163–173.
- de la Fuente, J., Passos, L.M., Van De Bussche, R.A., Ribeiro, M.F., Facury-Filho, E.J., Kocan, K.M. 2004c. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol.* 121: 307-16.
- de la Fuente, J., Torina, A., Caracappa, S., Tumino, G., Furla, R., Almazan, C., Kocan, K.M. 2005a. Serologic and molecular characterization of *Anaplasma* species infection in farm animals and ticks from Sicily. *Vet Parasitol.* 133: 357-362.
- de la Fuente, J., Lew, A., Lutz, H., Meli, M.L., Hofmann-Lehmann, R., Shkap, V., Molad, T., Mangold, A.J., Almazán, C., Naranjo, V., Gortázar, C., Torina, A., Caracappa, S., García-Pérez, A.L., Barral, M., Oporto, B., Ceci, L., Carelli, G., Blouin, E.F., Kocan, K.M. 2005b. Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. *Anim. Health Res. Rev.* 6: 75–89.
- de la Fuente, J., Massung, R.F., Wong, S.J., Chu, F.K., Lutz, H., Meli, M., Von Loewenich, F.D., Grzeszczuk, A., Torina, A., Caracappa, S., Mangold, A.J., Naranjo, V., Stuenkel, S., Kocan, K.M. 2005c. Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *J Clin Microbiol.* 43: 1309-17.

- de la Fuente, J., Atkinson, M.W., Hogg, J.T., Miller, D.S., Naranjo, V., Almazán, C., Anderson, N., Kocan, K.M. 2006a. Genetic characterization of *Anaplasma ovis* strains from bighorn sheep in Montana. *J Wildl Dis.* 42: 381-5.
- de la Fuente, J., Torina, A., Naranjo, V., Nicosia, S., Alongi, A., La Mantia, F., Kocan, K.M. 2006b. Molecular characterization of *Anaplasma platys* strains from dogs in Sicily, Italy. *BMC Vet Res.* 2: 1 – 24.
- de la Fuente, J., Atkinson, M.W., Naranjo, V., Fernandez de Mera, I.G., Mangold, A.J., Keating, K.A., Kocan, K.M. 2007. Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma ovis* strains. *Vet Microbiol.* 119: 375-381.
- Dreher, U.M., Hofmann-Lehmann, R., Meli, M.L., Regula, G., Cagienard, A.Y., Stärk, K.D.C., Doherr, M.G., Filli, F., Hässig, M., Braun, U., Kocan, K.M., Lutz, H. 2005. Seroprevalence of anaplasmosis among cattle in Switzerland in 1998 and 2003: no evidence of an emerging disease. *Vet Microbiol.* 107: 71 – 9.
- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R. 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51: 2145–2165.

Enríquez, V.I. 2009. Aumente productividad de bovinos con detección oportuna de parásitos. Fundación Produce Sinaloa, A.C. Enlace, Innovación y Progreso. Viernes, 29 de Mayo del 2009. Obtenido el 15 de febrero del 2011 en http://www.fps.org.mx/divulgacion/index.php?option=com_content&view=article&id=403:aumente-productividad-de-bovinos-con-deteccion-oportuna-de-parasitos&catid=37:sinaloa-produce&Itemid=373.

Enríquez, V.I., Sánchez, S.S., Barraza, T.C.L., Castro del C.N., Solís, C.J.D., Gaxiola, C.S.M., Borbolla, I.J.E., Ascencio, A.A., Sicairos, A.S.E., López, P.H., Freer, U.J.J. 2009. Enfermedades hemoparasitarias transmitidas por garrapatas presentes en ganado Bovino, en los municipios de Culiacán y Navolato, Sinaloa. VIII Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria. Mérida, Yucatán, México.

Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J.L., Guglielmone, A., Horak, I., Jongejan, F., Latif, A., Pegram, R., Walker, A.R. 2006. The known distribution ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Exp Appl Acarol.* 38: 219 - 235.

Estrada-Peña, A., Naranjo, V., Acevedo, W.K., Mangolds, 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 Biology.* 7: 1 – 57.

Felsheim, R.F., Chavez, A.S., Palmer, G.H., Crosby, L., Barbet, A.F., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G. 2010. Transformation of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol.* 167: 167-74.

- Fraga, N.J., Rodríguez, J., Fuentes, O., Castex, M., Fernández, C. 2004. Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de tiratomeos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar. *Rev. Cubana med trop.* 56 (3): 2008 – 13.
- García, O.M.A., Aboytes, T.R., Hernández, S.G., Cantó, A.G.J., Rodríguez, C.S.D. 2000. *Anaplasma marginale*: Diferentes grados de virulencia en dos aislados mexicanos. *Vet. Mex.* 31 (2): 157 – 160.
- González, P.B., Dreyfus, G. 2003. Sistemas de Secreción de Proteínas en las Bacterias Gram Negativas: Biogénesis Flagelar y Traslocación de Factores de Virulencia. *Mensaje Bioquímico.* 27: 45 – 63.
- Granquist, E.G., Aleksandersen, M., Bergstrom, K., Dumler, S.J., Torsteinbo, W.O., Stuen, S. 2010. A morphological and molecular study of *Anaplasma phagocytophilum* transmission events at the time of *Ixodes ricinus* tick bite. *Acta Vet Scand.* 52: 43 – 62.
- Guglielmone, A.A. 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.* 57: 109–119.
- Guglielmone, A.A., Anziani, O.S., Mangold, A.J., Volpogni, M.M., Vogel, A. 1996. Enrofloxacin to Control *Anaplasma marginale* Infections. *Ann. NY Acad. Sci.* 791: 471 – 472.

Ández, G.T., Jiménez, O.R., Rojas, R.E.E., Rodríguez, S.D., García, O.M., Preciado, T.J.F., Vega, Murguía, C.A. 2010. IN SILICO CHARACTERIZATION OF VirB8 PROTEIN OF MEXICAN *Anaplasma marginale* ISOLATES. XLVI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Campeche, Campeche. Biotecnología y Biología Celular en Salud animal. Obtenido el 5 de Mayo del 2011 en <http://www.reunionesnacionales.org.mx/2010/documentos/memorias/Pecuaria2010r.pdf>.

ann-Lehmann, R., Meli, M.L., Dreher, U.M., Gonczi, E., Deplazes, P., Braun, U., Engels, M., Schupbach, J., Jorger, K., Thoma, R., Griot, C., Stark, K.D., Willi, B., Schmidt, J., Kocan, K.M., Lutz, H. 2004. Concurrent infections with vector-borne pathogens associated with fatal hemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland. *J Clin Microbiol.* 42: 3775 – 80.

ok, S., Elek, V., de la Fuente, J., Naranjo, V., Farkas, R., Majoros, G., Foldvari, G. 2007. First serological and molecular evidence on the endemicity of *Anaplasma ovis* and *A. marginale* in Hungary. *Vet Microbiol.* 122: 316 – 322.

GI. 2009. Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática, Censo Agrícola Ganadero y Forestal 2007. Obtenido el 3 de febrero del 2011 en <http://mapserver.inegi.org.mx/geografia/espanol/estados/sin/clim.cfm?c=444&e=09>

uma, H., Oyamada, M., Kelly, P.J., Jacobson, L.A., Fournier, P.E., Itamoto, K., Okuda, M., Brouqui, P. 2005. Molecular detection of a new *Anaplasma* species closely related to *Anaplasma phagocytophilum* in canine blood from South Africa. *J Clin Microbiol.* 43: 2934 – 7.

uma H. 2007. Vectors and reservoir hosts of Anaplasmataceae. In: Raoult D, Parola P, eds. *Rickettsial Diseases*. Taylor & Grancis Group LLC, New York; 199 – 212.

- James, M.A., Coronado, A., López, W., Melendez, R., Ristic, M. 1985. Seroepidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Venezuela. *Trop Anim Health Prod.* 17: 9 – 18.
- Jilintai, Seino, N., Hayakawa, D., Suzuki, M., Hata, H., Kondo, S., Matsumoto, K., Yokoyama, N., Inokuma, H. 2009. Molecular survey for *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* infection in cattle in a pastureland where sika deer appear in Hokkaido, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 62: 73 – 5.
- Jiménez, O.R., Rodríguez, C.S.D., Rosario, C.R., Orozco, V.L.E., de la Fuente, J. 2008. *Anaplasma marginale*: Análisis de las secuencias del fragmento variable del gen MSP1 α y del gen msp4 de cuatro nuevas cepas Mexicanas. *Téc Pecu Méx.* 46: 69 – 78.
- Jiménez O.R., Mosqueda G.J.J., Sahagún R.A., Rojas R.E.E., Oviedo O.N., Rodríguez S.D. 2009. ANALISIS "IN SILICO" DE LA PROTEÍNA VIRB9 EN CEPAS MEXICANAS DE ANAPLASMA MARGINALE. VIII Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria Mérida, Yucatán, México. Pág. 100.
- Kehrl, M.E., Nonnecke, B.J., Roth, J.A. 1989. Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *Am. J. Vet. Res.* 50: 207 – 214.
- Knowles, D.P., Torioni de Echaide, S., Palmer, G.H., McGuire, T.C., Stiller, D., McElwain, T.F. 1996. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identified persistently infected cattle. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2225 – 2230.
- 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., Blouin, E.F., Garcia-Garcia, J.C. 2004. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*. 129(Suppl): S285 – 300.
- 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., Zivkovic, Z., Blouin, E.F., Naranjo, V., Almazan, C., Mitra, R., de la Fuente, J. 2009. Silencing of genes involved in *Anaplasma marginale*-tick interactions affects the pathogen developmental cycle in *Dermacentor variabilis*. *BMC Dev Biol*. 9: 1 – 42.
- 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.
- Kuttler, K.L. y Simpson, J.E. 1978. Relative efficacy of two oxytetracycline formulations and doxycycline in the treatment of acute anaplasmosis in splenectomised calves. *Am. J. Vet. Res.* 39: 347 – 349.
- Lew, A.E., Bock, R.E., Minchin, C.M., Masaka, S. 2002. A *msp1alpha* polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. *Vet Microbiol*. 86: 325 – 35.
- Lin, Q., Rikihisa, Y., Massung, R.F., Woldehiwet, Z., Falco, R.C. 2004. Polymorphism and transcription at the p44-1/p44-18 genomic locus in *Anaplasma phagocytophilum* strains from diverse geographic regions. *Infect Immun*. 72: 5575 – 81.

- Liu, Z., Luo, J., Bai, Q., Ma, M., Guan, G., Yin, H. 2005. Amplification of 16S rRNA genes of *Anaplasma* species in China for phylogenetic analysis. *Veterinary Microbiology*. 107: 145 – 148.
- Maas, J. 2005. Buying bulls: protecting your investment and protecting your herd (online). Obtenido el 17 de febrero del 2011 en http://www.vetmed.ucdavis.edu/vetext/INF-BE_cca/INF-BE_cca05/cca050708-BullDisPrv.pdf.
- Magonigle, R.A., Newby, T.J. 1982. Elimination of naturally acquired chronic *Anaplasma marginale* infections with a long-acting oxytetracycline injectable. *Am. J. Vet. Res.* 43: 2170 – 2172.
- McHardy, N., Simpson, R.M. 1974. Imidocarb dipropionate therapy in Kenyan anaplasmosis and babesiosis. *Trop. Anim. Health Prod.* 6: 63 – 70.
- 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. *Veterinary Microbiology*. 113: 55 – 62.
- Morse, K., Norimine, J., Palmer, G.H., Suttén, E.L., Baszler, T.V., Brown, W.C. 2012. Association and Evidence for Linked Recognition of Type IV Secretion System Proteins VirB9 – 1, VirB9 – 2, and VirB10 in *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*. 80 (1): 215 – 227.
- Morzaria, S.P., Katende, J., Musoke, A., Nene, V., Skilton, R., Bishop, R. 1999. Development of sero – diagnostic and molecular tools for the control of important tick – borne pathogens of cattle in Africa. *Parassitologia*. 41 (1): 73 – 80.

- ali, M.S., de la Fuente, J., Ruybal, P., Kocan, K.M., Vicente, J., Mbatia, P.A., Shkap, V., Blouin, E.F., Mohale, N.E., Moloji, N.E., Moloji, T.P., Spickett, A.M., Latif, A.A. 2007. Prevalence and genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains in cattle in South Africa. *Zoonoses Public Health*. 54: 23-30
- nodzana, D., McElwain, T.F., Knowles, D.P., Palmer, G.H. 1998. Conformational dependence of *Anaplasma marginale* major surface protein 5 surface-exposed B-cell epitopes. *Infect. Immun.* 66: 2619–2624
- ung'u, L.W., Aguirre, C., Rurangirwa, F.R., McElwain, T.F., McGuire, T.C., Knowles, D.P., Palmer, G.H., 1995. Detection of *Anaplasma ovis* infection in goats by major surface protein 5 competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 33: 675–679.
- oaman, V., Shayan, P. 2009. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in carrier cattle of Iran. *J. MICROBIOL.* 1 (2): 37 – 42.
- oaman, V., Shayan, P., Narges, A. 2010. Molecular Diagnostic of *Anaplasma marginale* in Carrier Cattle. *Iranian J Parasitol.* 4 (1): 26 – 33.
- oaman, V., Shayan, P. 2010a. Molecular Detection of *Anaplasma bovis* in Cattle from Central Part of Iran. *Veterinary Research Forum.* 1: 117 – 122.
- oaman, V., Shayan, P. 2010b. A new PCR – RFLP method for detection of *Anaplasma marginale* based on 16S rRNA. *Vet Res Commun.* 34: 43 – 50.
- oaman, V., Shayan, P. 2010c. Comparison of Microscopy and PCR – RFLP for detection of *Anaplasma marginale* in carrier cattle. *IRAN J MICROBIOL.* 2: 89 – 94.

- Nolen, R.S. 2004. Washington state dairy cow nation's first case of BSE. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 224: 345 – 346.
- Oliveira, J.B., Hernández-Gamboa, J., Jiménez-Alfaro, C., Zeledon, R., Blandon, M., Urbina, A. 2009. First report of *Trypanosoma vivax* infection in dairy cattle from Costa Rica. *Vet Parasitol.* 163: 136 – 9.
- Ooshiro M., Zakimi S., Matsukawa Y., Katagiri Y., Inokuma H. 2008. Detection of *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* from cattle on Yonaguni Island, Okinawa, Japan. *Veterinary Parasitology.* 154: 360 – 364.
- Otim, C., Wilson, A.J., Campbell, R.S.F. 1980. A comparative study of experimental anaplasmosis in *Bos Indicus* and *Bos Taurus* cattle. *Aust. Vet. J.* 56: 262 – 266.
- Palmer, G.H., McGuire, T.C. 1984. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *J. Immunol.* 133: 1010 – 1015.
- Palmer, G.H., Brow, W.C., Rurangirwa, F.R. 2000. Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Microbes Infec.* 2: 167 – 76.
- Palmer, G.H., Brayton, K.A. 2007. Gene conversion is a convergent strategy for pathogen antigenic variation. *Trends Parasitol.* 23: 408 – 13.
- Potgieter, F.T., Stoltz, W.H. 1994. Anaplasmosis. In: Coetzer, J.A.W., Thompson, G.R., Tustin, R.C. (Eds.), *Infectious Diseases of Livestock- With Special Reference to Southern Africa.* Oxford University Press, Cape Town, South Africa, pp. 408–430.

- Psaroulaki, A., Chochlakis, D., Sandalakis, D., Vranakis, I., Ioannou, I., Tselentis, Y. 2009. Phylogentic analysis of *Anaplasma ovis* strains isolated from sheep and goats using groEL and mps4 genes. *Vet Microbiol.* 138: 3 – 4.
- Razmi, G.R., Dastjerdi, K., Hossieni, H., Naghibi, A., Barati, F., Aslani, M.R., 2006. An epidemiological study on *Anaplasma* infection in cattle, sheep, and goats in Mashhad Suburb, Khorasan Province, Iran. *Ann N Y Acad Sci.* 1078: 479 – 481.
- Reyna-Bello. 1998. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET – ISSN 1695 – 7504.*
- Rikihisa, Y. 2003. Mechanisms to Create a Safe Haven by Members of the Family Anaplasmataceae. *Ann N Y Acad Sci.* 990: 548 – 555.
- Rikihisa, Y. 2006, New findings on members of the family Anaplasmataceae of veterinary importance. *Ann N Y Acad Sci.* 1078: 438 – 445.
- Roby, T.O., Mazzola, V. 1972. Elimination of the carrier state of bovine anaplasmosis with imidocarb. *Am. J. Vet. Res.* 33: 1931 – 1933.
- Roby, T.O., Simpson, J.E., Amerault, T.E. 1978. Elimination of the carrier state of bovine anaplasmosis with a long-acting oxytetracycline. *Am. J. Vet. Res.* 39: 1115 – 1116.

Rodríguez, M., Redondo, M., de la Fuente, J. 1999. Evaluación de la Vacuna contra la Garrapata Bm86 (Gavac) para el control de *Boophilus annulatus*. IV Seminario Internacional de Parasitología Animal. Control de la Resistencia de Garrapatas y Moscas de Importancia Veterinaria y Enfermedades que transmiten. Obtenido el 5 de febrero del 2011 en http://books.google.com.mx/books?id=7egqAAAAYAAJ&pg=PA145&lpg=PA145&dq=cepa+cubana+garrapata+GAVAC&source=bl&ots=1Jvgx32L__&sig=AhqnYLx-JRoczUHYs-grkJCF3cl&hl=es-419&sa=X&ei=qvm1UbbaKqSYiQKK8oCoDw&ved=0CDUQ6AEwAQ#v=onepage&q=cepa%20cubana%20garrapata%20GAVAC&f=false

Rodríguez, S.D., García, O.M.A., Hernández, S.G., Santos, C.N.A., Aboytes, T.R., Canto, A.G.J. 2000. Anaplasma marginale inactivated vaccine: dose titration against a homologous challenge. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 23: 239 – 52.

Rodríguez, S.D., García, O.M.A., Jiménez, O.R., Vega, C.A., Murguía. 2009. Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in México. *Infect Genet Evol.* 9: 1092 – 101.

Rymaszewska, A., Grenda, S. 2008. Bacteria of the genus *Anaplasma* – characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. *Veterinarni Medicina.* 53 (11): 573 – 584.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. En: *Molecular cloning. Laboratory manual.* 2da. edition. Cold spring Harbor laboratory press.

Scholar, E.M., Pratt, W.B. 2000. Bacteriostatic inhibitors of protein synthesis: tetracyclines. In: *The Antimicrobial Drugs*, 2nd ed. Oxford University Press, New York, pp. 184 – 199.

- Schröder, J., Kowollik, K., Van Amelsfoort, A.F. 1991. The effect of enrofloxacin on *Anaplasma marginale* in cattle. In: Proceedings of the 24th World Veterinary Congress, Rio de Janeiro, p. 60.
- Scoles, G.A., Broce, A.B., Lysyk, T.J., Palmer, G.H. 2005. Relative Efficiency of Biological Transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) Compared with Mechanical Transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *J. Med. Entomol.* 42: 668 – 675.
- Shebish, E., Vemulapalli, R., Oseto, C. 2012. Prevalence and molecular detection of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from Puntarenas Province, Costa Rica. *Vet Parasitol.* 188 (1 -2): 164 – 7.
- Singh H., Jyoti, Haque M, Singh N.K., Rath S.S. 2011. Molecular detection of *Anaplasma marginale* infection in carrier cattle. *Ticks and Tick – borne Diseases* 3, 55 – 58.
- Singh, H., Jyoti, Haque, M., Singh, N.K., Rath, S.S. 2012. Molecular detection of *Anaplasma marginale* infection in carrier cattle. *Ticks Tick Borne Dis.* Vol 3. 1. 55 – 8.
- Stack, M.J., Balachandran, A., Chaplin, M., Davis, L., Czup, S., Miller, B. 2004. The first Canadian indigenous case of bovine spongiform encephalopathy (BSE) has molecular characteristics for prion protein that are similar to those of BSE in the United Kingdom but differ from those of chronic wasting disease in captive elk and deer. *Can. Vet. J.* 45: 825 – 830.
- Stokka, G.L., Falkner, R., Van Boening, J. 2000. Anaplasmosis. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service. Obtenido en Enero del 2013 en <http://www.ksre.ksu.edu/bookstore/pubs/MF2212.pdf>

- Stewart, C.G., Immelman, A., Grimbeek, P., Grib, D. 1979. The use of a short and long acting oxytetracycline for the treatment of *Anaplasma marginale* in splenectomized calves. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 50: 83 – 85.
- Sutten, E.L., Norimine, J., Beare, P.A., Heinzen, R.A., López, J.E., Morse, K., Brayton, K.A., Gillespie, J.J., Brown, W.C. 2009. *Anaplasma marginale* Type IV Secretion System Proteins VirB2, VirB7, VirB11, and VirD4 Are Immunogenic Components of a Protective Bacterial Membrane Vaccine. *Infection and Immunity.* 78 (3): 1314 – 1325.
- Tebele, N., McGuire, T.C., Palmer, G.H. 1991. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infect Immun.* 59: 3199 – 204.
- Torina A., Alongi A., Naranjo V., Scimeca S., Nicosia S., Di Marco V., Caracappa S., Kocan K.M., de la Fuente J. 2008a. Characterization of *Anaplasma* Infections in Sicily, Italy. *Ann N Y Acad Sci.* 1149: 90 – 3.
- Torina, A., Alongi, A., Naranjo, V., Estrada-Peña, A., Vicente, J., Scimeca, S., Marino, A.M.F., Salina, F., Caracappa, S., de la Fuente. 2008b. Prevalence and Genotypes of *Anaplasma* Species and Habitat Suitability for Ticks in a Mediterranean Ecosystem. *Appl Environ Microbiol.* 74: 7578 – 84.
- Villamar, A.L., Olivera, C.E. 2005. Situación actual y perspectiva de la producción de leche de bovino en México. 2005. Coordinación General de Ganadería. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 1–39.
- Visser, E.S., McGuire, T.C., Palmer, G.H., Davis, W.C., Shkap, V., Pipano, E., Knowles, D.P. 1992. The *Anaplasma marginale* msp5 gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infect. Immun.* 60: 5139 – 5144.