

Universidad Autónoma de Sinaloa

Colegio en Ciencias Agropecuarias

Maestría en Ciencias Agropecuarias



TESIS:

“Identificación del gen msp4 de Anaplasma ovis de pequeños rumiantes”

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA:

Cesar Noé Badilla Medina

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho

CO-DIRECTORA DE TESIS

Dra. Idalia Enríquez Verdugo

ASESORES

MC. Jaime Eleazar Borbolla Ibarra

MC. Nohemí Castro del Campo

Culiacán, Sinaloa a Agosto del 2015

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **CESAR NOÉ BADILLA MEDINA**, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTORA

DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA
CAMACHO

CO-DIRECTORA

DRA. IDALIA ENRIQUEZ
VERDUGO

ASESOR

MC. JAIME ELEAZAR BORBOLLA
IBARRA

ASESORA

MC.NOHEMÍ CASTRO DEL
CAMPO

CULIACÁN, SINALOA, AGOSTO DEL 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA CULIACÁN
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL FUERTE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL CARRIZO

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 20 de enero del año 2020, el que suscribe Cesar Noé Badilla Medina, alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias, con No. CVU 568674 , de la Unidad Académica Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la UAS, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Idalia Enríquez Verdugo y del Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho y cede los derechos del trabajo titulado “Caracterización genética de *Anaplasma ovis* en ovinos y caprinos de Culiacán Sinaloa”, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Sinaloa, para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales, todo esto en apego al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ATENTAMENTE


Cesar Noé Badilla Medina

CORREO ELECTRÓNICO: cesarnbadilla@gmail.com
CURP: BAMC891230HSLDDDS08

Dedicatorias y Agradecimientos

A mi familia por ser pilar fundamental en mi formación no solo académica si no también en valores y gracias también a ellos por su apoyo y confianza en todo lo necesario para cumplir mis metas como persona, estudiante y profesionista.

También les dedico a mis compañeros de laboratorio que estuvieron en el momento exacto para echarme la mano en lo que se ofreciera se los agradezco mucho.

A mis asesores y directores de tesis a la Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho, a la Dra. Idalia Enriquez Verdugo, al MC. Jaime Eleazar Borbolla Ibarra y ala MC. Nohemí Castro del Campo.

A todo el equipo de parasitología, que a pesar de ayudarme en mi trabajo me brindaron su amistad y son excelentes personas.

A mis compañeros y amigos Alberto Iribé Zazueta, Jorge Luis Miranda Camacho, Rebeca Castro Flores, José Ángel Mariscal Castro, Jesús Daniel Solís Carrasco, Claudia Leonor Barraza Tizoc, Hector Manuel López Pérez y los que me falte mencionar no se me enojen.

Con dedicación especial ala Dra. Idalia Enriquez Verdugo que ha sido fundamental en mi formación académica y personal.

A CONACYT por el apoyo económico otorgado en los ciclos escolares 2013-2014 y 2014-2015.

CONTENIDO

INDICE	PAGINA
INDICE DE FIGURAS.....	i
RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Generalidades de <i>Anaplasma spp.</i>	3
2.1.1. <i>Anaplasma ovis</i>	3
2.1.2. Distribucion de la Anaplasmosis ovina y caprina.....	4
2.1.3. Signología.....	5
2.1.4. Ciclo de Vida.....	6
2.1.5. Vectores y Transmisión.....	7
2.2. Diagnóstico.....	7
2.2.1. Frotis sanguíneos.....	8
2.2.2. Inmunofluoresencia indirecta.....	8
2.2.3. Ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas.....	8
2.2.4. Reacción en cadena de la polimerasa.....	9
2.2.5. PCR en Tiempo Real.....	9
2.3. Epidemiología.....	10
2.4. Proteinas Mayoritarias de Superficie de la Membrana.....	12
2.5. Aspectos Zoonoticos de <i>Anaplasma ovis</i>	12
2.6. Antecedentes Directos.....	13
III. HIPÓTESIS.....	16
IV. OBJETIVOS.....	17
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
VII. CONCLUSIÓN.....	24
VIII. LITERATURA CITADA.....	25

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
Fig. 1. Extracción de ADN.....	21
Fig. 2. PCR de el gen <i>m</i> sp4 de <i>Anaplasma marginale</i> y <i>A. ovis</i>	22
Fig. 3. Amplificaciones de un fragmento del gen <i>m</i> sp4 específicas para <i>Anaplasma marginale</i> y <i>A. ovis</i>	23

RESUMEN

Identificación del gen *msh4* de *Anaplasma ovis* de pequeños rumiantes

Cesar Noe Badilla Medina

Anaplasma ovis son microorganismos patógenos intraeritrocíticos obligados, pertenecen a la familia *Anaplasmataceae*, orden *Rickettsial* y es causante de la Anaplasmosis en ovinos, caprinos, rumiantes silvestres y humanos. El estudio y diagnóstico molecular de la Anaplasmosis en pequeños rumiantes se ha basado en la identificación y caracterización del gen *msh4* que ha proporcionado información filogenética y filogeográfica útil donde se han obtenido diferentes genotipos en diferentes regiones del centro de Europa, la región del mediterráneo y en regiones de Asia como China. El objetivo de este trabajo es identificar el gen *msh4* de *Anaplasma ovis* en ovinos y caprinos. En el presente trabajo se obtuvieron muestras de sangre de ovinos y caprinos en la región de Culiacán Sinaloa, posteriormente se extrajo el ADN por la técnica de fenol-cloroformo, después se realizó la amplificación del gen *msh4* de *A. ovis* por PCR con un tamaño aproximado de 340pb, a partir de muestras de cabras, por lo que *A. ovis* esta presente en la región.

Palabras clave: *Anaplasma ovis*, *msh4*, pequeños rumiantes

ABSTRACT

Identification of gene *msp4* *Anaplasma ovis* in small ruminants

Cesar Noe Badilla Medina

Anaplasma ovis are forced intraerythrocytic pathogens belong to the *Anaplasmataceae* family, order *Rickettsial* and is causing Anaplasmosis in sheep, goats, wild ruminants and humans. The study and molecular diagnosis of anaplasmosis in small ruminants has been based on the identification and characterization of the gene *msp4* has provided useful phylogenetic information and phylogeographic where different genotypes were obtained in different regions of Central Europe, the Mediterranean region and regions of Asia such as China. The aim of this study is to identify the gene *msp4* *Anaplasma ovis* in sheep and goats. In this paper blood samples from sheep and goats in the region of Culiacan Sinaloa, Rear mind the DNA was extracted by phenol-chloroform technique was obtained after amplification of gene *msp4* *A. ovis* by PCR was performed using a approximate size of 340pb, samples from goats, so *A. ovis* is present in the region.

Key words: *Anaplasma ovis*, *msp4*, small ruminants.

I. INTRODUCCIÓN

Anaplasma ovis son microorganismos patógenos intraeritrocíticos obligados, pertenecen a la familia Anaplasmataceae, orden Rickettsiae y es causante de la Anaplasmosis en pequeños rumiantes y rumiantes silvestres (Friedhoff, 1997). La infección es frecuentemente subclínica, pero también puede causar la enfermedad comportándose más grave en las cabras que en las ovejas, que se demostró particularmente en animales estresados o debilitados (de la Fuente *et al.*, 2007). Los signos clínicos de la Anaplasmosis se caracterizan por una anemia severa, fiebre, pérdida de peso, mucosas pálidas, ictericia y la muerte particularmente en animales expuestos a estrés u otro factor predisponente, tales como la desnutrición y la gestación (Bazhad, 2011, Yasini *et al.*, 2012). La transmisión se puede dar de manera biológica por garrapatas y mecánica por insectos hematófagos como piojos y melófagos (Hornok *et al.*, 2010, Hornok *et al.*, 2011) o través de las herramientas de la vacunación, el tatuaje o la castración (Bazhad, 2011). Las especies de gran impacto en la salud animal son *Anaplasma marginale*, *A. ovis*, *A. centrale*, *A. bovis*, *A. platys* y *A. phagocytophilum* esta última con reportes de zoonosis. *A. marginale* y *A. ovis* son los principales patógenos intraeritrocíticos en los bovinos y ovinos también son responsables de la enfermedad en las zonas tropicales y subtropicales (Liu *et al.*, 2012). Las especies de *Anaplasma* poseen proteínas que participan en la interacción en hospederos vertebrados e invertebrados, como las mayoritarias de superficie de la membrana (MSPs). Los genes que las codifican pueden evolucionar rápidamente debido a que están sometidos a presiones selectivas ejercidas por los sistemas inmunes del huésped (de la Fuente *et al.*, 2005b). Estas proteínas han sido útiles en el diagnóstico de la enfermedad, por pruebas serológicas como el caso de las MSP2, MSP3 y MSP5 (Knowles *et al.*, 1996, Palmer *et al.*, 1998). El gen *msp4*, forma parte de la superfamilia de las MSPs, y es utilizado principalmente en la identificación molecular de *Anaplasma ovis* (de la Fuente *et al.*, 2005a). Las secuencias de los genes *msp4* y sus proteínas han demostrado ser útiles para estudios filogenéticos en *A. marginale*, *A. ovis* y *A. phagocytophilum* (Liu *et al.*, 2012, de la Fuente *et al.*, 2006, 2007, Hornok *et al.*, 2007 Psaroulaki *et al.*, 2009).

No obstante la mayoría de los casos de infección por *Anaplasma ovis* confirmados mediante la amplificación del gen *msh4* en ovejas y cabras por PCR se han descrito en las regiones mediterráneas del sur y en la parte central de Europa (Derdakova *et al.*, 2011). Sin embargo La Anaplasmosis en pequeños rumiantes ha sido estudiada poco en México por lo que el objetivo de este trabajo es identificar el gen *msh4* de *Anaplasma ovis* en ovinos y caprinos.

II. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de *Anaplasma* spp.

En los últimos años, existe un creciente interés en bacterias del género *Anaplasma*, especialmente en la especie *A. marginale*, *A. ovis* y *A. phagocytophilum*. Esto debido a la actividad de estas bacterias patógenas en animales de granja, y también, aunque en menor grado, en las personas (Rymaszewska y Grenda, 2008).

La familia *Anaplasmataceae* (orden de *Rickettsiales*) pertenece a alfa-proteobacterias intracelulares, se multiplican dentro de vacuolas unidas a la membrana en el citoplasma de las células eucariotas (Rikihisa, 1991). De acuerdo con la clasificación actual, la familia *Anaplasmataceae* comprende los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* y *Wolbachia*, que incluyen bacterias parasitarias transmitidas por vectores como las garrapatas *ixodidae* (*Anaplasma* spp. y *Ehrlichia* spp.) Helmintos (*Neorickettsia* spp.), así como endosimbiontes de invertebrados (*Wolbachia* spp.) (Dumler *et al.*, 2001).

2.1.1 *Anaplasma ovis*

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 Gram-negativas (Rikihisa, 2006). 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.*, 2006).

Anaplasma ovis es un patógeno rickettsial intraeritrocítico que se encuentra en los ovinos, las cabras, los rumiantes silvestres y al hombre. Esta clasificada en el género *Anaplasma* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) se divide en varias especies, de las cuales se tiene a *A. marginale*, *Anaplasma ovis*, *A. phagocytophilum*, y *A. bovis* que infectan a los rumiantes, y *A. platys*, que infecta a los perros (Ma, *et al.*, 2011) y recientemente se demostró su presencia en infección de bovinos (Dahmani *et al.*, 2015). Morfológicamente, *A. ovis* presenta cuerpos de inclusión, los cuales, observados por microscopía óptica, aparecen oscuros en tinciones azules o purpuras, estos miden de 0.1 μm a 0.3 μm de longitud y se localizan en el eritrocito, del 60 al 65% en los márgenes y del 35% al 40% en los submárgenes o en el centro (Stokka y Falkner, 2000 y Sankale, *et al.*, 1989). Este patógeno es biológicamente transmitido a través de garrapatas (Psaroulaki, *et al.*, 2009) y además puede ser transmitida por piojos chupadores y melófagos sin embargo no se ha definido si es transmisión biológica o mecánica (Hornok, *et al.*, 2010; Hornok, *et al.*, 2011). Anaplasmosis debido a *A. ovis* es la patología más representado en las ovejas y cabras que muestran alta prevalencia serológica y biomolecular 82.9% para ovinos y 74.9% para cabras (Torina y Caracappa, 2012). En ovejas *A. ovis* puede causa síntomas graves, especialmente en los animales en mal estado de salud (Torina *et al.*, 2010).

2.1.2. Distribucion de anaplasmosis ovina y caprina.

La anaplasmosis, causada por *A. ovis*, se distribuye sobre todo en África tropical, pero también se ha reportado en Europa (principalmente en la zona del Mediterráneo) (Woldehiwet, 2007). La infección por *A. ovis* se observa comúnmente como la anemia hemolítica en el ganado ovino y caprino sin embargo en ovejas es normalmente subclínica. Los brotes de enfermedad grave en ovejas son raros y parecen ocurrir sólo bajo condiciones extremas (Stuen, 2013). La Anaplasmosis es una enfermedad transmitida por garrapatas (Torina *et al.*, 2007), *Rhipicephalus bursa* y otras garrapatas en el Viejo Mundo y por *Dermacentor andersoni* en el Nuevo Mundo (Friedhoff, 1997), *A. ovis* es la responsable de la enfermedad en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Liu, *et al.*,

2012). La inoculación experimental de *A. ovis* en el ganado bovino no causa la infección clínica pero la infección de sangre del ganado bovino a los ovinos causa una Anaplasmosis muy severa (Sankale, *et al.*, 1989).

2.1.3. Signología

Esta enfermedad es caracterizada clínicamente por depresión, anorexia, fiebre y anemia progresiva después de la invasión y la replicación del patógeno causal (Ndung'u, *et al.*, 1995), además, pérdida de peso, mucosas pálidas, ictericia y la muerte particularmente en animales expuestos a estrés u otro factor predisponente, tales como la desnutrición y la gestación (Bahzad, 2011). En infección experimental de *A. ovis* en ovinos aparece después del pico de la parasitemia, en la anemia progresiva, en los valores hematológicos como hemoglobina, el recuento de glóbulos rojos y el hematocrito disminuye gradualmente a partir del tercer día y alcanza su nivel más bajo por el día 15 posterior a la infección. La palidez de las mucosas y la anorexia se exhiben durante la fase anémica de la infección, la temperatura corporal por lo general no sufre cambios, aunque se presenta a 41°C en varios animales en el pico de parasitemia. No existe ninguna evidencia de ictericia clínica ni de mucosas anémicas durante los días 12-23 después de la infección. Los valores hematológicos incluyendo el hematocrito, la concentración de hemoglobina y el recuento de eritrocitos en los animales infectados aumentan gradualmente entre los días 18-38 después de la infección. En la enfermedad no hay evidencia de hemólisis intravascular, por lo tanto, la anemia se produce como resultado de la fagocitosis de eritrocitos infectados, para eliminar los parásitos durante el período de aumento de la parasitemia. Se puede producir anemia normocítica normocrómica al comienzo de la infección, durante el desarrollo de la enfermedad y la aparición de reticulocitosis, punteado basófilo y policromasia volumen corpuscular medio (VCM), por lo que se convierte a anemia normocítica macrocítica (Yasini *et al.*, 2012). Los brotes de enfermedades graves en el ganado ovino son raros y parecen ocurrir sólo bajo condiciones extremas, la hemoglobinuria es un signo clínico de Anaplasmosis inusual, ya que la anemia es

resultado de la opsonización y fagocitosis extravascular eritrocitos parasitados de las células reticuloendoteliales, la deficiencia de selenio produce que las membranas de los eritrocitos sean más vulnerables, e induce la regulación negativa de las enzimas que tienen una naturaleza dependiente de selenio y son importantes en el sistema de defensa antioxidante de los eritrocitos, así los dos factores actúan sinérgicamente (Hornok, *et al.*, 2007; Stuen y Longbottom, 2011). En estudios realizados en 2014 el análisis bioquímico de cabras infectadas indica una disminución significativa la elevación de aminotransferasa sérica aspartato, γ -glutamil transferasa, urea, creatinina, bilirrubina total y bilirrubina directa, además de una no significativa aumento de la proteína total, albúmina y los triglicéridos, en comparación con las cabras no infectadas. La concentración de colesterol en las cabras infectadas fue menor que en las cabras no infectadas, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa. El resultado de este estudio indica que la infección de *A. ovis* en cabras podría estar asociado con alteraciones marcadas en los parámetros bioquímicos séricos, que podría ser útil en el diagnóstico de la anaplasmosis caprina (Ahmadi-hamedani *et al.*, 2014).

2.1.4. Ciclo de vida

Estudios experimentales sobre la anaplasmosis ovina, han descrito fundamentos preliminares sobre el progreso de la infección en los ovinos, presentándose el más alto nivel de la parasitemia a los 12 días después de la infección. Primeramente, la parasitemia se desarrolla y alcanza el máximo nivel una o dos semanas después del primer *Anaplasma ovis* detectado por frotis sanguíneo en animales infectados, después la parasitemia empieza a disminuir lentamente entrando a una fase estacionaria, pero los microorganismos se detienen después de 38 días post infección; por último entran a la fase de decaimiento donde el número de microorganismos disminuye en las ovejas, lo cual puede ser debido a la eliminación por fagocitosis de los eritrocitos infectados en la circulación por las células del sistema retículo endotelial (Yasini, *et al.*, 2012). Sin embargo, estos

estudios no describen totalmente el ciclo de *Anaplasma ovis* en ovino y en garrapatas, piojos chupadores y melófagos se desconoce el ciclo completo.

2.1.5. Vectores y transmisión

La transmisión de la Anaplasmosis está dada por vectores que afecta al ganado bovino, ovino, caprino, y otros rumiantes silvestres (Stokka y Falkner, 2000), en los ovinos el agente etiológico de la enfermedad es *Anaplasma ovis* (Ma *et al.*, 2011; Hornok *et al.*, 2007; de la Fuente *et al.*, 2006; Torina *et al.*, 2008). Los vectores como las garrapatas, transmiten la enfermedad, se clasifican dentro de los géneros *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus bursa*, *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor andersoni*, *Dermacentor reticulatus*, estos son de forma natural de tipo biológico (de la Fuente *et al.*, 2006; de la Fuente *et al.*, 2007; Torina *et al.*, 2008; Ndung'u *et al.*, 1995; Hornok *et al.*, 2007), dentro de estos vectores también se han referido que de forma experimental, las garrapatas *Dermacentor nuttalli*, *Hyaloma asiaticum kozlovi* y *Rhipicephalus pumilio* (Ma *et al.*, 2011). Además como otros posibles vectores se han citado insectos portadores de *Anaplasma ovis* como los melófagos (*Melophagus ovinus*), los piojos chupadores tales como los *Linognathus vituli* y la especie *Linognathus stenopsis*, especulando que pueden ser estos insectos vectores biológicos o mecánicos (Hornok *et al.*, 2010; Hornok *et al.*, 2011). La enfermedad en ovinos se transmite también en una variedad de formas mecánicas, por ejemplo a través de las herramientas de la vacunación, el tatuaje o la castración (Bahzad *et al.*, 2011). También se describió que la transmisión de *A. ovis* en el útero se ha registrado en las ovejas y las cabras (Stuen y Longbottom, 2011).

2.2 Diagnóstico

Con el fin de confirmar la enfermedad, se realiza el diagnóstico de laboratorio, como las pruebas de evaluación microscópica de luz por frotis de sangre teñida y procedimientos de ensayos de inmunofluorescencia indirecta, ELISA y el molecular. Estos últimos son el único medio de identificación de infección persistente, en ganado portador subclínico (Kocan *et al.*, 2010; Stuen y Longbottom 2011).

2.2.1 Frotis Sanguíneo

Los microorganismos pueden ser detectados en los eritrocitos por microscopía óptica, la tinción de Giemsa por frotis de sangre es el método tradicional común para su identificación al ser observados con aceite de inmersión bajo el lente de 100X. La presencia de microorganismos de la sangre tales como *Anaplasma spp.*, *Theileria spp.* y *Babesia spp.* se detectan por esta técnica, pero las muestras de sangre son registradas como negativos para todos hemoparásitos si no se observan cuerpos de inclusión en 200 campos (Yasini, *et al.*, 2012). Las muestras positivas se observan fácilmente cuando la enfermedad está en fase aguda, pero no es confiable para detectar animales pre-sintomáticos o portadores (Aubry y Geale, 2010).

2.2.2. Inmunofluorescencia indirecta

La Inmunofluorescencia indirecta se realiza con el uso de lavados con películas finas de sangre de eritrocitos infectados con el aislado de Idaho de *Anaplasma ovis*, marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y se detecta utilizando un anticuerpo anti-IgG de oveja hecho en conejo a una dilución de 1:80 para las muestras de ovinos domésticos. Una muestra se define como positiva si una dilución 1:100 de suero del animal da como resultado una reacción igual o mayor que la reacción del control positivo (Scoles *et al.*, 2008).

2.2.3. Ensayo de inmunodiagnóstico ligado a enzimas (cELISA)

El diagnóstico mediante la prueba de cELISA para Anaplasmosis es utilizada para encontrar anticuerpos en suero de una proteína de superficie (MSP5) de *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis* y *A. phagocytophilum*, siguiendo las instrucciones del fabricante VMRD Inc., Pullman, WA, USA; esta prueba tiene un porcentaje de sensibilidad de 96.5% y de especificidad de 98.1%, los valores del porcentaje de inhibición mayor que 19% se consideran positivos, se podría detectar la seroconversión de ovejas infectadas experimentalmente, ya que sus anticuerpos compiten para los sitios de unión libres con anticuerpos monoclonales presentes

en el sistema de detección del kit de prueba (Scoles *et al.*, 2008; De la Fuente, *et al.*, 2007; Hornok, *et al.*, 2007).

2.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La detección de *A. ovis* también se puede realizar con el uso PCR, La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (siglas por su nombre en inglés Polymerase Chain Reaction), la cual permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento o gen del ADN (ácido desoxirribonucleico). El requisito fundamental para poder llevar a cabo la reacción es disponer de fragmentos cortos de ADN de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar. Estos fragmentos servirán como oligonucleótidos o primers para que una enzima polimerasa sea capaz de incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde. Una vez completada la reacción el fragmento amplificado se visualiza en gel de agarosa por separación de fragmentos de ADN (Pérez de Castro, 2011). de la Fuente *et al.*, 2006, Hornok *et al.*, 2007, Torina *et al.*, 2008 y Psaroulaki *et al.*, 2009 obtuvieron ADN de sangre de ovinos de las cuales realizaron PCR, para la identificación de *A. ovis* por medio de la amplificación de el gen *msp4* con una mezcla de taq polimerasa, dNTPs , oligonucleótidos y cloruro de magnesio la mezcla se coloca en un termociclador a 35 ciclos y el gen amplificado se observa en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio con un tamaño de 852pb. Actualmente existen oligonucleótidos específicos para amplificar una región específica del gen *msp4* de *A. ovis*, el directo AovisMSP4Fw(5'-TGAAGGGAGCGGGGTCATGGG-3') y el inverso AovisMSP4Rev(5'-GAGTAATTGCAGCCAGGGACTCT-3') el cual amplifica a 347 pb (Torina, *et al.*, 2012).

2.2.5. PCR Tiempo Real

PCR en Tiempo Real posee méritos de la rapidez, exactitud, fiabilidad, facilidad de automatización y estandarización. En 2013 se estandarizó un ensayo de PCR en tiempo real fue desarrollado para la detección y cuantificación de *A. ovis*. Los cebadores específicos y la sonda TaqMan se diseñaron basándose en el gen *gltA*.

No se observó reacciones cruzada con *A. marginale*, *A. bovis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia psittaci*, *Mycoplasma mycoides*, *Theileria luwenshuni* y *Babesia* sp. Resultados de sensibilidad analítica revelaron que la PCR en tiempo real puede detectar hasta 10 copias del gen *gltA*. El rendimiento de PCR en tiempo real se evaluó mediante la prueba de 254 muestras de sangre de las cabras y la comparación con los resultados de PCR convencional. Esto demostró que el ensayo de PCR en tiempo real fue significativamente más sensible que la PCR convencional (Chi *et al.*, 2013).

2.3. Epidemiología

En Kenia, en la región del Valle del Rift, en 1989 se determinó una alta prevalencia de 87% de *A. ovis* con ensayos de Southern blots, en cabras atribuyéndole el bajo peso y anemia (Shompole, *et al.*, 1989). En Kenia, en 1995, utilizando la prueba de ELISA detectaron *A. ovis* con la proteína de superficie mayor 5 (MSP5), presentando una alta prevalencia del 94%, debido a que de 127 cabras resultó positivo 119 animales (Ndung'u, *et al.*, 1995). En el 2006, en Montana, Estados Unidos, se identificó a *A. ovis* con una prevalencia del 14% por ELISA y caracterizó la cepa de *A. ovis* que afecta a los borregos cimarrones (*Ovis canadensis*) por el método de PCR al amplificar el gen *msp4* de *Anaplasma ovis*, siendo todas las secuencias genéticamente idénticas a *A. ovis* aislada de borrego en Idaho (de la Fuente, *et al.*, 2006). En Hungría, en 2007, se evidenció la población ovina endémica, se identificó a *Anaplasma spp.* En la región, por pruebas de ELISA mostrando una prevalencia del 99.4% y por PCR se identificó el gen *msp4* de *Anaplasma ovis* donde la secuencia correlaciona en un 100% de las muestras con la cepa aislada en Sicilia, Italia (Hornok, *et al.*, 2007). En el 2008 en Sicilia, Italia, se determinó la prevalencia de *Anaplasma ovis* y su relación con el hábitat de las garrapatas de la región, donde se muestra un 22.1% en ovinos, encontrando que *Rhipicephalus bursa* es el vector que corresponde con la transmisión de la enfermedad (Torina, *et al.*, 2008). En 2011, en Hungría, se evidenció molecularmente *Anaplasma ovis* en melófagos de venados y de ovinos, donde la presencia de el patógeno es del 100% en el artrópodo (Hornok, *et al.*,

2011). En 2011, en China se realizó un estudio molecular donde se detectó a *A. ovis* en 46.6% en ovinos (Ma, *et al.*, 2011). Derdakova *et al.*, (2011) analizaron la prevalencia y la variabilidad genética de *Anaplasma phagocytophilum* y *Anaplasma ovis* en los pequeños rumiantes y garrapatas de seis sitios diferentes de Eslovaquia y de República Checa con la técnica de PCR amplificando el gen *msp4* seguido por el análisis de la secuencia. En dos granjas del sureste de Eslovaquia, se obtuvo 66,1% de *A. ovis* en pequeños rumiantes. Representado por dos genotipos diferentes. *A. phagocytophilum* presente en todos los rebaños analizados con la prevalencia de la infección que van desde 0,9% a 5,7%. (Derdakova *et al.*, 2011). En Hungría en 2012, *Anaplasma ovis* es detectada en garrapatas del género *Dermacentor reticulatus* (Hornok *et al.*, 2012). En la región del centro y sur de China se obtuvo una prevalencia de 15.3% de *Anaplasma ovis* utilizando PCR amplificando los genes *msp4* y 16S ARN y en los análisis de las secuencias obtuvieron cuatro genotipos distintos a los ya reportados en Europa y Norte América (Liu *et al.*, 2012). En Senegal, se hizo por primera vez un estudio para determinar las especies de *Anaplasma* que infectan al ganado ovino donde *Anaplasma phagocytophilum* y *Anaplasma ovis* fueron detectadas y una especie no determinada muy similar a *A. platys* esto se comprobó con estudios filogenéticos utilizando los genes *groEL* y 16S ARN (Djiba *et al.*, 2013). Renneker *et al.*, 2013 realizaron un estudio de PCR basada en el gen que codifica para la proteína de principal de superficie 4 se examinaron muestras de campo recogidas de ovejas en diferentes países; en total, 1161 muestras de sangre de Turquía (n = 830), Iraq (n = 195), Sudán (n = 96) y Portugal (n = 40) fueron examinados, de los cuales 31,4%, 66,6% 41,6% y 82,5%, respectivamente, fueron positivos, esto indica una alta prevalencia de *A. ovis* en los países objeto de la investigación, y se puede suponer que la situación en otras partes del mundo podría ser similar. Por lo tanto, *A. ovis* debe considerarse como una limitación importante de la producción ganadera, y se necesitan más esfuerzos para comprender mejor la epidemiología y la implementación de medidas de control adecuadas.

2.4. Proteínas Mayoritarias de Superficie de la Membrana

Las especies de *Anaplasma* poseen proteínas que participan en la interacción en hospederos vertebrados e invertebrados, como las mayoritarias de superficie de la membrana (MSPs). Existen seis proteínas denominadas MSP1 α , MSP1 β , MSP2, MSP3, MSP4 y MSP5, y los genes que las codifican pueden evolucionar rápidamente debido a que están sometidos a presiones selectivas ejercidas por los sistemas inmunes del huésped (de la Fuente *et al.*, 2005b). El estudio de estas proteínas y sus genes han sido útiles en la identificación, medición de la diversidad filogenética de las cepas de *Anaplasma*, también el uso de estas proteínas se utilizan en el diagnóstico por pruebas serológicas como el caso de las MSP2, MSP3 y MSP5 (Knowles *et al.*, 1996, Palmer *et al.*, 1998). 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.*, 2005c). El gen *msp4*, forma parte de la súperfamilia de las MSPs, utilizado principalmente en la identificación molecular de *Anaplasma ovis* (de la Fuente *et al.*, 2005b). Las secuencias de los genes *msp4* y sus proteínas han demostrado ser útiles para estudios filogenéticos en *A. marginale*, *A. ovis* y *A. phagocytophilum* (Liu *et al.*, 2012, de la Fuente *et al.*, 2006, 2007, Hornok *et al.*, 2007 Psaroulaki *et al.*, 2009).

2.5. Aspectos Zoonóticos de *Anaplasma ovis*.

El primer caso reportado de una variante zoonótica de *Anaplasma ovis* se reportó en una mujer de 27 años la presentó fiebre alta, estuvo tratada con cefalosporinas y antipiréticos, resultó negativa en serología a *Cytomegalovirus*, virus *Epstein-Barr*, hepatitis, VIH, *Mycoplasma*, virus *Coxsackie*, adenovirus, parvovirus, *Coxiella burnetii*, *R. conorii*, y *R. typhi*, y positiva por PCR al gen 16sRNAr de *Anaplasma* spp. y al gen *msp4* de *Anaplasma ovis* esto se reportó en Chipre (Chochlakis *et al.*, 2010). En el 2015 en la provincia de Heilongjiang China se tomaron 477 muestras de pacientes con antecedente de picadura de garrapata, donde 28 de los pacientes desarrollaron manifestaciones febriles no específicos, incluyendo

fiebre en 23 (82%), dolor de cabeza en 14 (50%), malestar general en 13 (46%), mareo en nueve (32%), mialgia en cuatro (14%) y escalofríos en cuatro (14%). Además, diez (36%) de 28 pacientes tuvieron sarpullido o escaras, ocho (29%) tenían adenopatías, ocho (29%) tenían síntomas gastrointestinales, y tres (11%) tenían rigidez en el cuello. Cinco pacientes fueron ingresados en el hospital a causa de una enfermedad grave. Seis (35%) de 17 pacientes con tenía concentraciones de aminotransferasas hepáticas elevadas. A estos individuos se les realizó una prueba de PCR para amplificar los siguientes genes de *Anaplasma*, *gltA*, *groEL*, *msp2* y *msp4* donde los estudios filogenéticos realizados posteriormente arrojaron que eran distintas las secuencias a las especies de *Anaplasma* conocidas nombrando provisionalmente a este patógeno como “*Anaplasma capra*” (Li *et al.*, 2015).

2.6. Antecedentes directos

El gen *msp4* es de gran ayuda en el diagnóstico y caracterización de *Anaplasma ovis* con el que se han realizado diversas investigaciones. En Sicilia Italia en el 2005 se hizo una caracterización genética de las especies de *Anaplasma* utilizando el gen *msp4* donde las secuencias analizadas no presentaban 100 de homología con el aislado de Idaho cepa de referencia y las seis muestras analizadas presentaron una mutación en la posición 366 donde se presentó un polimorfismo intercambiando T x C, respectivamente con la sepa de referencia (de la Fuente., *et al* 2005a). En 2006 se realizó un estudio de caracterización genética de el gen *msp4* de *Anaplasma ovis* en borrego cimarrón donde este genotipo encontrado resultó idéntico al aislado de *A. ovis* previamente reportado en Idaho (de la Fuente., *et al* 2006). En 2007 se publicó un análisis de secuenciación de el gen *msp4* de cepas *Anaplasma ovis* obtenidas de borrego cimarrón (*Ovis canadienses*) y venado bura (*Odocoileus hemionus*) donde se compararon con las secuencias ya antes descritas por de la Fuente *et al.*, 2005, de la Fuente *et al.*, 2006 y la cepa de referencia de Idaho EUA, demostrando que los genotipos de *msp4* pueden variar entre regiones geográficas. Estos resultados también sugieren que los genotipos de *A. ovis* de *msp4* pueden variar entre ovejas y

ciervos hospederos, aunque en esas diferencias no se pudo demostrar con certeza debido a que las poblaciones de ovejas y ciervos estudiados estaban muy separadas geográficamente. (de la Fuente *et al.*, 2007). En Hungría en 2007 se demostró que es una zona endémica de *Anaplasma ovis* y *Anaplasma marginale* en ovinos y bovinos donde también se caracterizó genéticamente el gen *msp4* demostrando variabilidad genética (Hornok *et al.*, 2007). En Sicilia Italia en 2008, se hizo una caracterización genética de *msp4* presentando el genotipo más abundante, AOI, en el ganado ovino y caprino, en las dos regiones del este y del oeste, encontrando una secuencia idéntica previamente identificada en el ganado ovino en la región occidental (AY702923 [de la Fuente *et al.*, 2005a]). El AOII genotipo se encuentra en cabras en sólo la región oriental. AOI y AOII difieren en un único nucleótido (C frente a T en la posición 366 en AOII) (Torina *et al.*, 2008). en 2009, en la isla de Chipre, se realizó un estudio donde se utilizaron los genes *msp4* y *groEL* para identificar la especie de *Anaplasma* que en un estudio anterior no coincidía con las secuencias de *A.phagocytophilum* resultando en este estudio que las secuencias presentaban homología con *Anaplasma ovis*. (Psaroulaki, *et al.*, 2009). En 2010, en la isla de Chipre, *Anaplasma ovis* se convirtió en un agente zoonótico potencial desde el primer caso humano documentado que se informó recientemente en una mujer, el análisis de secuenciación se obtuvieron homologías con *Anaplasma ovis*. (Chochlakis *et al.*, 2010). En Sicilia Italia en 2010, se obtuvo una prevalencia de 37% de *A. ovis* y 11.5% de *A.phagocytophilum*, por medio de la amplificación de el gen *msp4* donde sugieren que las ovejas con mal estado de salud son más susceptibles a infecciones múltiples por *Anaplasma*, y pueden conducir a la mayor diversidad genética en las cepas de *A. ovis*, lo que resulta en un mayor riesgo para la salud animal (Torina *et al.*, 2010). Derdáková *et al.*, 2011 realizaron un estudio de *anaplasma ovis* en los pequeños rumiantes y garrapatas de seis sitios diferentes en Eslovaquia y la República Checa, mediante PCR del gen *msp4* seguido por el análisis de la secuencia. En dos granjas del sureste de Eslovaquia se encontró el 66,1% de pequeños rumiantes se infectaron con *A.ovis*, representado por dos genotipos que difieren en sustitución C / T en la posición 470. (Derdáková *et al* 2011).

Renneker *et al.*, 2013 realizaron un estudio, de PCR basada en el gen que codifica para la proteína de superficie mayoritaria 4 de ovejas en diferentes países, en total, 1161 muestras de sangre de Turquía (n = 830), Iraq (n = 195), Sudán (n = 96) y Portugal (n = 40) fueron examinados, de los cuales el 31,4%, 66,6% y 41,6% 82,5%, respectivamente, fueron positivos. Esto indica una alta prevalencia de *A. ovis* en los países objeto de investigación, y se puede suponer que la situación en otras partes del mundo podría ser similar. Así, *A. ovis* debe considerarse como una limitación importante de la producción ganadera, y se necesitan más esfuerzos para comprender mejor la epidemiología y la implementación de medidas de control adecuadas (Renneker *et al.*, 2013). La infección en los animales es considerada una limitación importante en la producción ganadera (Lee *et al.*, 2015).

III. HIPÓTESIS

Anaplasma ovis se encuentra en pequeños rumiantes de Culiacán, Sinaloa.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar el gen *msp4* de *Anaplasma ovis* en ovinos y caprinos.

Objetivos específicos

Identificar el gen *msp4* de *Anaplasma ovis* en ovinos.

Identificar el gen *msp4* de *Anaplasma ovis* en caprinos.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en rebaños de ovinos y caprinos pertenecientes a Culiacán, Sinaloa, 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 tamaño de la muestra se determinó mediante “selección intencionada o muestreo por conveniencia” (Thursfield, 1990).

5.2. Criterios de inclusión

Se realizó un muestreo de sangre de ovinos y caprinos mayores de 1 año de edad, en el que se contemplaron rebaños sospechosos a Anaplasmosis con y sin signos en el municipio de Culiacán, Sinaloa.

5.2.1. Toma de muestra

Se obtuvieron muestras de sangre completa de ovinos y caprinos por punción de la vena yugular en tubos al vacío de 4 ml con anticoagulante EDTA, cada tubo se rotuló con el nombre y/o número de cada animal muestreado.

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 uso.

5.3. Análisis de muestras

5.3.1. Extracción de ADN

El ADN se extrajo por medio de la técnica fenol-cloroformo, utilizando 300 µl de sangre completa de ovino y caprino, se agregó amortiguador de lisis (TE: tris 100mM y EDTA 10mM), dodecilsulfato de sodio (SDS) al 20%, se incubó a 37°C con calor seco y a 56°C a calor húmedo por una hora respectivamente. Se agregó fenol (1:1), se centrifugó por dos minutos a 12,000 RPM, se obtuvo el sobrenadante y se añade cloroformo (1:1), se centrifugó por dos minutos a 12,000 RPM se obtuvo el sobrenadante y se agregó etanol, se congeló a -20°C. Se centrifugó por 20 minutos, a 12,000 RPM y se decantó. A la pastilla obtenida se le agregó 50 µl de agua inyectable estéril. El ADN se observó en un gel de agarosa al 1% teñido con gel red con luz ultravioleta (Sambrook, *et al.*, 1989).

5.3.2. PCR

El material genético extraído formó parte de una mezcla de reacción para PCR a 25 µl (Buffer 10X MgCl₂, dNTPs, H₂O inyectable estéril, Taq Polimerasa, oligonucleótidos y DNA), La reacción se llevó a cabo en un termociclador (BIORAD T100) para la amplificación del gen *msp4* de *A. ovis*, por 35 ciclos, la temperatura de desnaturalización se utilizó a 94°C por 30 segundos, la alineación a 60°C por 30 segundos y la extensión a 68°C por 30 segundos, con una extensión final de 70°C por 10 min. Con los oligonucleótidos: *msp43*: 5'-GGGAGCTCCTATGAATTACAGAGAATTGTTTAC-3' y *msp45*: 5'-CCGGATCCTTAGCTGAACAGGAATCTTGC-3' (de la Fuente *et al.*, 2006).

Además se utilizaron un par de oligonucleótidos específicos para *A. ovis* el cebador directo AovisMSP4Fw (5'-TGAAGGGAGCGGGGTCATGGG-3') y el inverso AovisMSP4Rev (5' -GAGTAATTGCAGCCAGGGACTCT-3') *A. marginale* compuesto por el cebador directo AmargMSP4Fw (5' -CTGAAGGGGGAGTAATGGG-3') y el inverso AmargMSP4Rev (5'-GGTAATAGCTGCCAGAGATTCC-3'). (Torina *et al.*, 2012).

5.3.3 Revelado de PCR.

Los productos de PCR se revelaron en geles de agarosa al 1% teñido con Gel Red y se visualizaron en un transluminador ultravioleta.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Extracción de ADN a partir de muestras de sangre de ovinos y caprinos seleccionados.

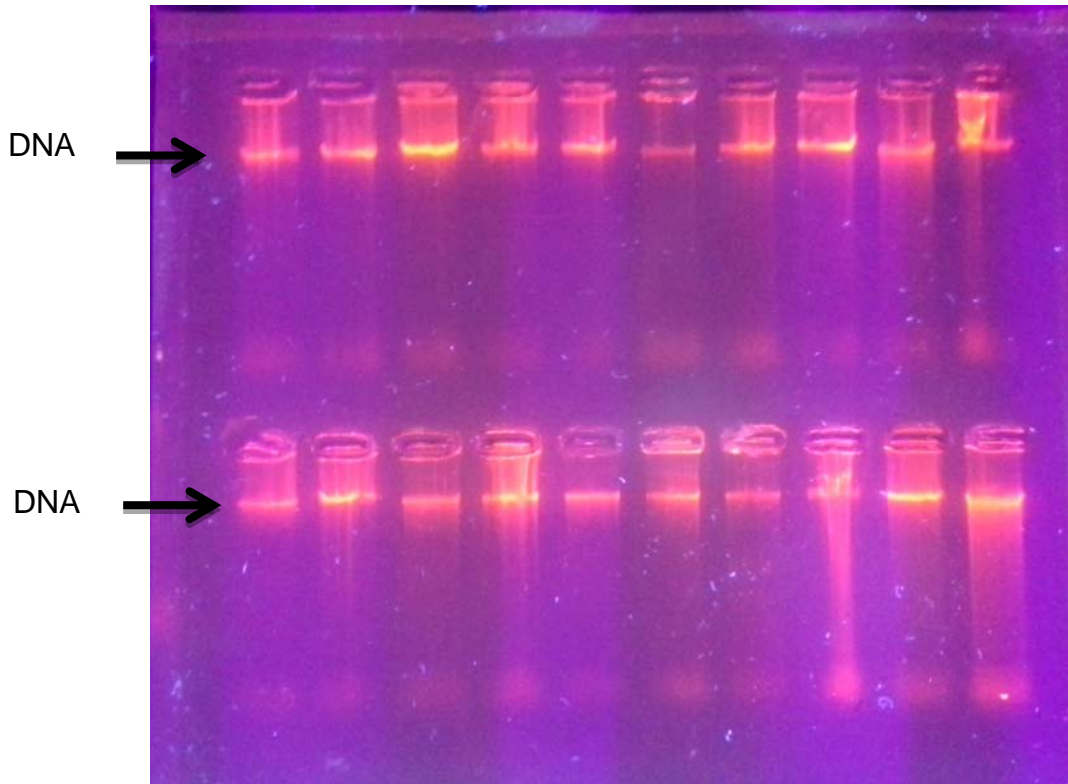


Fig 1. Extracción de ADN. En la parte superior se observa las extracciones de ADN procedentes de sangre de ovinos y en la parte inferior las procedentes de sangre de caprinos.

Las extracciones de ADN son representativas y se obtuvieron 256 muestras de con el método fenol cloroformo, como se observa en la fig. 1 Se obtuvo ADN integro y puro, en los trabajos donde se ha realizado la amplificación de *Anaplasma ovis* de la Fuente *et al.*, 2006; de la Fuente *et al.*, 2007; Hornok *et al.*, 2007; Torina *et al.*, 2008; Psaroulaki *et al.*, 2009; Derdáková *et al.*, 2011; Renneker *et al.*, 2013; utilizaron kits comerciales para la extracción y purificación de ADN y se obtuvieron resultados muy parecidos.

6.2 PCR de el gen *msp4* de *Anaplasma marginale* y *A.ovis*.

Se amplificó *msp4* de una muestra positiva a *A. marginale* a 852pb sin embargo no se observa en ADN de de sangre de ovinos y caprinos como se observa en la fig.2 lo que indica que es un oligonucleótido que amplifica a *msp4* no especifica para *A.ovis*, como menciona de la Fuente *et al.*, 2005a; detecta *msp4* de las especies de *Anaplasma*, lo cual concuerda con nuestros resultados.

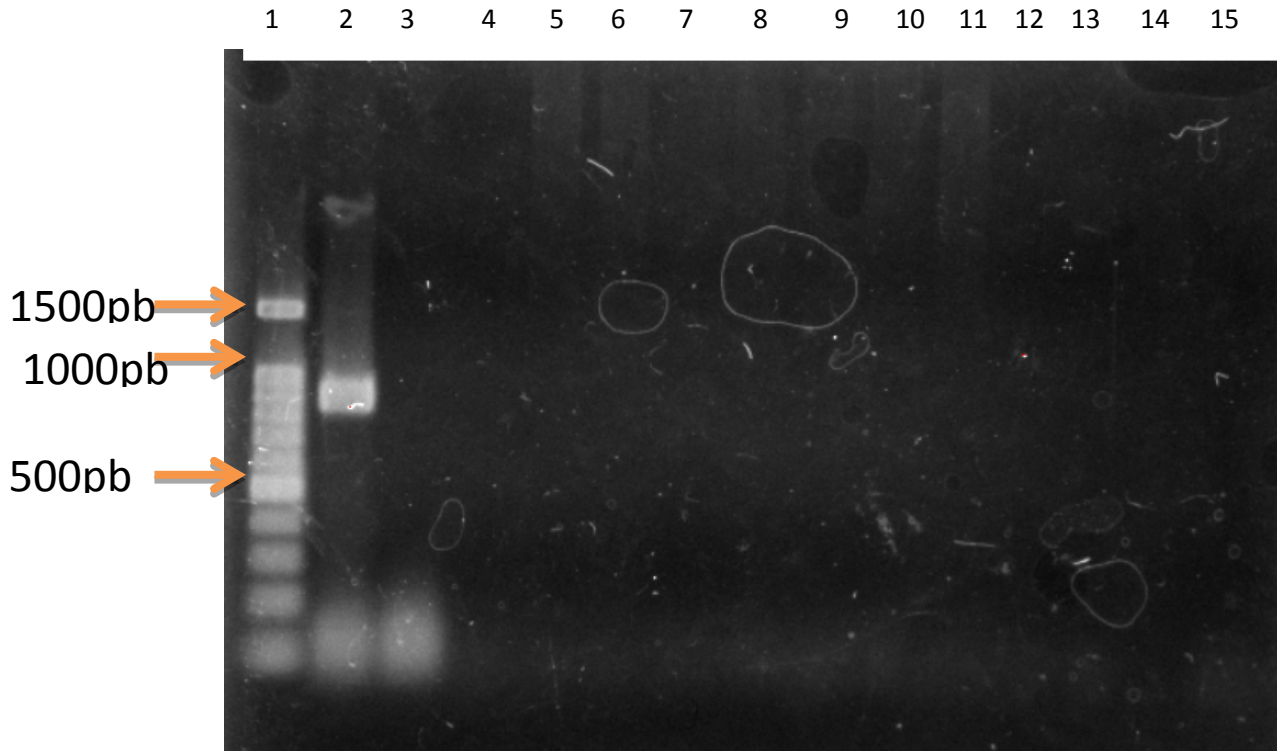


Fig. 2. PCR de el gen *msp4* de *Anaplasma marginale* y *A.ovis*. Gel de agarosa al 1% en el carril 1 podemos observar el marcador de tamaño, en el carril 2, un amplificado de *msp4* con un tamaño aproximado de 850pb proveniente de una muestra positiva a *A. marginale* en los carriles 3 al 14 se observan las muestras de ovinos y caprinos donde no se aprecia amplificación y en el carril 15 se observa el control negativo.

6.3 Amplificación de el gen *msp4* utilizando los oligos específicos de *A. ovis* y de *A. marginale*.

La amplificación de *A. ovis* en cabras y ovinos alrededor de 347pb con oligonucleótidos específicos para una región del gen *msp4* como se observa en la Fig.3. De forma similar a lo descrito por Torina *et al.*, 2012, que indica que es una región específica del gen *msp4* de *A. ovis*.



Fig. 3. Amplificaciones de un fragmento del gen *msp4* específicas para *Anaplasma marginale*. Gel de agarosa al 1%. Carril 1 se aprecia el marcador de tamaño en los carriles 2 y 3 se observan resultados negativos, en el carril 4 se observa la amplificación de el gen *msp4* específico para *A. ovis* con un tamaño aproximado de 340pb en los carriles 5, 6 y 7 se observa las muestras de caprino donde no se obtuvo amplificación de *msp4* específico de *A. marginale*, en el carril 8 se observa la amplificación de *msp4* específico de *A. marginale* con una muestra de bovino y en el carril 9 la misma muestra pero con los oligos específicos de *A. ovis* y en el carril 10 el control negativo.

VII. CONCLUSIÓN

El gen *msp4* de *Anaplasma ovis* esta presente en los ovinos y caprinos de la región y nos será útil estos amplificados para posteriores investigaciones como en la genotipificación.

VIII. LITERATURA CITADA

- Ahmadi-hamedani, M., M. Ahmadi-hamedani, E. Fathi, and R. Sani. 2014. Comparison of selected biochemical parameters between naturally infected and non-infected goats with *Anaplasma ovis*. *Comp Clin Pathol* 23:989-992.
- Aubry P., Geale D.W., 2010. A Review of Bovine Anaplasmosis *Transbound Emerg. Dis.* 58: 1-30.
- Bahzad H., 2011. Clinical and hematological study on ovine anaplasmosis in Sulaimani Povinve- Iraq. *Bas J. Vet. Res.* 2: 97-104.
- Chi, Q., Z. Liu, Y. Li, J., Yang, Z., Chen, C., Yue, J., Luo, and H. Yin. 2013. Development of a Real-Time PCR Assay for Detection and Quantification of *Anaplasma ovis* Infection. *Transboundary and Emerging Diseases* 60:119-124.
- Chochlakis, D., Ioannou, I., Psaroulaki, A., & Tselentis, Y. (2010). Human anaplasmosis and *Anaplasma ovis* variant. *Emerging Infectious Diseases*, 16(6), 1031.
- Dahmani, M. B., Davoust, M. S., Benterki, F. Fenollar, D. Raoult, and O. Mediannikov. 2015. Development of a new PCR-based assay to detect Anaplasmataceae and the first report of *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma platys* in cattle from Algeria. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 39:39-45.
- 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., Stuen, 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., Hogg J., Miller D., Naranjo V., Almazan C., Anderson N., Kocan K., 2007. Genetic characterization of *Anaplasma ovis* strain from bighorn sheep in Montana *J. Wildl. Dis.* 42: 381-385.

De la Fuente J., Atkinson M., Naranjo V., Fernandez de Mera I., Mangold A., Keating K., Kocan K., 2006. Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma ovis* strain *Vet. Mic.* 119:375-381.

Derdakova, M., A. Stefancikova, E. Spitalska, V. Taragelova, T. Kostalova, G. Hrklova, K. Kybicova, P. Schanilec, V. Majlathova, M. Varady, and B. Petko. 2011. Emergence and genetic variability of *Anaplasma* species in small ruminants and ticks from Central Europe. *Veterinary microbiology* 153:293-298.

Djiba, M. L. O., Mediannikov, M., Mbengue, Y., Thiongane, J. F., Molez, M. T., Seck, F., Fenollar, D., Raoult, and M., Ndiaye. 2013. Survey of Anaplasmataceae bacteria in sheep from Senegal. *Trop. Anim. Health Prod.* 45:1557-1561.

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.

Friedhoff, K. T., 1997: Tick-borne diseases of sheep and goats caused by Babesia, Theileria or Anaplasma spp. Parasitologia 39(Suppl 1): 99–109.

Hornok S., de la Fuente J., Biró N., Fernandez de Mera I., Meli M., Elek V., Gönczi E., Meili T., Tánczos B., Farkas R., Lutz H., Hofmann-Lehman R., 2011. First molecular evidence of *Anaplasma ovis* and *Rickettsia* spp. in keds(Diptera: hippoboscidae) of sheep and wild ruminants. Vector-Borne and Zoonotic diseases 10:1319-1321.

Hornok S., Hofmann-Lehmann R., Fernandez de Meraz I., Meli M., Elek V., Hajtós I., Répasi A., Gönczi E., Tánczos B., Farkas R., Lutz H., de la Fuente J. 2010. Survey on blood-sucking lice(Phthiraptera:Anoplura) of ruminants and pigs with molecular detection of *Anaplasma* and *Rickettsia* spp. Vet. Parasitology 174:355-358.

Hornok S., Vilmos E., de la Fuente J., Naranjo V., Farkas R., Majoros G., Földvári G., 2007. First serological and molecular evidence on the endemicity of *Anaplasma ovis* and *A. marginale* in Hungary. Vet. Mic. 122: 316-322.

Hornok, S., A. Micsutka, I. G. Fernández de Mera, M. L. Meli, E. Gönczi, B. Tánczos, A. J. Mangold, R. Farkas, H. Lutz, R. Hofmann-Lehmann, and J. de la Fuente. 2012. Fatal bovine anaplasmosis in a herd with new genotypes of *Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis* and concurrent haemoplasmosis. Res. Vet. Sci. 92:30-35.

INEGI. 2009. Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática, Censo Agrícola Ganadero y Forestal 2007. Obtenido el 3 de febrero del 2015 en <http://mapserver.inegi.org.mx/geografia/espanol/estados/sin/clim.cfm?c=444&e=09>

- Knowles, D.P., Torioni de Echaide, S., Palmer, G.H., McGuire, T.C., Stiller, D., McElwain, T.F., 1996. Antibody against *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. J. Clin. Microbiol. 34: 2225–2230.
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Blouin, E.F., Coetzee, J.F., y Ewing, S.A., 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*. Vet Parasitol 167: 95-107.
- Lee, S. H., B. Y. Jung, and D. Kwak. 2015. Evidence of *Anaplasma* spp. exposure in native Korean goats (*Capra hircus coreanae*). Veterinárni Medicína 60:248-252.
- Li, H., Y.-C. Zheng, L. Ma, N. Jia, B.-G. Jiang, R.-R. Jiang, Q.-B. Huo, Y.-W. Wang, H.-B. Liu, Y.-L. Chu, Y.-D. Song, N.-N. Yao, T. Sun, F.-Y. Zeng, J. S. Dumler, J.-F. Jiang, and W.-C. Cao. 2015. Human infection with a novel tick-borne *Anaplasma* species in China: a surveillance study. The Lancet Infectious Diseases 15:663-670.
- Liu Z., Ma M., Wang Z., Wang J., Peng Y., Li Y., Guan G., Luo J., Yin H., 2012. Molecular survey and genetic identification of *Anaplasma* species in goats from central and southern China Appl. Environ. Microbiol. 78:464-470.
- Ma M., Liu Z., Sun M., Yang J., Guan G., Li Y., Luo J., Yin H., 2011. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of *Anaplasma ovis* Journal of clinical microbiology 6:2143-2146.
- Ndung'u L., Aguirre C., Rurangirwa F., Mcelwain T., McGuire T., Knowles D., Palmer G., 1995. Detection of *Anaplasma ovis* infection in goats by major surface protein 5 competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of clinical microbiology 3: 675-679.

Palmer G., Abbott J., French D., Mcelwain T., 1998. Persistence of *Anaplasma ovis* infection and conservation of the *msh-2* and *msh-3* multigene families within the genus *Anaplasma*. *Infection and Immunity* 12: 6035-6039.

Pérez De Castro, AM. 2011. Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)
<http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf?sequence=1>.

Psaroulaki A., Chochlakis D., Sandalakis V., Vranakis I., Ioannou I., Tselentis Y., 2009. Phylogentic analysis of *Anaplasma ovis* strains isolated from sheep and goats using *groEL* and *msh4* genes. doi:10.1016/j.vetmic.2009.04.018.

Renneker S., J. Abdo D. E. A., Salih T., Karagenç H., Bilgiç A., Torina A., G. Oliva J., Campos B., Kullmann J., Ahmed and U. Seitzer. 2013. Can *Anaplasma ovis* in Small Ruminants be Neglected any Longer? *Transboundary and Emerging Diseases* 60:105-112.

Rikihisa, Y. 1991. The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clin Microbiol Rev* 4, 286-308.

Rikihisa, Y. 2006 *Ehrlichia* subversion of host innate immune responses. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 95-101.

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

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

Sankale S., Suryakant W., Rurangirwa F., McGuire T., 1989. Cloned DNA probes identify *Anaplasma ovis* in goats and reveal high prevalence of infection. *Journal of clinical microbiology* 12:2730-2735.

Scoles G. A., W. L., Goff T. J., Lysyk G. S., Lewis and D. P. Knowles. 2008. Validation of an *Anaplasma marginale* cELISA for use in the diagnosis of *A. ovis* infections in domestic sheep and *Anaplasma* spp. in wild ungulates. *Veterinary microbiology* 130:184-190.

Shompole S., S. D., Waghela F. R., Rurangirwa and T. C., McGuire. 1989. Cloned DNA probes identify *Anaplasma ovis* in goats and reveal a high prevalence of infection. *Journal of clinical microbiology* 27:2730-2735.

Stokka G y Falkner R. 2000. Anaplasmosis Kansas State University <http://www.oznet.ksu.edu>.

Stuen Snorre., Longbottom David., 2011. Treatment and Control of Chlamydial and Rickettsial Infections in Sheep and Goats. *Vet Clin Food Anim* 27 213–233.

Stuen, S. 2013. Tick-borne infections in small ruminants in northern Europe. *Small Ruminant Research* 110:142-144.

Thrusfield, M. 1990. *Epidemiología Veterinaria*. Ed. Acribia, Zaragoza. España. P. 219-232.

Torina A., Alongi A., Naranjo V., Estrada-Peña A., Vicente J., Scimeca Salvatore., Marino A., Salina F., Carappa S., de la Fuente J., 2008. Prevalence and Genotypes of *Anaplasma* species and hábitat suitability for ticks in a mediterranean ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:7578-7584.

Torina, A., R. C. Galindo, J. Vicente, V. Di Marco, M. Russo, V. Aronica, M. Fiasconaro, S. Scimeca, A. Alongi, S. Caracappa, K. M. Kocan, C. Gortazar, and J. de la

Fuente. 2010. Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* and *A. ovis* infection in a naturally infected sheep flock with poor health condition. *Trop. Anim. Health Prod.* 42:1327-1331.

Torina, A., Agnone, V., Blanda, A., Alongi, R., D'Agostino, S., Caracappa, A. M., Marino, V., Di Marco, and J., de la Fuente. 2012. Development and validation of two PCR tests for the detection of and differentiation between *Anaplasma ovis* and *Anaplasma marginale*. *Ticks and tick-borne diseases* 3:283-287.

Torina, A., and Caracappa, S. 2012. Tick-borne diseases in sheep and goats: Clinical and diagnostic aspects. *Small Ruminant Research* 106, Supplement: S6-S11.

Torina, A., J. A., Moreno-Cid, V., Blanda, I. G., Fernández De Mera, J. M. P., De La Lastra, S., Scimeca, M., Blanda, M. E., Scariano, S., Brigano, R., Disclafani, A., Piazza, J., Vicente, C., Gortázar, S., Caracappa, R. C., Lelli, and J., De La Fuente. 2014. Control of tick infestations and pathogen prevalence in cattle and sheep farms vaccinated with the recombinant Subolesin-Major Surface Protein 1a chimeric antigen. *Parasites and Vectors* 7.

Torina, A., J. Vicente, A., Alongi, S., Scimeca, R., Turla, S., Nicosia, V., Di Marco, S., Caracappa, and J., de la Fuente 2007: Observed prevalence of tick-borne pathogens in domestic animals in Sicily, Italy during 2003–2005. *Zoonoses Public Health* 54, 8–15.

Woldehiwet, Z., 2007. Tick-borne diseases. In: Aitken, I.D. (Ed.), *Diseases of Sheep*. , 4th ed. Blackwell, Oxford, pp. 347–355.

Yang, J., Y., Li, Z., Liu, J., Liu, Q., Niu, Q., Ren, Z., Chen, G., Guan, J., Luo, and H., Yin. 2015. Molecular detection and characterization of *Anaplasma* spp. in sheep and cattle from Xinjiang, northwest China. *Parasites Vectors* 8:108-108.

Yasini S.P., Khaki Z., Rahbari S., Kazemi B., Salar Aamoli J., Gharabaghi A., Jalali S.M.
2012. Hematologic and clinical aspects of experimental ovine anaplasmosis
caused by *Anaplasma ovis* on Iran. Iranian J Parasitol: 4: 91-98.