

Anaplasmosis bovina (bovine anaplasmosis)

Belkis Corona, Majela Rodríguez y Siomara Martínez

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. E. mail: bcorona@censa.edu.cu

Resumen

Anaplasma marginale es una rickettsia del genogrupo II de las Ehrlichias, que parasita los eritrocitos maduros del ganado bovino y causa severas pérdidas económicas fundamentalmente en las zonas tropicales y subtropicales (Palmer y col., 1999). Este microorganismo presenta múltiple variabilidad antigénica, de morfología, virulencia, transmisibilidad por garrapatas y habilidad para inducir protección cruzada contra aislamientos heterólogos (Palmer y McElwain, 1995). Se han caracterizado seis proteínas de superficie de membrana de los cuerpos iniciales de este organismo, portadoras de epitopes B y T, denominadas proteínas mayoritarias de superficie (MSPs) y designadas 1a, 1b, 2, 3, 4 y 5. Estas proteínas son reconocidas por anticuerpos neutralizantes y se encuentran en una estrecha relación intermolecular en la superficie de la membrana de los cuerpos iniciales. Algunas de estas proteínas inducen una protección total o parcial en animales vacunados, aunque el nivel y la uniformidad de la misma, es variable (Palmer y McElwain, 1995). A pesar de las cuantiosas pérdidas económicas producidas todos los años, a nivel mundial hasta el momento no se cuenta con un método de control eficaz contra la enfermedad, por lo que resulta de gran importancia desarrollar una vacuna capaz de prevenir la infección con este patógeno y contar con técnicas de diagnóstico más sensibles y específicas que permitan la detección de animales portadores para ser utilizadas en estudios epizootiológicos y para el control de la enfermedad (Echaide y col., 1998). Por lo que a partir de estas premisas nos proponemos como objetivo realizar una exhaustiva revisión bibliográfica acerca de la anaplasmosis bovina y su agente causal, Anaplasma marginale.

Palabras claves: Anaplasmosis bovina, Anaplasma marginale, proteínas principales de superficie de los cuerpos iniciales (MSP).

Abstract

Anaplasma marginale is one rickettsia of the Ehrlichias, that parasite the mature erythrocytes in cattle and causing severe economic losses in the tropical and subtropical zones (Palmer and col., 1999). This microorganism presents multiple antigenic variability, of morphology, virulence, transmissibility by ticks and ability to induce protection against heterologous isolates (Palmer and McElwain, 1995). Six surface major proteins of the initial bodies of this organism, carriers of epitopes B and T have been characterized, denominated proteins major surface proteins (MSPs) and designated 1a, 1b, 2, 3, 4 and 5. These proteins are recognized by neutralizing antibodies and they are in intermolecular relation in the surface of the membrane of the initial bodies. Some of these proteins induce a total or partial protection in

vaccinated animals, although the level and the uniformity are variable (Palmer and McElwain, 1995). At this moment in the world there is not a method of effective control against the disease, reason why it is from great importance of developing a vaccine able to prevent the infection with this pathogen and to count on more sensible and specific techniques of diagnosis of persistent infected animals to be used in studies for the control of the disease (Camacho and col., 2000). A review about the bovine anaplasmosis and their causal agent Anaplasma marginale is presented.

Key words: bovine anaplasmosis, Anaplasma marginale, initial bodies mayor surface proteins (MSP).

1. Generalidades de *Anaplasma marginale*

1.1. Clasificación taxonómica

Anaplasma marginale se consideró como un protozoo hemático durante mucho tiempo. Las investigaciones ulteriores demostraron que se clasifica dentro del orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceae, género *Anaplasma* (Ristic y Kreier, 1984). El análisis filogenético, utilizando secuencias de la región 16S del ARNr, permitió esclarecer la relación dentro de los genogrupos de las especies de Ehrlichias, situando a *A. marginale* dentro del árbol filogenético, en el genogrupo II de las Ehrlichias, las cuales son patógenos de animales y humanos que se transmiten por garrapatas (Biberstein, 1999).

Se conocen cuatro especies del género *Anaplasma*, como agentes causantes de la anaplasmosis: *A. marginale*, que es la más patógena para los bovinos; *A. centrale*, causante de una relativa forma benigna de anaplasmosis en bovinos; *A. caudatum* también en ganado bovino y *A. ovis*, causante de un padecimiento limitado a ovinos y caprinos (Ristic y Kreier, 1984), siendo *A. marginale* la única especie identificada en Cuba (Alonso y col., 1989). La secuencia nucleotídica de la región 16S del ARNr de *A. centrale* está estrechamente relacionada con la secuencia de *A. marginale* con un 98.08 % de identidad (Inokuma y col., 2001).

Dumler y col., (2001), propusieron que en la familia Anaplasmataceae se incluyeran especies del género *Wolbachia*, *Ehrlichia*, *Cowdria* y *Neorickettsia* y conservar los géneros *Anaplasma* y *Aegyptianella* dentro de la familia. Propusieron, además que miembros del grupo de *E. phagocytophila*, incluyendo *E. phagocytophila*, *E. equis*, *E. granulocítica humana* (HGE), así como *E. bovis* y *E. platys* debían ser unidos con el género *Anaplasma*. Cada uno de estos agentes persiste en sus respectivos hospederos mamíferos y se transmite dentro y no entre las generaciones del vector biológico. Por otra parte, se han encontrado genes homólogos entre los miembros de este grupo, algunos de los cuales son miembros de familias de multigenes que pueden estar arreglados en "tandem" o dispersos en el cromosoma (Dame y col., 1992; Walker y Dumler, 1996).

1.2. Caracteres morfofuncionales y culturales

A. marginale es un microorganismo sin forma definida. Se establecieron tres categorías de acuerdo a su talla: El clásico cuerpo *marginale*, una forma intermedia cuerpo inicial y la de tamaño pequeño conocido como cuerpo polihédrico (Ristic y Watrach, 1963; Palmer y McGuire, 1984; Ristic y Kreier, 1984).

En los hospederos vertebrados, *Anaplasma spp.*, infecta a los eritrocitos maduros con la formación de una vacuola derivada de dichos eritrocitos, alrededor del organismo (Francis y col., 1979). Cada organismo tiene un diámetro de 0.55- 0.85 μm y contiene los cuerpos iniciales que consisten en agregados granulares densos rodeados por una doble membrana de 40-50 μm de espesor. El microorganismo se replica dentro del eritrocito por fisión binaria para formar hasta ocho organismos individuales dentro de una vacuola simple (Ristic y Watrach, 1963; Palmer y McGuire, 1984; Ristic y Kreier, 1984). Posteriormente, los organismos salen del eritrocito, utilizando mecanismos aparentemente no líticos e infectan los eritrocitos aledaños (Erp y Fahrney, 1975).

El cuerpo inicial se encuentra dentro de los glóbulos rojos en número variable y está formado por material fibrilar y varios gránulos electrodensos que contienen ADN, ARN y hierro orgánico, rodeados por una doble membrana. Estos cuerpos iniciales, a la vez, son limitados por una vesícula intracitoplasmática, constituida por una sola membrana, y que también posee material fibrilar, nombrada cuerpo de inclusión (Ristic y Kreier, 1984).

Nakamura y col., (1989) demostraron la presencia de carbohidratos en la superficie de los cuerpos iniciales de *A. marginale*, pero al parecer éstos no son importantes en la hemaglutinación de los cuerpos iniciales, ya que cuando se trató con NaIO₄ o neuroaminidasa, no se encontraron diferencias con respecto al control. Esto sugiere que aparentemente los carbohidratos de superficie de los cuerpos iniciales no juegan un papel importante en la adhesión de *A. marginale*. Cuando se trataron los eritrocitos bovinos con α quimotripsina o neuroaminidasa, fue evidente la pérdida de la hemaglutinación, no así cuando se siguió el tratamiento con tripsina y varias fosfolipasas, lo que sugirió que el ligando del receptor de los eritrocitos está compuesto parcialmente por proteína y/o ácido siálico (McGarey y Allred, 1994).

Este hemoparásito se caracteriza además, por producir catalasas, no producir pigmentos y no formar esporas u otros estados de resistencia. Es sensible a la tetraciclina e insensible a las penicilinas, sulfonamidas, estreptomycin y arsenicales. Su infectividad puede ser destruida al exponerlo a 60°C, al menos por 50 minutos y a rayos X o a sonicación a 35°C por 90 minutos. (Ristic y Kreier, 1984).

En Brasil se detectaron y aislaron cepas de *A. marginale* con un apéndice de inclusión. El mismo presenta estriaciones longitudinales electrodensas y no se origina directamente del cuerpo de la rickettsia, sino de un complejo localizado en la unión entre la membrana de inclusión y el apéndice. Este apéndice permanece en las células huéspedes, incluso aún después que *A. marginale* abandonan los glóbulos rojos (Ribeiro y Passos, 1996; Stich y col., 1997).

A. marginale se logró cultivar, pero por cortos períodos de tiempo, mediante la propagación del parásito en un cultivo de una línea celular derivada de embriones de garrapata *Dermacentor variabilis*, pero para poder mantener el crecimiento se necesitaron realizar pases continuos, pues este microorganismo requiere para su propagación de células hospederas con una alta actividad de crecimiento y multiplicación y un medio con suero fetal bovino (Hidalgo y col., 1989). Sin embargo, Munderloh y col., (1996), lograron propagar continuamente esta rickettsia en una línea celular derivada de *Ixodes scapularis*, usando como inóculo sangre de bovino infectado. Un segundo aislamiento, derivado de vacas naturalmente infectadas en Oklahoma, se propagó en la misma línea celular de garrapata, lo que tiene potencialidad para ser utilizado como antígeno para el desarrollo de una vacuna mejorada contra la anaplasmosis en los Estados Unidos (Blouin y col., 1998).

2. Biología Molecular de *A. Marginale*

A. marginale presenta un ADN circular de doble cadena, cuya talla total oscila entre 1 200 y 1 250 kpb, determinado por los análisis de restricción realizados al genoma de la cepa Florida, con las enzimas Sfi I y Pac I. El análisis en electroforesis de campo pulsante, de los productos de las digestiones, realizadas al genoma de diferentes cepas, dio como resultado la existencia de un considerable polimorfismo entre estas, aunque la talla total del genoma es constante, con un contenido de G + C de 56 %, lo cual se determinó por análisis espectral (Alleman y col., 1993).

En este parásito se describen seis genes ($msp1\alpha$, $msp1\beta$, $msp2$, $msp3$, $msp4$ y $msp5$), que codifican para las proteínas principales de superficie de los cuerpos iniciales, que constituyen blancos de la respuesta inmune del hospedero contra el patógeno (Palmer y McGuire, 1984; Tebele y McGuire, 1991). Hasta la fecha varios de los genes que codifican para las MSPs se han clonado, secuenciado y expresado (Barbet y col., 1986; Allred y col., 1990; Barbet y Allred, 1991; Visser y col., 1992; Oberle y col., 1993; Alleman y col., 1998). Estos trabajos han revelado que algunos de estos genes son polimórficos entre cepas y existen en familias de multigenes.

El gen $msp1\alpha$ codifica para la proteína de membrana MSP1a y se encuentra representado en el genoma por una simple copia. Posee una gran similitud con los genes de *E. coli*, en cuanto a las secuencias consenso de la región promotora, sin embargo, no se ha detectado una secuencia con similitud a la de Shine-Delgarno de *E. coli* (Palmer y McGuire, 1990). Este gen presenta un alto polimorfismo de talla entre los aislamientos de distintas regiones geográficas, debido a que posee secuencias oligonucleotídicas repetidas en tandem (Oberle y col., 1988; Allred y col., 1990; Palmer y McGuire, 1990). Estas secuencias se encuentran repetidas en el gen 2, 4, 6 y 8 veces en los aislamientos Virginia, Washington, Idaho y Florida respectivamente (Palmer y McGuire, 1990; de la Fuente y col., 2002a; de la Fuente y col., 2002b) y 5 veces en el aislamiento Habana (Corona y col., 2004), de ahí el alto polimorfismo de talla observado, por lo que se ha utilizado para la diferenciación y detección específica de aislamientos de *A. marginale* (Lew y col., 2002).

Por su parte, el gen $msp1\beta$ está formado por una familia de multigenes, compuesta al menos por cuatro copias (Camacho y col., 2000). Este gen también presenta dominios de secuencias repetidas, al igual que $msp1\alpha$, aunque son de menor extensión. Por ensayos de RFLP, se demostró que esta familia de genes es polimórfica entre aislados de regiones geográficamente diferentes (Barbet y Allred, 1991). En estos momentos se sabe que todas las copias del gen son capaces de expresarse y que codifican para proteínas estructuralmente únicas (Camacho y col., 2000).

El gen $msp2$ está formado por una familia multigénica. Presenta una gran variabilidad fundamentalmente en su extremo 5' (Palmer y col., 1994) y codifica para moléculas proteicas estructuralmente distintas, las cuales presentan epitopes B diferentes, en las regiones con alto polimorfismo de aminoácidos. Durante la fase aguda de la enfermedad hay transcripción de diferentes copias de este gen paralelamente (Eid y col., 1996; French y col., 1998).

El gen $msp3$ forma parte también de una familia multigénica, cuyas copias se encuentran ampliamente distribuidas a través del cromosoma (Alleman y Barbet, 1996). El análisis de la secuencia de tres genes reveló regiones conservadas y regiones variables dentro del marco abierto de lectura de los mismos. Este gen codifica para una proteína de 86 kDa, que es considerada un antígeno inmunodominante (Palmer y col., 1986; McGuire y col., 1991).

El gen $msp4$ se encuentra como una simple copia en el genoma de *A. marginale* y codifica para una proteína de 31 kDa (MSP4) (Oberle y col., 1988, Palmer y col., 1988, Corona y col., 2000). Un rasgo peculiar de este gen, es que la secuencia de la región 3' contiene repeticiones imperfectas invertidas que exhiben abundantes estructuras secundarias (Oberle y col., 1993). de la Fuente y col., (2002a), han demostrado que este

gen proporciona información filogenética sobre la evolución de los aislamientos de *A. marginale*, a diferencia del gen *msp1 α* , que puede brindar información filogeográfica, sólo cuando se analizan un gran número de aislamientos de un área geográfica.

El gen *msp5* está representado en el genoma como una simple copia, altamente conservada entre las cepas de *A. marginale* estudiadas (Martínez y col., 2004). La presencia del gen en todas las especies de *Anaplasma*, incluyendo *A. ovis*, sugiere que este gen es esencial en el ciclo de vida del parásito, lo que avala el uso del mismo para el desarrollo de procedimientos de diagnóstico molecular. Se han identificado elementos de control procariontes en la secuencia de este gen, los cuales son funcionales en la bacteria *E. coli* (Visser y col., 1992).

2.1. Proteínas de los cuerpos iniciales

Como se ha mencionado anteriormente, se han caracterizado seis MSPs, denominadas: MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 (Palmer y McGuire, 1984) y MSP5 (Tebele y McGuire, 1991).

Estas proteínas presentan un polimorfismo variable entre distintos aislamientos de *A. marginale*. Se encuentran en una estrecha relación intermolecular en la superficie de membrana de los cuerpos iniciales (Vidotto y col., 1994) y además pueden contener estructuras helicoidales con segmentos transmembrana, dominios para la constitución de complejos multiméricos y regiones que funcionan como secuencia señal (Barbet y Allred, 1991; Tebele y McGuire, 1991; Palmer y McElwain, 1995; Alleman y Barbet, 1996). La inmunización del ganado con membranas de *A. marginale* que contienen las proteínas de superficie induce inmunidad protectora contra la enfermedad clínica (Tebele y McGuire, 1991).

La proteína MSP1 fue originalmente descrita como AmF105 (Palmer y McGuire, 1984) y está compuesta por dos subunidades MSP1a (105 kDa) y MSP1b (100 kDa), unidas por enlace disulfuro. Se ha demostrado que el complejo y las dos subunidades separadas, median la adherencia a los eritrocitos bovinos (McGuire y col., 1984), esto sugiere que MSP1a y MSP1b funcionan como adhesinas y se podrían requerir para la invasión de los eritrocitos, ya que anticuerpos específicos para MSP1 bloquean la unión de *A. marginale* a éstos. Además estos anticuerpos opsonizan los organismos vivos para la fagocitosis de los macrófagos (Cantor y col., 1993). Por otra parte la inmunización del ganado bovino con la proteína MSP1 nativa confiere un 100 % de protección contra la rickettsemia aguda y la enfermedad (Palmer y col., 1986; Palmer y col., 1989).

La inmunización del ganado bovino con la proteína MSP1 nativa purificada confiere protección contra la rickettsemia aguda. Sin embargo, a diferencia de estos resultados, cuando se utiliza la proteína nativa, la inmunización con las proteínas recombinantes MSP1a, MSP1b o la combinación de ambas, no induce protección significativa (Palmer y McElwain, 1995). La MSP1b recombinante utilizada en los ensayos fallidos de inmunización se derivó de una copia del gen, el único miembro de la familia secuenciado hasta este momento (Barbet y Allred, 1991). Actualmente se sabe que existe coexpresión de al menos dos copias diferentes del gen, en la fase aguda de la anaplasmosis y la expresión de proteínas MSP1b con epitopes B variables (Camacho y col., 2000).

La proteína MSP2 está presente en la membrana como un tetrámero adyacente a las proteínas MSP1, MSP3 y MSP4. Sus subunidades están unidas mediante puentes disulfuro, es relativamente inmunodominante y posee un peso molecular de 36 kDa (Palmer y col., 1988; Palmer y McElwain, 1995). Esta proteína es altamente polimórfica, con presencia de epitopes conservados (Palmer y col., 1994), aunque presenta epitopes B diferentes, en las regiones polimórficas. Se ha demostrado la expresión de diferentes variantes antigénicas de esta proteína, durante la rickettsemia aguda (Eid y col., 1996). La conservación de la estructura genómica para la generación de variantes de MSP2 y de epitopes CD4⁺ en *A. marginale* y *A. centrale* indica que estas dos especies presentan un repertorio similar de epitopes MSP2 al sistema inmune y esto puede ser responsable de la eficacia de protección contra *A. marginale* cuando se prueban vacunas de *A. centrale* (Brayton y col., 2002; Shkap y col., 2002).

La MSP3 está codificada por una familia multigénica, es también inmunodominante durante las infecciones natural y experimental. Tiene un peso molecular de 86 kDa y se puede encontrar además en *A. centrale* y *A. ovis* (Palmer y McElwain, 1995). Es estructural y antigénicamente diferente entre cepas de *A. marginale*, presenta polimorfismo de talla entre aislamientos geográficamente diferentes (Alleman y Barbet, 1996) y es expresada por un simple "locus", en el cual la variación de los genes *msp3* expresados es generada por recombinación utilizando pseudogenes (Meeus y col., 2003). La proteína MSP4 de 31 kDa, es altamente conservada entre los distintos aislamientos de *A. centrale* y *A. marginale*. Esta proteína contiene bloques de aminoácidos relacionados con la proteína MSP2 (Alleman y Barbet, 1996). Sus epitopes conservados son de gran importancia tanto para el diagnóstico como para el desarrollo de una vacuna (Tebele y McGuire, 1991; Oberle y col., 1993). Se ha comprobado que funciona como adhesina al igual que la MSP2 y las subunidades del complejo MSP1 y que tanto la nativa como la recombinante protegen a animales inmunizados en retos con cepas homólogas (McGarey y col., 1994).

Otra de las proteínas, con una talla conservada entre todos los aislamientos y presente en todas las especies conocidas de *Anaplasma* spp., es la MSP5. Tiene un peso molecular de 19 kDa, es de poca complejidad estructural y muy importante en el ciclo de vida celular, aunque se desconoce exactamente su función. Se encuentra formando un dímero en la membrana, cuyas subunidades se unen por puentes disulfuros. La proteína nativa y la recombinante muestran un epitope reconocido por el anticuerpo monoclonal AnaF16C1 (Visser y col., 1992), presente en los estadios del parásito en la garrapata y en la forma intraeritrocítica, utilizándose en ensayos de ELISA competitivo, para la identificación de los animales infectados persistentemente (Knowles y col., 1996). Este epitope induce altos títulos de anticuerpos en todas las especies infectadas, incluyendo bovinos, chivos y carneros (Visser y col., 1992; Ndung'u y col., 1995; Knowles y col., 1996; Munodzana y col., 1998; Torioni y col., 1998).

La conservación de la talla molecular de MSP5 entre cepas, tiene un contraste marcado con el polimorfismo observado para otras MSPs de *A. marginale*, principalmente MSP1a (Allred y col., 1990) y MSP2 (Oberle y col., 1988).

Kano y col., (2002), realizaron la caracterización antigénica de aislados de *A. marginale* de diferentes regiones geográficas de Brasil y en todos los aislados estudiados estuvo presente la proteína MSP5, lo que coincidió con previos estudios realizados que demostraban la conservación de esta proteína en aislamientos de América, África e

Israel (Visser y col., 1992; Knowles y col., 1996; Vidotto y col., 1998).

Oliveira y col., (2003), sugieren que esta proteína puede ser utilizada como antígeno para el diagnóstico serológico debido a la conservación de los epitopes para las células B entre diferentes aislamientos estudiados, corroborando la hipótesis de que este polipéptido tiene una función fundamental en el ciclo biológico del hemoparásito, estando presente durante las fases aguda y crónica de la infección bovina (Knowles y col., 1996).

3. Características de la enfermedad

3.1. Incidencia mundial de la enfermedad

La anaplasmosis bovina es una enfermedad económicamente importante por los enormes gastos que ocasiona, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, incluyendo los Estados Unidos, donde se reporta una mortalidad anual entre 50 000 a 100 000 animales muertos, con un costo de hasta 300 millones de dólares (Palmer y McElwain, 1995).

Un estudio realizado en el norte de Veracruz (México), mostró que el 69 % del ganado estaba infectado (Cossio y col., 1997). Esta alta prevalencia está asociada con un significativo rango de transmisión, pues el 26 % del ganado que murió en México durante 1995, fue debido al movimiento de ganado susceptible a áreas con alta prevalencia de la enfermedad y por la subsiguiente transmisión de la misma. Tasas similares de infección, entre el 73 % y 78 % se han calculado con anterioridad para el ganado de St. Lucia (Hugh-Jones y col., 1988) y el Salvador (Payne y Scott, 1982), respectivamente.

La enfermedad se reporta en muchas áreas del mundo, existiendo datos de la presencia de anaplasmosis bovina en la India (Chitravel y col., 1998) y otras regiones de Asia y el Pacífico, donde es considerada una enfermedad endémica, causante de pérdidas considerables en el ganado importado, pues las razas de ganado responden de una manera muy diferente a una misma infección (<http://www.fao.org/docrep/V8300S/v8300sOp.htm>).

En Argentina, en el año 2000 se reportó la existencia de un rebaño donde el 50 % de los animales tenía anticuerpos contra A. marginale por la prueba de aglutinación en tarjeta y en el año 2003 se reportó una alta incidencia de la anaplasmosis, a pesar de no ser una enfermedad de declaración obligatoria (Spath, 2003). En Colombia está considerada como de una gran importancia, ya que constituye una restricción para el incremento de la productividad ganadera del país (Benavides y col., 2000; Hans, 2001).

La anaplasmosis bovina se detectó en Suiza, en una explotación ganadera en dos sitios diferentes, con un 8.2 % de muestras positivas por ELISA (Kinhm, 2002). En South África se reportó un 50-75 % de prevalencia de infección (Masika y col., 1997). En Venezuela se observó una muy alta incidencia de la enfermedad (Melendez y Forlano, 1997) y en el estado de Paraná, en Brasil, se reportaron valores de 87.6 % de animales positivos en una región donde la anaplasmosis es endémica (Vidotto y col., 1998).

En Cuba, durante los primeros años de la década de los 90 la anaplasmosis bovina se presentaba como una de las primeras causas de mortalidad en el ganado adulto. Solamente en el año 1993 se estimó una pérdida superior a los dos millones de dólares (según datos de la Dirección de Medicina Veterinaria de Cuba).

A comienzos de la década del 2000 se observa un cambio positivo con relación a la enfermedad, reportándose en los comienzos de este año una morbilidad de un 10 % por la enfermedad (Informe Primer Trimestre, IMV 2000). Esta situación esta dada porque a partir del período especial, en nuestro país existió un cambio en el componente racial de la ganadería, con el predominio de animales más resistentes a las garrapatas, unido a la incorporación de nuevas tecnologías en el control de ixodidos, como la vacunación contra *Boophilus microplus* con la vacuna recombinante Gavac, y la combinación de ésta con baños garrapaticidas programados. Esto permitió disminuir la población del vector hasta niveles que garanticen la premunición en los animales menores de nueve meses, aspecto este que resulta importante estudiar desde el punto de vista epizootológico, para lo cual se hace imprescindible contar con técnicas diagnósticas sensibles y específicas.

3.2. Transmisión

El estudio de la transmisión de *A. marginale* es de fundamental importancia para establecer un control efectivo de la enfermedad. Son amplias y muy variadas las formas en que puede transmitirse el parásito y dependen de la presencia de vectores (biológicos y mecánicos), la existencia de animales susceptibles y de condiciones ecológicas favorables (Palmer y McElwain, 1995).

Esta enfermedad puede ser transmitida por artrópodos hematófagos tales como algunos géneros de garrapatas (Yeruhan y Braverman, 1981), principalmente *Boophilus* spp. y *Dermacentor* spp. (Kocan y col., 1986; Zaugg y col., 1986; Potgieter y col., 1993), moscas de establo, *Stomoxys calcitrans* (Yeruhan y Braverman, 1981) y mosquitos *Siphona* spp. y *Psophona* spp.; tábanos, *Tabanus* spp. (Ristic, 1968) y por la forma iatrogénica que también juega un papel muy importante en la diseminación de la enfermedad a través de material quirúrgico contaminado (Palmer y col., 2000). A pesar de esto, Kessler, (2001), planteó que la capacidad de transmisión de *Anaplasma marginale* por insectos hematófagos debe ser objeto de posteriores estudios, antes de considerarlos como vectores epidemiológicamente importantes.

Las vías más importantes de transmisión de la enfermedad son: la mecánica en la que se introducen directamente los eritrocitos infectados, ya sea por inoculación natural a través de picaduras de artrópodos hematófagos parasitados o artificialmente con objetos punzantes contaminados (Richey y Palmer, 1990) y la transmisión vertical de tipo placenta-feto, cuando la madre sufre anaplasmosis aguda (Zaugg, 1990). Este autor demostró que *A. marginale*, podía, en el segundo y tercer trimestre de gestación, atravesar la barrera placentaria e infectar al feto y que probablemente esto no sucedía dentro de los eritrocitos, sino que era una fase extraeritrocitaria del parásito. Según Rey y col., (2003), la vía de transmisión trasplacentaria debe ser tomada en cuenta como factor de riesgo en zonas donde la anaplasmosis es endémica.

Kessler, (2001), reportó sus consideraciones acerca de que las garrapatas del género *Boophilus* son el vector biológico principal de la transmisión de la anaplasmosis en Brasil, teniendo en cuenta que la transmisión iatrogénica (transfusiones de sangre, intervenciones clínicas a la masa bovina, y la vacunación masiva) puede ser evitadas con las medidas higiénicas. En Cuba, aunque no se han realizado estudios de la transmisión

de la enfermedad, el principal vector involucrado en la transmisión parece ser garrapatas del género *Boophilus*, teniendo en cuenta que este género es el más extendido en nuestro país.

Es necesario identificar los factores que influyen en la transmisión y desarrollo de este patógeno en las garrapatas para facilitar el mejoramiento de estrategias para el control de la enfermedad (Walade y col., 1996). La transmisión se logra fundamentalmente por transferencia de garrapatas infectadas y puede ocurrir de forma intraestadial y transestadial, para lo cual el macho juega un papel relevante en este proceso (Zaugg y col., 1986).

La transmisión del microorganismo a través de las diferentes especies de garrapata puede ocurrir de forma transestadial, es decir, de larvas a ninfas y de ninfas a adultos (Kocan y col., 1981; Kocan y col., 1986). Además puede ocurrir del estado de larva a adulto sin reexposición en el estadio como ninfa y por adultos machos que se transfieren del ganado infectado a otro susceptible.

Algunas cepas de *A. marginale* infectan a las garrapatas (Idaho, Virginia, aislados de Washington); sin embargo, aparentemente otras no las infectan (Illionis, Florida) (Smith y col., 1986; Wickwire y col., 1987; Zaugg y col., 1996), por razones que no se conocen, pero que apoyan las evidencias existentes de la variación antigénica del parásito.

A diferencia de los pequeños cuerpos de inclusión que contienen de cuatro a seis rickettsias en los eritrocitos bovinos, grandes colonias que contiene muchos organismos se observan en las garrapatas infectadas naturalmente. El ciclo de desarrollo del microorganismo comienza en las células del intestino medio con la subsecuente infección de las células musculares del intestino. El desarrollo final ocurre en las glándulas salivares, desde donde la rickettsia se transmite al huésped vertebrado. En cada sitio de desarrollo en la garrapata, *A. marginale* se multiplica dentro de inclusiones unidas a las membranas, llamadas colonias. Cada ciclo involucra dos estadios: una forma reticulada o vegetativa y la forma densa infectiva. La forma reticulada que se divide por fisión binaria es observada primero, dentro de las colonias, que posteriormente se condensan para dar lugar al estado electrodenso capaz de sobrevivir fuera de las células e infectar a otras (Kocan y col., 1996).

En cuanto a la existencia de animales susceptibles se describen infecciones subclínicas en búfalos de agua, ovinos y caprinos (Cossio y col., 1997). En bisontes se observó parasitemia moderada con respuesta a anticuerpos específicos, demostrándose la secuencia de infección bovino-bisonte-bovino (Chitravel y col., 1998). La rickettsia se detectó en la sangre de alces (*Cervus elaphus*) infectados, pero no se notó signos clínicos de la enfermedad (Zaugg y col., 1996, García y col., 1998). Estos resultan susceptibles a la infección con *A. marginale* y *A. ovis* y su sangre, infectada con ambos hemoparásitos es infectiva para bovinos y chivos susceptibles, por lo que lo constituyen un reservorio (Zaugg y col., 1996).

Todo el ganado es potencialmente susceptible a la infección con *Anaplasma marginale*, aunque ciertas razas desarrollan resistencia a las garrapatas, e inducen un decremento en la transmisión. Los portadores crónicos asintomáticos y otros animales resistentes son responsables también de preservar el agente etiológico en la naturaleza (Blood y col., 1983).

Palmer y col., (2001), reportaron la presencia de sólo un genotipo de *A. marginale* en los bovinos infectados. de la Fuente y col., (2002b), han reportado que en *A. marginale* ocurre exclusión de la infección en los eritrocitos bovinos y en las células de garrapatas, resultando en el establecimiento de sólo un genotipo, siendo el primer reporte de exclusión de la infección para *A. marginale* y especies de Ehrlichias. Recientemente se demostró que la exclusión de la infección con genotipos de *A. marginale* también ocurre en garrapatas experimentalmente infectadas, así como en bovinos y en el cultivo de células de garrapatas, resultando en el establecimiento de solo un genotipo por garrapata (de la Fuente y col., 2003a).

de la Fuente y col., (2003b), demostraron que no ocurre transmisión no sistémica de *A. marginale* desde garrapatas infectadas a no infectadas, por lo tanto, esto no parece ser un medio de transmisión de *A. marginale*. La infección en las garrapatas machos no se incrementa mientras conviven con las garrapatas hembras, por lo tanto, la coalimentación de *Dermacentor* spp. adulta parece no influenciar en la dinámica de transmisión de *A. marginale*.

3.3. Patogenia y síntomas clínicos

A. marginale es estrictamente intracelular, un parásito obligado que infecta al eritrocito bovino y que raramente se observa fuera de las células. El organismo penetra por invaginación al eritrocito sin que ocurra destrucción de las células, se encierra en una vacuola y se multiplica por fisión binaria en forma de cuerpo de inclusión, pudiendo observar de dos a tres cuerpos. El período prepatente durante la incubación de la enfermedad es de dos a tres semanas y la duración depende de la cantidad de organismo infectante (Medellín, 2003).

La enfermedad se caracteriza por marcada anemia hemolítica, altos niveles de rickettsemia, disminución del peso, aborto y en muchos casos la muerte en animales de más de tres años de edad. La anemia máxima ocurre de uno a seis días después de la parasitemia y persiste por cuatro a 15 días, donde hasta el 75 % de los eritrocitos se pierden de la circulación. El período de convalecencia es de uno a dos meses, y está acompañado por incremento de la hematopoyesis y puede haber recurrencia de la parasitemia. Los parámetros hemáticos retornan a los normales, pero los organismos continúan presentes en la circulación periférica. Los animales que sobreviven a la infección aguda permanecen como portadores con continuos ciclos submicroscópicos de rickettsemia que pueden persistir durante toda la vida del animal (Viseshakul y col., 2000).

En los portadores vertebrados, *A. marginale* invade los eritrocitos maduros con la formación de una vacuola, derivada de estos, alrededor de los microorganismos (Francis y col., 1979). Se multiplica y luego, nuevos organismos salen del glóbulo rojo, utilizando mecanismos hasta ahora desconocidos pero aparentemente no líticos (probablemente exocitosis) e infectan los eritrocitos aledaños. Después que el parásito entra al huésped bovino el número de células rojas infectadas se duplica entre las 24 y 48 horas siguientes. La infección puede detectarse por microscopía entre 20 y 40 días después de la transmisión, dependiendo del número de microorganismos transmitidos y de la virulencia del aislado (Richey, 1981).

Un animal infectado no presenta síntomas clínicos hasta que más de un 15 % de los eritrocitos no hayan sido parasitados. En ese momento, la parasitemia comienza a incrementarse geoméricamente y posteriormente los eritrocitos infectados se eliminan del torrente circulatorio mediante fagocitosis por las células del retículo endotelial del bazo, hígado y nódulos linfáticos; induciéndose el desarrollo de una fase de inflamación aguda. La subsecuente fiebre, temperaturas de hasta 41°C, es el primer síntoma clínico de la enfermedad (Richey y Palmer, 1990). La respuesta febril es seguida de anorexia, depresión y debilidad muscular, acompañada de una acidosis severa. La destrucción continuada de eritrocitos, sin liberación de hemoglobina, trae consigo palidez mucosal, sangre acuosa y posteriormente ictericia, pudiendo aparecer anticuerpos antieritrocitarios, lo que puede exacerbar la anemia. Luego de esta fase aguda se presenta la hiperaguda, donde ocurre una pérdida dramática de peso, aborto de vacas preñadas, fallo cardiopulmonar y muerte (Alderink y Dietrich, 1981). Estas últimas consecuencias ocurren con frecuencia al cabo de las 24 a 36 horas del pico de parasitemia, donde hay infectados hasta un 90 % de los eritrocitos (Richey y Palmer, 1990).

Los animales que sobreviven a esta fase disminuyen drásticamente la parasitemia y desarrollan una marcada respuesta regenerativa a la anemia. No hay evidencias de que exista una supresión al nivel de médula ósea. Los parámetros hematológicos retornan gradualmente a valores normales luego de muchas semanas (Swift y Thom, 1983).

El ganado recuperado puede permanecer infectado persistentemente con bajos niveles de parasitemia, que fluctúa por períodos largos de tiempo. A estos animales se les denomina portadores asintomáticos de la enfermedad, en los cuales la enfermedad es difícil de diagnosticar por los métodos tradicionales (Visshakul y col., 2000).

Estos animales afectados pueden desarrollar la forma crónica de la enfermedad sin manifestaciones clínicas. Esta forma además de presentarse como secuela de la convalecencia de las infecciones agudas, también puede ser el resultado de una infección inducida con cepas atenuadas (premunización) (Palmer y McGuire, 1995).

Las huellas postmortem que deja esta enfermedad son atribuidas fundamentalmente a la anemia hemolítica severa. El bazo frecuentemente está agrandado y se torna de color rojo marrón. Son comunes la hepatomegalia y un engrandecimiento de la vesícula biliar, con bilis oscura. Si el animal ha muerto en estadios tardíos de la infección aguda se puede presentar el íctero (Richey y Palmer, 1990).

3.4. Inmunidad y resistencia

El ganado puede contraer la enfermedad a cualquier edad, sin embargo la mortalidad y severidad aumentan con la misma. Los terneros de menos de 6 meses exhiben una resistencia natural, pues aún cuando se infectan, raramente exhiben los signos clínicos (Alonso y Blandino, 1988). El ganado entre 6 meses y tres años comienza a incrementar el padecimiento y ocurren más muertes con el avance de la edad. En general la parasitemia y la anemia son menos graves en los animales jóvenes, posiblemente debido a que la respuesta inmune celular es mayor por la competencia del timo, el sistema hematopoyético es más activo y por el papel más activo de la hemoglobina fetal (Richey y Palmer, 1990).

A. marginale induce en el organismo respuesta humoral y mediada por células, sin embargo, los anticuerpos al parecer juegan un papel menos importante (Bautista-Garfias y col., 2000). Los animales infectados desarrollan anticuerpos, fundamentalmente del tipo IgG e IgM, y exhiben durante las últimas etapas de la infección aguda una respuesta mediada por células, en la que aparecen los macrófagos activados segregando IFN- γ , que estimula fuertemente la proliferación de linfocitos de sangre periférica (Galade y col., 1996). La respuesta celular se correlaciona parcialmente con el desarrollo de la inmunidad. En contraste, la respuesta humoral se correlaciona pobremente con el desarrollo de resistencia. Sin embargo, existen antígenos claves de A. marginale que estimulan la producción de anticuerpos neutralizantes, por lo que la respuesta humoral juega algún papel en el desarrollo de la inmunidad contra la anaplasmosis (Richey y Palmer, 1990; de la Fuente y col., 2002a).

El estudio de los mecanismos inmunes protectores contra A. marginale se focaliza fundamentalmente en la fase aguda de la enfermedad. Palmer y col., (1999) plantearon la hipótesis de que la eliminación de A. marginale requiere de la inducción de niveles altos de anticuerpos de la subclase IgG₂ dirigidos contra los epitopes B de la superficie del microorganismo. Así mismo, sugirieron la activación de los macrófagos, mediada por células T CD4⁺, que llevan a la opsonización, fagocitosis y destrucción del patógeno (Bock y col., 1997).

El ganado que se recupera de una infección aguda y que por tanto ha tenido una infección preinmune por un aislamiento medianamente virulento de A. marginale o A. centrale desarrolla resistencia a una reinfección con la misma cepa. En algunos casos el ganado recuperado queda desprotegido o parcialmente protegido contra aislamientos heterólogos (Richey y Palmer, 1990).

Factores solubles de células mononucleares (linfocitos y monocitos) de la sangre de ganado infectado, reducen la proporción de eritrocitos que contienen organismos viables "in vitro", indicando que puede ocurrir un mecanismo independiente de anticuerpos para el control de la rickettsemia durante la anaplasmosis aguda (Wyatt y col., 1996). A pesar de que ante la invasión de este parásito median ambas respuestas, el sistema inmune del hospedero es incapaz de eliminar completamente la infección en la fase crónica de la enfermedad. Esto podría deberse a la variabilidad antigénica de este microorganismo. Se ha visto que tanto en la fase aguda como en la crónica hay un comportamiento de aumento y disminución de los niveles de eritrocitos infectados, lo cual sugiere que participan los mismos mecanismos de respuesta primaria del hospedero para controlar ambos ciclos de rickettsemia (Kieser y col., 1990).

3.5. Epidemiología y control de la anaplasmosis

La existencia de inmunidad previa, la velocidad de transmisión y la edad a la que ocurre el primer contacto con el parásito (primoinfección), determinan el efecto clínico que causará este contacto entre el huésped y el parásito. El cuadro clínico típico de la infección aguda por A. marginale ocurre únicamente en animales adultos susceptibles cuando se transportan a regiones endémicas. En los sitios donde las garrapatas son abundantes la epidemiología de esta enfermedad se caracteriza por la estabilidad enzoótica, que implica la presencia de un alto porcentaje de ganado infectado, con la rara ocurrencia de la enfermedad clínica (Benavides, 1985). Esta relación se mantiene

debido a dos factores: la inmunidad pasiva (anticuerpos), proveída por el calostro y la temprana infección de los terneros, los que se demostró que poseen resistencia innata hasta cerca de los nueve meses de edad. Durante esta edad los animales adquieren la infección sin presentar los signos aparentes de la enfermedad y la inmunidad resultante, una vez establecida, es mantenida en el ganado adulto mediante reinfecciones, sin síntomas clínicos (Cetrá y col., 2000).

En regiones donde la población de garrapatas se reduce artificialmente con un intenso control, se rompe el equilibrio, pues no todos los terneros se infectan antes de los nueve meses de edad, creando así un segmento de ganado susceptible, que muy posiblemente desarrollarán la enfermedad clínica aguda cuando tengan contacto con el hemoparásito tiempo después. Esta situación es conocida como inestabilidad enzoótica, en la cual la enfermedad se vuelve periódicamente aparente, coincidiendo con períodos favorables para la reproducción de las garrapatas (Benavides, 1985).

3.6. Tratamiento y control

Hasta la fecha no se cuenta con un procedimiento efectivo para el control de la anaplasmosis en muchas áreas, a pesar del incremento de los portadores, animales susceptibles, vectores de transmisión y de las cuantiosas pérdidas económicas que provoca (Palmer y col., 1999). Los métodos de control para la anaplasmosis no han cambiando marcadamente durante los últimos 50 años e incluyen el control de los artrópodos, la quimioprofilaxis, la vacunación, y el mantenimiento de los rebaños libres de Anaplasma (Guglielmone y col., 1996; Kocan y col., 2000).

En nuestro país el control de la anaplasmosis se ha llevado a cabo fundamentalmente mediante tratamiento terapéutico, uso de insecticidas y acaricidas y más recientemente con el uso de la vacuna recombinante contra B. microplus (Gavac) (2^{do} Taller Nacional de Control de la garrapata, La Habana, Cuba, 2000).

En muchos casos la infección se controla, en parte, por la administración de bajas dosis de tetraciclina y se estudió el efecto de ésta en el cultivo de células de garrapata, quedando demostrada su utilidad para la evaluación de nuevos antibióticos en el control de la anaplasmosis (Blouin y col., 1998). En los casos clínicos severos se hace necesaria la terapia de soporte, mediante la aplicación de hidratantes, antihistamínicos y analgésicos para eliminar de manera efectiva los estados de portador (Medellín, 2003).

El ganado que se recupera de la infección aguda desarrolla inmunidad protectora, que puede inducirse con vacunas muertas (Montenegro-James, 1991). Sin embargo, la producción de vacunas a partir del microorganismo muerto o de su fraccionamiento, resultó poco conveniente e incosteable, ya que no se había logrado establecer un cultivo "in vitro" donde pudiera replicarse el parásito, lo que obligaba al uso de bovinos vivos. Según Blouin y col., (1998), la propagación de A. marginale en una línea celular derivada de Ixodes scapularis, con potencialidad para ser utilizada como antígeno, constituye un avance importante para el desarrollo de una vacuna mejorada contra la anaplasmosis bovina. Sin embargo, no se debe dejar de tener en cuenta la variabilidad antigénica que se presenta en aislados de regiones geográficamente diferentes.

4. Diagnóstico de la enfermedad

El control de la anaplasmosis, además de requerir de una vacuna efectiva, necesita de métodos de diagnóstico que permitan conocer la prevalencia del microorganismo en las diferentes zonas de los países tropicales y subtropicales, además que permitan identificar de forma segura a los animales portadores para el movimiento de animales a zonas libres del hemoparásito (Camacho y col., 2000).

El diagnóstico diferencial de fiebre, anemia hemolítica aguda e icterus en el ganado adulto incluye babesiosis, eperytozoonosis, theileriosis, leptospirosis, hemoglobinuria bacilar, hemoglobinuria postparto, toxicidad por plantas y ántrax. La ausencia de hemoglobinuria en caso de anemia aguda, apoyada por la identificación positiva del eritrocito parasitado, diferencia estas otras enfermedades hemolíticas de la anaplasmosis clínica (Richey y Palmer, 1990).

El diagnóstico de la anaplasmosis se dificulta debido fundamentalmente a lo difícil de detectar los portadores, ya que no hay síntomas clínicos que lo diferencien de los bovinos no infectados y los cuerpos de inclusión dentro de los glóbulos rojos no son lo suficientemente numerosos como para ser detectados por los métodos tradicionales (Aboytes-Torres y Buening, 1990; Masika y col., 1997).

4.1. Identificación del agente

Entre los métodos utilizados para la detección del agente podemos citar la subinoculación de eritrocitos infectados en animales esplenectomizados, la tinción de Giemsa a los frotis de sangre, ELISA que detecta antígeno y las técnicas moleculares, como hibridación de ácidos nucleicos y PCR (World Organization for Animal Health, 2000).

4.1.1. Estándar de oro

Para la detección de animales infectados persistentemente el método que se considera el estándar de oro, consiste en la subinoculación de eritrocitos infectados con *A. marginale*, a animales susceptibles esplenectomizados. Sin embargo, este procedimiento no es práctico en las pruebas de rutina (Luther y col., 1980) por la manipulación quirúrgica que conlleva y porque proporciona poca información sobre los niveles de parasitemia (Visser y Ambrosio, 1987).

4.1.2. Tinción con Giemsa a los frotis de sangre

Entre otras técnicas utilizadas para detectar el organismo se incluye la tinción con Giemsa a los frotis de sangre (Gainer, 1961). Sin embargo, cuando el animal está en la fase crónica o en el estadio de portador no expresa un elevado nivel de parasitemia como para ser detectado por la tinción (Trueblood y Palmer, 1998).

La tinción con Giemsa es un método confiable, barato y capaz de detectar niveles de parasitemia de 0.1 a 0.2% (Eriks y col., 1989), o sea sólo puede detectar niveles mayores a 10^6 eritrocitos infectados por mililitro de sangre (Gale y col., 1996), además, resulta tedioso, no apropiado para un gran número de muestras e incapaz de discernir con facilidad cuando el eritrocito está invadido por *A. marginale* o por *A. centrale* (Visser y Ambrosio, 1987).

La tinción mediada por anticuerpos puede ser utilizada como una técnica de tinción alternativa. Su mejor aplicación es para detectar *A. marginale* en muestras de sangre tomadas post-mortem para lo que muestra ser más sensible que la tinción con Giemsa para este propósito (Johnston y col., 1980).

4.1.3. ELISA para detectar antígeno

El ELISA para detectar antígeno se desarrolló en el Laboratorio Internacional para la Investigación de enfermedades de animales en Kenya, y en la Universidad de Washington, en los Estados Unidos, mostrando alta sensibilidad y especificidad, además de poder ser diseñado de diferentes maneras (Harlow y Lane, 1988).

El ensayo ELISA desarrollado para detectar antígeno, utilizando anticuerpos monoclonales para epitopes conservados de la proteína de superficie MSP1, logró discriminar entre anaplasmosis y otras enfermedades hemoparasíticas clínicamente similares, sin embargo, la sensibilidad de este ensayo no fue mayor de 0.01 (1,1 % de parasitemia), por lo que la prueba no resultó idónea para la detección de portadores (Trueblood y col., 1991).

4.1.4. Técnicas moleculares

Las sondas de ácidos nucleicos, las cuales hibridan solamente con su secuencia complementaria, constituyen una prueba sensible y específica para el diagnóstico (Engleberg y Eisenstein, 1984). Además la intensidad de la señal de hibridación obtenida se correlaciona con el número de parásitos, dando información del nivel de parasitemia. (Barbet y col., 1986; Wirth y col., 1986).

En el diagnóstico de *A. marginale* se han utilizado sondas de ADN genómico (Ambrosio y Potgieter, 1987) y recombinantes, basadas en ADN (Visser y Ambrosio, 1987; Goff y col., 1988) o ARN (Eriks y col., 1989), pero en ocasiones la limitada sensibilidad de la sonda prohíbe la detección de portadores sanos con muy bajo nivel de parasitemia (Shompole y col., 1989).

Con una sonda de ARNm derivada del gen *msp1 α* , se logró mejorar la sensibilidad detectándose niveles de parasitemia entre 0.0025 y 0.000025 % en los portadores sanos. Esto hace que la prueba sea 4000 veces más sensible que la microscopía óptica, además de que es capaz de detectar la infección en estadios tempranos, lo que resulta de gran importancia para evitar las pérdidas que ocasiona esta enfermedad (Eriks y col., 1989). La sensibilidad de este ensayo resultó útil para la detección de niveles de infección en garrapatas y para la identificación de ganado persistentemente infectado, además de determinar la prevalencia e incidencia de garrapatas infectadas en áreas enzoóticas. El uso de esta sonda ayuda a las estrategias de control racional de la garrapata, combinado con la vacunación, para reducir los daños de la enfermedad (Goff y col., 1988).

Kocan y col., (1998), desarrollaron una sonda de ADN no radioactiva para detectar *A. marginale* en ganado y garrapata, mostrando igual sensibilidad y especificidad que las sondas radioactivas, además de poder ser utilizada en la hibridación "in situ".

La sensibilidad y especificidad del PCR resultan de gran valor para la identificación de patógenos de vectores artrópodos. Este método ha detectado *R. typhi* y *B. burgdorferi* en artrópodos, además de ser utilizado para la identificación de garrapatas infectadas con el aislamiento Virginia de *A. marginale*, usando cebadores diseñados a partir de la secuencia nucleotídica del gen *msp1 β* del aislamiento Florida. Puede ser utilizado para estudios epizootiológicos de garrapatas de campo, en la cual la infección puede ser difícil de detectar por otros métodos. (Stich y col., 1991; Stich y col., 1993).

La infección persistente de *A. marginale* en ovejas fue caracterizada por Palmer y col., (1998), utilizando el PCR (gen *msp5*), pudiendo observar un patrón de persistencia similar al del ganado bovino. Figueroa y col., (1993), desarrollaron una PCR múltiple para la detección de *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* a partir de sangre de bovino, con buenos resultados.

Torioni y col., (1998), optimizaron un PCR "nested" acoplado con análisis de secuencia e hibridación para identificar el gen *msp5* de *A. marginale*, siendo capaz de detectar hasta 30 eritrocitos infectados por mililitro de sangre, lo cual lo hace de 10-100 veces más sensible que los PCR previamente descritos, sondas de ARN y ensayos de hibridación (Eriks y col., 1989; French y col., 1998; Gale y col., 1996; Ge y col., 1996; Ge y col., 1997). El PCR "nested" unido con la hibridación resulta un método altamente sensible y específico para detectar animales infectados con *A. marginale*.

Georges y col., (2001) desarrollaron un método de hibridación reversa y PCR (RLB) de las regiones 16S ó 18S del ARNr para la detección de hemoparásitos en bovinos, demostrando una gran prevalencia de infecciones mezcladas, lo que indica que animales infectados con *Babesia* spp., estaban también infectados con *Theileria* spp. ó *Anaplasma* spp. Un PCR simple basado en el gen *msp1 α* ha logrado diferenciar *A. marginale* en Norte América, pero no se ha probado con aislados de otros lugares (Palmer y col., 2001).

4.2. Diagnóstico serológico

Las pruebas serológicas son de gran importancia para estudios epidemiológicos con el objetivo de caracterizar áreas de estabilidad e inestabilidad enzoótica. La aplicación de estas pruebas resulta relevante en lugares donde se practique el control intensivo de garrapatas, en los centros de inseminación y transferencia de embriones, así como en los lugares donde se produzcan animales de elite o reproductores puros, relacionados también con la industria lechera (<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/naoseriadas/anaplasma/anaplasma.html>).

El diagnóstico serológico incluye pruebas como fijación del complemento, aglutinación en tubos capilares, aglutinación rápida en tarjeta, ensayos de IFI, y las pruebas Dot-ELISA y ELISA. Las pruebas serológicas como fijación del complemento y aglutinación en tarjeta, son los métodos más comúnmente utilizados para detectar animales infectados con *A. marginale* en el campo y fueron métodos aceptados para el movimiento de animales a nivel internacional (World Organization for Animal Health, 2000).

Todos estos ensayos para la detección de anticuerpos utilizan antígenos crudos obtenidos de *A. marginale* parcialmente purificado, lo que provoca que se pierda la sensibilidad y especificidad que se requiere para un diagnóstico eficaz (Montenegro-James y col., 1985,

Kocan y col., 1996). Una parte de los errores que se cometen con estos ensayos, se debe a los resultados falsos positivos, causados por la contaminación con eritrocitos y la presencia de anticuerpos antieritrocitos en el suero de algunos animales. La frecuencia de anticuerpos contra los eritrocitos se ve marcadamente aumentada en el suero de los animales vacunados con vacunas derivadas de sangre, tales como las que se utilizan para *Babesia* spp. (Duzgun y col., 1988). Otra parte de los errores, se deben a las reacciones falso negativas, provocadas en algunos casos por la baja sensibilidad del método o porque algunos ensayos como el de fijación de complemento, no detectan todos los isotipos de las inmunoglobulinas (McGuire y col., 1979).

4.2.1. Fijación del complemento

Esta prueba utiliza el proceso estándar de fijación del complemento. El antígeno consiste de cuerpos de *Anaplasma* que han sido separados del eritrocito por lisis, aunque se utiliza también una técnica que requiere solo pequeñas cantidades de los reactivos (Avon, 1974)

La fijación del complemento ha sido uno de los métodos más utilizados para detectar animales infectados con *A. marginale*, en el campo (González y col., 1978). A pesar de que esta técnica ha sido utilizada por muchos años, existen evidencias de que le falta sensibilidad y tiene errores por su limitada habilidad para detectar bajos niveles de anticuerpos. Puede ser utilizada como una prueba de monitoreo, pero no para los programas de erradicación, ya que muchos animales infectados pueden ser diagnosticados como negativos, pues no es capaz de detectar anticuerpos contra *A. marginale* en animales portadores (McElwain, 2000). Existen otras desventajas entre las que se encuentran la complejidad y laboriosidad que requiere y la baja especificidad y sensibilidad, sobre todo en países donde hay presentes enfermedades hemoprotozoarias (Palmer y col., 1986).

4.2.2. Pruebas de aglutinación

Se han descrito dos pruebas de aglutinación: la aglutinación en tubos capilares y la aglutinación rápida en placa (Amerault y col., 1972). En ambos casos el resultado es leído como positivo o negativo, pero no determina título de anticuerpos. Este último puede llegar a rendir un 2 % de falsos positivos y 16 % de falsos negativos en un estudio controlado. Esta técnica puede ser desarrollada en el laboratorio o en el campo, dando el resultado en muy pocos minutos, pero como se dijo anteriormente, existe un gran problema con las reacciones no específicas (Teclaw y col., 1985).

4.2.3. Inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos (IFI)

Esta prueba ha sido utilizada para el diagnóstico de anaplasmosis y frecuentemente se ha considerado una prueba sensible, sin embargo, por sus características en ocasiones se considera no útil, pues pueden ocurrir reacciones falsas positivas, que se atribuyen al largo período de incubación de esta enfermedad (Goff y col., 1988).

Goff y col., (1988) y Montenegro-James y col., (1985) reportaron ensayos de IFI, los cuales presentan un número alto de reacciones falsas positivas y un alto fondo de fluorescencia. McGuire y col., (1984), realizaron una IFI donde utilizaron como antígeno una muestra cruda de *A. marginale*, contaminado con membranas eritrocitarias, dando

una serie de resultados falsos positivos y falsos negativos en el ganado infectado agudamente y en el convaleciente; en el ganado persistentemente infectado arrojó un porcentaje de falsos negativos. Así mismo, la IFI ha sido utilizada para estudios epidemiológicos (Duzgun y col., 1988; Jongejan y col., 1988).

4.2.4. Dot- ELISA y ELISA

Se han desarrollado pruebas ELISA para identificar anticuerpos contra *A. marginale* en suero bovino (Duzgun y col., 1988; Ndung'u y col., 1995; Knowles y col., 1996). El ELISA es una prueba sensible, específica y brinda la posibilidad de una mejor interpretación de los resultados, comparada con las técnicas antes mencionadas (Duzgun y col., 1988). En 1986, Palmer y McGuire realizaron un ELISA utilizando la proteína MSP3, pero actualmente se ha comprobado que ésta presenta epitopes comunes con *A. ovis* y no se encuentra conservada entre los diferentes aislamientos de *A. marginale* por lo que el uso, en el diagnóstico en general, de la proteína nativa o recombinante no es recomendado (Alleman y Barbet, 1996). El uso de la proteína MSP5 como antígeno ha mostrado buenos resultados en la detección de diferentes especies del género *Anaplasma* (Ndung'u y col., 1995).

Otros ensayos inmunoenzimáticos usan como antígeno epitopes del polipéptido MSP1 (Trueblood y col., 1991) y cuerpos iniciales de *A. marginale*, dando este último reacción cruzada con *A. centrale* (Nakamura y col., 1989). Este tipo de antígeno también se ha usado en pruebas Dot-ELISA obteniéndose buenos resultados (Montenegro-James y col., 1992).

Para mejorar los parámetros de sensibilidad y especificidad se han desarrollado técnicas de diagnóstico utilizando anticuerpos monoclonales (Trueblood y col., 1991) y antígenos recombinantes (Knowles y col., 1996; Torioni y col., 1998). El establecimiento de un ensayo de ELISA competitivo (Torioni y col., 1998), utilizando la proteína recombinante MSP5, permitió el incremento de la sensibilidad a un 96 % y la especificidad de un 95 %, pudiendo detectar las infecciones persistentes del parásito, por lo que los autores sugieren esta técnica para estudios epidemiológicos, programas de erradicación y para la regulación internacional para el movimiento del ganado. La utilización de un rMSP5 cELISA demostró que este es altamente específico para el diagnóstico serológico de anaplasmosis en ganado de Norteamérica.

Reyna-Bello y col., (1998), desarrollaron un ensayo ELISA para el diagnóstico serológico de la anaplasmosis bovina con la proteína MSP5 de *A. marginale*. El ELISA desarrollado con sueros de campo de diferentes regiones geográficas de Venezuela mostró una seroprevalencia de la enfermedad de un 47 %, lo que coincidió con los resultados de los estudios epidemiológicos realizados. Estos resultados confirman la importancia de la MSP5 como un antígeno útil para el diagnóstico serológico de la anaplasmosis bovina. Más recientemente, Bowles y col., (2000), han desarrollado un ELISA comercial para la detección de anticuerpos contra *A. marginale* y *A. centrale* en Australia y Zimbabwe, mostrando una sensibilidad y especificidad en Australia de 100 % y 83.3 %, respectivamente y en Zimbabwe una sensibilidad de un 100 %, no siendo posible calcular la especificidad por la poca cantidad de sueros positivos con que contaban. Estos autores concluyeron que el ELISA es una alternativa útil para los estudios epidemiológicos cuando se compara con la prueba de aglutinación en tarjeta. Braz Junior y col., (2002) desarrollaron un sistema ELISA para la detección de anticuerpos anti *A. marginale* con un 100 % de especificidad y un 94.87 % de sensibilidad.

A pesar de los resultados obtenidos con los ensayos de ELISA, se hace necesaria la existencia de una prueba diagnóstica que se pueda realizar al lado del animal, que resulte sensible y específica, para lo cual la proteína MSP5 recombinante promete ser un fuerte candidato, lo que permitirá un diagnóstico rápido y efectivo de la enfermedad en el campo. Se deben tener muy en cuenta las potencialidades que muestran el gen *msp5* y la proteína MSP5 de *Anaplasma marginale* para la determinación del agente y de anticuerpos contra éste. Trabajos previos han demostrado que la proteína MSP5 de *A. marginale* resulta de gran utilidad en ensayos de formato ELISA (Torioni y col., 1998), ya que elimina los problemas señalados de los antígenos crudos, utilizados en otras técnicas como la aglutinación en tarjeta y que el gen *msp5* es de gran utilidad para el diagnóstico molecular, mediante PCR, en animales persistentemente infectados (Torioni y col., 1998). Este gen y su producto de expresión son recomendados en el monitoreo de animales para el movimiento internacional de ganado y en programas de control de la anaplasmosis bovina (Palmer y McElwain, 1995).

Referencias.

- Aboytes-Torres, R. y Buening, G. H. (1990). Development of a recombinant *Anaplasma marginale* DNA probe. *Vet. Microbiol.* 24: 391-408.
- Alderink, F. G. y Dietrich, R. (1981). Anaplasmosis in Texas: epidemiologic and economic data from a questionnaire survey. *Proc. Natl. Anaplasmosis. Conf.* 7: 27-44.
- Alleman, A. R. y Barbet, A. F. (1996). Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen. *J. Clin. Microbiol.* 34: 270-276.
- Alleman, A. R.; Kamper, S. M.; Viseshakul, N. y Barbet, A. F. (1993). Analysis of *Anaplasma marginale* genome by pulsed-field electrophoresis. *Gene Microbiology.* 139: 2439-2444.
- Alleman, A. R.; Palmer, G. H.; McGuire, T. C.; McElwain, T. F.; Perryman, L. E. y Barbet, A. F. (1998). *Anaplasma marginale* major surface protein 3 is encoded by a polymorphic multigene family. *Infect. Immun.* 65: 156-163.
- Allred, D.R.; McGuire, T.C.; Palmer, G. H.; Leib, S. R.; Harkins, T. M.; McElwain, T. F. y Barbet, A. F. (1990). Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3220-3224.
- Alonso, M. y Blandino, T. (1988). Anaplasmosis bovina. *Sociedad Cubana de Parasitología. Ediciones del Consejo Científico Veterinario de Cuba:* 2-19.
- Alonso, M.; Blandino, T. y Sanchez, A. (1989). Caracterización de cepas de *Anaplasma marginale*. *Rvta. Cub. Cienc. Vet.* 20: 71-78.
- Ambrosio, R. E. y Potgieter, F. T. (1987). The genome of *Anaplasma*: DNA composition and DNA/DNA hybridization. *J. Vet. Res.* 54: 53-65.
- Amerault, T. E; Rose, J. E. y Roby, T. O. (1972). Modified card agglutination test for bovine anaplasmosis: evaluation with serum and plasma from experimental and natural cases of anaplasmosis. *Proceedings of the 76th Annual Meeting of the US Animal Association:* 736-744.
- Avon. (1974). A microtitre technique for the complement fixation test for anaplasmosis. *Veterinary Services, Animal and Plant Health Inspection Service, US Department of Agriculture, Beltsville, MD 20705, USA.*
- Barbet, A. F. y Allred, D. R. (1991). The *msp1β* multigene family of *Anaplasma marginale* nucleotide sequence analysis of an expressed copy. *Infect. Immun.* 59: 971-976.

- Barbet, A. F.; Palmer, G. H.; Myler, P. J. y McGuire, T. C. (1986). Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for popypeptide Am105L. *Infect. Immun.* 55: 2428-2435.
- Bautista-Garfias, C. R.; Angeles, L.; García-Ortiz, M. A.; García-Tapia, D. (2000). Variación de los linfocitos BoCD2+, BoCD4+, y BoCD8+ de sangre periférica, el índice BoCD4:BoCD8 y los anticuerpos IgG en bovinos infectados y retados con aislados de *Anaplasma marginale* de origen mexicano. *Rev Latinoam Microbiol.* 42 (3):101-109.
- Benavides, O., E. (1985). Consideraciones con relación a la Epizootiología de Anaplasmosis y Babesiosis en los bovinos. *Revista ACOVEZ* 9 (31): 4- 11.
- Benavides, E.; Vizcaino, O.; Britto, C. M.; Romero, A. y Rubio, A. (2000). Attenuated trivalent vaccine against babesiosis and anaplasmosis in Colombia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916: 613-616.
- Biberstein, E. L. (1999). *Anaplasmatataceae*. *Vet. Microbiol.*, Blackwel Science Publ.: 304-307.
- Blood, D. C.; Radostits, D. M. y Hennderson, J. A. (1983). *Veterinary Medicine*, 6th ed., Bailliere-Tindall. Eastbourne, Great Britain.
- Blouin, E. F.; Saliki, J. T.; Kocan, K. M. y Rodgers, S. J. (1998). Evaluation of *Anaplasma marginale* from tick cell culture as an immunogen for cattle. *Am. N. Y. Acad. Sci.* 849: 253-258.
- Bock, R. E.; de Vos, A. J.; Kingston, T. G. y McLellan, .D. J. (1997). Effect of breed of cattle on innate resistance of infection with *Babesia bovis*, *B. bigmina* and *Anaplasma marginale*. *Aust. Vet. J.* 75: 337-340.
- Bowles, P. M.; Molloy, J. B.; Blight, G. W.; Singh, S. y Mabikacheche, L. G. (2000). Evaluation of a commercially available ELISA kit for detection of antibodies to *Anaplasma marginale* y *Anaplasma centrale* in cattle in Australia and Zimbabwe. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* 67: 83-86.
- Brayton, K. A., G. H. Palmer, A. Lundgren, J. Yi, and A. F. Barbet (2002). Antigenic variation of *Anaplasma marginale* msp2 occurs by combinatorial gene conversion. *Molecular Microbiology* 43:1151-1159.
- Braz Junior, C. J.; Ribeiro, M. F.; Lima, J. D. Y Passos, L. M. (2002). Development of an ELISA system for detection of anti-*Anaplasma marginale* antibodies in cattle in Brazil. *J. Vet. Med.B. Infect. Dis Vet. Public Health.* 47: 241-248.
- Camacho, M.; Muñoz, M. L.; Suarez, C. E.; McGuire, T. C.; Bronw, W. C. y Palmer, G. H. (2000). Expression of polymorphic msp1 β genes during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia. *Infect. Immun.* 68: 1946-1952.
- Cantor, G.H.; Pontzer, C. H. y Palmer, G.H. (1993). Opsonization of *A. marginale* mediated by bovine antibody against surface protein MSP-1. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 37: 343- 350.
- Cetra, B.; Ramírez, L. M. y Vangini, V. (2000). INTA, Noticias y Comentarios, No. 339.
- Chitravel, V.; Lourdsamy, M.; Ravindranath, T. K.; Prabhakaran, V. y Kokilaprabhakaran, S. (1998). A report on the incidence of anaplasmosis in Jersey bulls. *Indian Vet. J.* 75: 256-257.
- Corona, B.; Albina, E.; Minet, C. y Martínez, S. (2004). Sequence of MSP1 α gene of *A. marginale* Havana isolate. *Rev. Salud Animal.* Vol. 26, No. 1: 72.
- Corona, B.; Camacho, C. y Martínez, S. (2000). Amplificación del gen msp4 en aislamientos cubanos de *Anaplasma marginale* mediante la PCR. *Rev. Salud Animal.* Vol. 22, No. 3: 193-195.

- Cossio B., R.; Rodríguez, D. S.; García O.M.; Garica T.D. y Aboytes-Torres, R. (1997). Bovine anaplasmosis prevalence in northern Veracruz state, Mexico. *Pre. Vet. Med.* 32: 165-170.
- Dame, J. B.; Mahan, S. M. y Yowell, C. A. (1992). Phylogenetic relationship of *Cowdria ruminatum*, agent of heartwater to *Anaplasma marginale* and other members of the order Rickettsiales determined on the basis of 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 270-274.
- de la Fuente J.; García-García, J. C.; Blouin, E. F.; Saliki, J. T. Y Kocan, K. M. (2002a). Infection of tick cells and bovine erythrocytes with one genotype of the intracellular ehrlichia *Anaplasma marginale* excludes infection with other genotypes. *Cli. Diagn. Lab. Immunol.* 9: 658-668.
- de la Fuente, J.; Van Den Bussche, R. A.; García-García, J. C.; Rodríguez, S. D.; García, M. A.; Guglielmone, A. A.; Mangold, A. F.; Friche, Passos, L. M.; Barbosa Ribeiro, M. F.; Blouin, E. F. Y Kocan, K. M. (2002b). Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. *Vet. Microbiol.* 88: 275-285.
- de la Fuente, J.; Bloiun, E. F. y Tocan, K.M. (2003b). Infection Exclusion of the Rickettsial Pathogen *Anaplasma marginale* in the Tick Vector *Dermacentor variabilis*. *Infec. Immun.* 10 (1): 182- 184.
- de la Fuente, J.; Golsteyn, E. J.; Van Den Bussche, R. A.; Hamilton, R. G.; Tanaka, E.; Druhan, S. E. y Tocan, K. M. (2003a). Characterization of *Anaplasma marginale* Isolated from North American Bison. *Appl Environ Microbiol.* 69 (8): 5001–5005.
- Dumler, J. S.; Barbet, A. F.; Bekker, C. P.; Dasch, G. A.; Palmer, G. H.; Ray, S. C. ; Rikihisa, Y. y Rurangirwa, F. R. (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. (2001). *Int. Syst. Evol. Microbiol.* 6: 2145- 2165.
- Duzgun, A.; Schunter, C. A. Wright, I. G.; Leatch, G. y Waltisbuhl, D. J. (1988). A sensitive ELISA technique for the diagnosis of *Anaplasma marginale* infections. *Vet. Parasitol.* 29: 1-7.
- Eid, G.; French, D. M.; Lungren, A. M.; Barbet, A. F.; McElwain, T. F. y Palmer, G.H. (1996). Expression of major surface protein 2 antigenic variants during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia. *Infect. Immun.* 64: 836-841.
- Engleberg, N. C. y Eisenstein, B. I. (1984). The impact of new cloning techniques on the diagnosis and treatment of infectious diseases. *N. Engl. J. Med.* 311: 892-901.
- Eriks, I. S.; Palmer, G. H.; McGuire, T. C. y Barbet, A. F. (1989). Detection and quantification of *Anaplasma marginale* in carrier by using a nucleic acid probe. *Clin. Microbiol.* 27: 279- 284.
- Eriks, I. G., Stiller, D. y Palmer, G. H. (1993). Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2091- 2096.
- Erp, E. y Fahrney, D. (1975). Exit of *Anaplasma marginale* from bovine red blood cells. *Am. J. Vet. Res.* 36: 707-709.
- Figueroa, J. V.; Chieves, L. P.; Johnson, G. S. y Buening, G. M. (1993). Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet. Parasitol.* 50: 69-81.

- Francis, D.H.; Kinden, D. A. y Buening, G. M. (1979). Characterization of the inclusion limiting membrane of *Anaplasma marginale* by immunoferriting labeling. *Am. J. Vet. Res.* 40: 777-782.
- French, D.M.; McElwain, T. F.; McGuire, T. C. y Palmer, G. H. (1998). Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. *Infect. Immun.* 66: 1200- 1207.
- Galade, K. R.; Gartside, M. G.; Dimmock, C. M.; Zakrzewski, H. y Leatch, G. (1996). Peripheral blood lymphocyte proliferate responses in cattle infected with or vaccinate against anaplasmosis. *Parasitol. Res.* 82: 551-562.
- Gale, R. C.; Dimmock, C. M.; Gartside, M. y Leatch, G. (1996). *Anaplasma marginale* detection of carrier cattle by PCR. *Int. J. Parasitol.* 26: 1103-1109.
- Ge, N. L.; Kocan, K. M.; Blouin, E. F. y Murphy, G. L. (1996). Developmental studies of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) infected as adults using nonradiative in situ hybridization and microscopy. *J. Med. Entomol.*, 33: 911-920.
- Ge, N. L.; Kocan, K. M.; Murphy, G. L. y Blouin, E. F. (1997). Development of a nonradioactive in situ hybridization for detection of *Anaplasma marginale* in ticks. *J. Histotechnol.* 20: 103-108.
- Georges, K.; Loria, G. R.; Riilis, S.; Greco, A.; Caracappa, S.; Jongejan, F. y Sparagano, O. (2001). Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridization with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Vet. Parasitol.* 99: 273-286.
- Goff, W.; Barbet, A. F.; Stiller, D.; Palmer, G. H.; Knowles, D.; Kocan, K.; Gorham J. y McGuire, T. C. (1988). Detection of *Anaplasma marginale* infected tick vectors by using a cloned DNA probe. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 919-92.
- González, F.; Long, R. F. y Todorovic, R. A. (1978). Comparisons of the complement-fixation, indirect fluorescent antibody, and card agglutination test for the diagnosis of bovine anaplasmosis. *J. Am. Vet. Res.* 39: 1538-1541.
- Guglielmone, A. A.; Anziani, O. S.; Mangold, A. J.; Volpogni, M.N. y Vogel, A. (1996). Enrofloxacin to control *Anaplasma marginale* infections. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 791: 471-472.
- Hans, A. S. (2001). <http://www.capra.iespana.es/capra/datos/andes>.
- Harlow, E. y Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory: 559.
- Hidalgo, R. J.; Jones, W. E.; Bronw, J. E. y Ainsworth, J. A. (1989). *Anaplasma marginale* in tick cell culture. *American Journal Veterinary Research.* 50: 2028-2032.
- Hugh-Jones, M. E.; Scotland, K.; Appewhaiti, L. M. y Alexander, F. M. (1988). Seroprevalence of anaplasmosis and babesiosis in livestock on St. Lucia, 1993. *Trop. Anim. Health Prod.* 20: 137- 139.
- Inokuma, H., Brouqui, P., Drancourt, M., y Raoult, D. (2001). Citrate Synthase Gene Sequence: a New Tool for Phylogenetic Analysis and Identification of Ehrlichia. *Clin. Microbiol.* Vol. 39, (9): 3031-3039
- Informe Primer Trimestre, IMV. (2000). Informe del Instituto de Medicina Veterinaria de Cuba, 2000.
- Johnston, L. A. Y.; Trueman, K. F.; Leatch, G.; y Wilson, A. J. (1980). A comparison of direct fluorescent antibody and Giemsa staining for the post-mortem diagnosis of anaplasmosis. *Aust. Vet. J.* 56: 116-118.
- Jongejan, F.; Perry, B. D.; Moorhouse, P. D. S.; Musisi, F. L.; Pegram, R. G. y Snacken, M. (1988). Epidemiologic of bovine babesiosis in livestock on St Lucia, 1983. *Trop. Anim. Health Prod.* 20: 137-139.

- Kano, F. S.; Vidotto, O.; Pacheco, R. C. y Vidotto, M. C. (2002). Antigenic characterization of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. *Vet Microbiol.* 87: 131-138.
- Kessler, R. H. (2001). Consideracoes sobre a transmissao de *Anaplasma marginale*. *Pesq. Vet. Bras.* 21 (4): 177-179.
- Kieser, S. T.; Eriks, I. S. y Palmer, G. H. (1990). Cyclic rickettsemia during persistent anaplasmosis infection in cattle. *Infect. Immun.* 58: 1117-1119.
 - Kinhm, U. (2002). Anaplasmosis bovina en Suiza. *Informaciones Sanitarias.* 15 (37): 177.
- Knowles, D.; Torioni- De-Echaide, S.; Palmer, G. H.; McGuire, T. C.; Stiller, D. y McElwain, T. F. (1996). Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *Clin. Microbiol.* 34: 2225-2230.
- Kocan, K. M.; Blouin, E. F.; Palmer, G. H.; Eriks, I. S. y Edwards, W. L. (1996). Strategies to interrupt the development of *Anaplasma marginale* in its tick vector. The effect of bovine derived antibodies. *Am. N. Y. Acad. Sci.* 791: 157- 165.
- Kocan, K.M.; Blouin, E. F. y Barbet, A. F. (2000). Anaplasmosis control. Past, present and future. *Ann. NY. Acad. Sci.* 966: 501- 509.
- Kocan, K. M.; hair, J. A.; Edwing, S. A. y Stralton, L. G. (1981). Transmision of *Anaplasma marginale* Theiler by *Dermacentor andersoni* Stiler and *Dermacentor variabilis* (say). *Am. J. Vet. Res.* 42: 15- 18.
- Kocan, K. M.; Ge, N. L.; Blouin, E. F. y Murphy, G. L. (1998). Development of a non-radioactive DNA probe and in situ hybridization for detection of *Anaplasma marginale* in tick and cattle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 791: 157-165.
- Kocan, K. M.; Holbert, D.; Edwars, W.; Ewing, S. A.; Barron, S. J. y Hair, JA. (1986). Longevity of colonies of *Anaplasma marginale* in midget epithelial cells of *Dermadencentor andersoni*. *Am. J. Vet. Res.* 47: 1657-1661.
- Lew, A. E.; Bock, R. E.; Minchin, C. M.; Masaka, S. (2002). A msp1 α polimerase chain reaction assay for spesific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. *Vet. Mycrobol.* 86:
- Luther, D. G.; Cox, H. V. y Nelson, W. O. (1980). Comparison of serotests with calf inoculation for detection of carriers in anaplasmosis infected cattle. *Am. J. Vet. Res.* 41: 2085-2086.
- Martínez, S.; Corona, B.; Minet, C. y Albina, E. (2004). Comparación de las secuencias de los genes msp5 y msp α de los asilados habana y Florida de *A. marginale*. *Rev. Salud Animal.* Vol. 26, No. 2: 73- 81.
- Masika, P. J.; Sonandi, A. y Van Averbeke, W. (1997). Perceived causes, diagnosis and treatment of babesiosis and anaplasmosis in cattle by livestock farmers in communal areas of the Central Eastern Cape Province, South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 68: 40-44.
- Medellín, J. A. (2003). Comunidad Virtual de veterinaria.org. (<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080803.html>).
- Melendez, R. D. y Forlano, M. (1997). Seroprevalence and incidence of babesiosis and anaplasmosis in a Corora breed herd from Venezuela. *Revista Brasileira de Parasitología Veterinaria.* 6: 105- 109.
- McElwain, T. F. (2000). Bovine anaplasmosis. Chapter 2.3.7. In *Manual of standads for diagnostic test and vaccine*, 4th edition. O.I.E., Paris: 399- 341.
- McGarey, D. J. y Allred, D. R, (1994). Characterization of hemagglutinating components of the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. *Infect. Immun.* 62: 4587-4593.

- McGarey, D. J.; Barbet, A. F.; Palmer, G. H.; McGuire, T. C. y Allred, D. R. (1994). Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polipeptides (MSP) 1a and 1b. *Infect. Immun.* 62: 4594-4601.
- McGuire, C. T.; Palmer, G. H.; Goff, W. L.; Johnson, M. I. y Davis, W.C. (1984). Common and isolate-restricted antigens of *Anaplasma marginale* detected with monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 43: 697-700.
- McGuire, T. C.; Davis, W. C.; Brassfield, A. L.; McElwain, T. F. Y Palmer, G. H. (1991). Identification of *Anaplasma marginale* long-term carrier cattle by detection of serum antibody to isolated MSP3. *J. Clin. Microbiol.* 29: 788-793.
- McGuire, T. C.; Musoke, A. J. y Kurtti, T. (1979). Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement macrophages, neutrophils and skin. *Immunol.* 38: 249-256.
- Meeus, P. F.; Brayton, K. A.; Palmer, G. H. y Barbet, A. F. (2003). Conservation of a gene conversion mechanism in two distantly related paralogues of *Anaplasma marginale*. *Mol. Microbiol.* 47: 633-643.
- Montenegro-James, S.; Guillen, A. T. y Toro, M. (1992). Dot-ELISA para el diagnóstico serológico de anaplasmosis y babesiosis bovinas. *Rvta. Cub. Cienc. Vet.* 23: 15-24.
- Montenegro-James, S.; James, M. A. y Ristic, M. (1985). Efficacy of purified *Anaplasma marginale* initial bodies as a vaccine against anaplasmosis. *Parasitol. Res.* 77: 93-101.
- Montenegro-James, S.; James, M. A.; Toro Benitez, M.; Leon, E.; Back, B. K. and Guillen, A. T. (1991). Efficacy of purified *Anaplasma marginale* initial bodies as a vaccine against anaplasmosis. *Parasitol. Res.* 77:93-101.
- Munderloh, U. G.; Blowin, E. F.; Kocan, K. M.; ge-Nie Lin, Edwards, W. L. Y Kurtti, T. J. (1996). Stablishment of the tick (Acari: Ixodidae)- borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in tick cell culture. *J. Med. Entomol.* 32: 656-664.
- Munodzana, D.; McElwain, T. F.; Knowles, D.P. y Palmer, G. H. (1998). Conformational dependence of *Anaplasma marginale* MSP5 surface exposed B cell epitopes. *Infect. Immun.* 66: 2619-2624.
- Nakamura, Y.; Shimizu, S.; Minami, T. y Ito, S. (1989). Enzyme-linked immunosorbent assay using solubilised antigen for detection of antibodies to *Anaplasma marginale*. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 20: 259-266.
- Narciandi, R. E. (1999). Desarrollo y producción de las principales proteínas recombinantes del VIH 1 y 2. Tesis de Doctorado, CIGB, La Habana, Cuba.
- Ndungú, L.W.; Aguirre, C.; Rurangirwa, R. R.; McElwain, T. F.; McGuire, T. C.; Knowles, D. P. y Palmer, G. H. (1995). Detection of *Anaplasma ovis* infection in goats using the MSP5 competitive inhibition Enzyme-linked. *J. Clin. Microbiol.* 33: 675-679.
- Oberle, S.; Palmer, G. H.; Barbet, A. F. y McGuire, T. C. (1988). Molecular size variations in an inmunoprotective complex among isolates of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.* 56(6): 1557-1563.
- Oberle, S. M.; Palmer, G. H. y Barbet, A. F. (1993): Expression and immune recognition of the conserved MSP4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.* 61(12):5245-5251.
- Oliveira, S.B.; Madruga, C. R.; Schenk, M. A. Kessler, R. H.; Miguita, M. Y Araujo, F. R. (2003). Antigenic characterization of Brazilian isolates of *Anaplasma marginale*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98: 395-400.
- Palmer G. H.; Rurangirwa, F. R.; Kocan, K. M. y Brown, W.C. (1999). Molecular basis for vaccine development against ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitol. Today.* 7:281-286.

- Palmer, G. H. y McElwain, T. F. (1995). Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Vet. Parasit.* 57: 233-253.
- Palmer, G. H. y McGuire, T. C. (1984). Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *Infect. Immun.* 13: 1010-1015.
- Palmer, G. H. y McGuire, T. C. (1990). Rickettsial antigens for vaccination and diagnosis, Washington State University Research Foundation.
- Palmer, G. H.; Abbott, J. r.; French, D. M. y McElwain, T. F. (1998). Persistence of *Anaplasma ovis* infection and conservation of the MSP2 and MSP3 multigene families within the genus *Anaplasmataceae*) to calves and shep. *J. Med. Entomol.* 36: 321-324.
- Palmer, G. H.; Barbet, A. F.; Cantor, G. H. y McGuire, T. C. (1989). Immunization of cattle with the MSP1 surface protein complex induces protection against a structurally variant *Anaplasma marginale* isolate. *Infect. Immun.* 59: 3340-3342.
- Palmer, G. H.; Barbet, A. F.; Kuttler, K.L. y McGuire, T.C. (1986). Detection of *Anaplasma marginale* common surface proteins in all stages of infection. *J. Clin. Microbiol.* 23: 1078-1083.
- Palmer, G. H.; Barbet, A. F.; Musoke, A. J.; Katende, J. M.; Rurangirwa, F.; Shkap, V.; Pipano, E.; Davis, W. C.; McGuire, T. C. (1988). Recognition of conserved surface protein epitopes on *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale* isolates from Israel, Kenia y The United States. *International Journal for Parasitology.* 18: 33-38.
- Palmer, G. H.; Brown, W. C. y Rurangirwa, F. R. (2000). Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Microbes and Infections.* 2: 167.
- Palmer, G. H.; Eid, G.; Barbet, A. F.; McGuire, T. C. y McElwain, T. F. (1994). The immunoprotective *Anaplasma marginale* major surface protein-2 (MSP2) is encoded by a polymorphic multigene family. *Infect. Immun.* 62: 3808-3816.
- Palmer, G. H.; Rurangirwa, F. R. Y McElwain, T. F. (2001). Strain composition of the ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a mammalian reservoir for tick transmission. *J. Clin. Microbiol.* 39: 631-635.
- Payne, R. C. y Scott, J. M. (1982). Anaplasmosis and Babesiosis in El Salvador. *Trop. Anim. Health Prod.* 14: 75- 80.
- Potgieter, F. T.; Kocan, K.; McNew, R. W. y Ewing, S. A. (1993). Demonstration of colonies of *Anaplasma marginale* in the midgut of *Rhipicephalus simus*. *Am. J. Vet. Res.* 44: 2256-2261.
- Rey, C.; Aso, P. M. y Coronado, A. (2003). Homologous and heterologous immune reactions between Venezuelan geographic isolates of *Anaplasma marginale*. *Ann. NY. Acad. Sci.* 916: 658-661.
- Reyna-Bello, A.; Cloeckert, A.; Vizcaíno, N.; Gonzatti, M. I.; Aso, P. M.; Dubray, G. y Zygmunt, M. S. (1998). Evaluation of an Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in Venezuela. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* Vol. 5. 2: 259-262.
- Ribeiro, M. F.; Passos, L. M. (1996). Ultrastructural alterations on *Anaplasma marginale* caused by dimethyl sulfoxide. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 48: 657-664.
- Richey, E. J. (1981). Bovine anaplasmosis, in *Current Veterinary Theraphy Food Prctice*, Howard, R. J., Ed., W. B. Saunders. Philadelphia, 767.
- Richey, E. J. y Palmer, G. H. (1990). Bovine Anaplasmosis. *The Compendium Food Animal.* 12: 1661-1669.
- Ristic, M. (1968). Anaplasmosis. p. 474-537. In: *Blood Diseases of Man and Animals.* Vol. II. Weinman, D. Ristic, M, (eds)). Academic Press, Inc., New York, NY.

- Ristic, M. y Watrach, A. M. (1963). Anaplasmosis. VI. Studies and hypothesis concerning the cycle of development of the causative agent. *Am. Vet. Res.* 24: 267-277.
- Ristic, M. y Kreir, J. P. (1984). Anaplasma. p. 719-722. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Kreig, N. R., Holt, J. B. (eds.) Vol. 1, Baltimore Williams and Wilkins.
- Shkap, V.; Pipano, E.; McGuire, T. C. y Palmer, G. H. (2002). Identification of immunodominant polypeptides common between *Anaplasma centrale* y *Anaplasma marginale*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 29: 31-40.
- Shompole, S. P.; Waghela, S. D.; Rurangirwa, F. R. y McGuire, T. C. (1989). Cloned DNA probes identify *Anaplasma ovis* in goats and reveal a high prevalence of infection. *J. Clin. Microbiol.* 27: 2730-2735.
- Smith, R. D.; Levy, M. G.; Kuhleschmidt, M. S.; Adams, J. H.; Rzechula, D. G.; Hardt, T. A. y Kocan, K. M. (1986). Isolate of *Anaplasma marginale* not transmitted by ticks. *Am. J. Vet. Res.* 47: 127-129.
- Spath, E. J. A. (2003). <http://www.inta.gov.ar/balcarse/gsa/inform-epidem/comercio/htm>.
- Stich, R. W.; Bantle, J. A.; Kocan, K. C.; Eriks, J. S. y Palmer, G. H. (1991). Preliminary development of a Polymerase Chain Reaction assay for *Anaplasma marginale* in ticks. *Infect. Immun.*: 269-274.
- Stich, R. W.; Kocan, K. M.; Damian, R. T., Fechheimer, M. (1997). Inclusion appendages associated with the intraerythrocytic rickettsial parasite *Anaplasma marginale* are composed of bundled actin filaments. *Protoplasma.* 199: 93-98.
- Stich, R. W.; Bantle, J. A. y Kocan, K. C. y Fekete, A. (1993). Detection of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in hemolymph of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) with the polymerase chain reaction. *J. Medical Entomology.* 30: 781-788.
- Swift, B. L. y Thom, G. M. (1983). Bovine anaplasmosis elimination of the carrier state with injectable long-acting oxytetracycline. *Am. J. Vet. Med. Assoc.* 183: 63-65.
- 2^{do} Taller Nacional de Control de la Garrapata (2002). La Habana, Cuba, 2002.
- Tebele, N. y McGuire, T. C. (1991). Induction of protective immunity using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infect. Immun.* 59: 3199-3204.
- Teclaw, R. F.; García, Z.; Romo, Z. y Wagner, G. C. (1985). Incidente of babesiosis and anaplasmosis infection in cattle sampled monthly in the Mexican states of Nuevo Leon and San Luis. *Prev. Vet. Med.* 3: 427-435.
- Torioni, E. S.; Knowles, D. P.; McGuire, T. C.; Palmer, G. H.; Suarez, C. E. y McElwain, T. F. (1998). Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in an endemic region using nested PCR and recombinant MSP5-cELISA. *Clin. Microbiol.* 36: 777-782.
- Trueblood, E. S.; McGuire, T. C. y Palmer, H. (1991). Detection of *Anaplasma marginale* rickettsemia prior to onset of clinical signs by using an antigen capture enzyme linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1542-1544.
- Trueblood, S. E. y Palmer, G. H. (1998). Anaplasmosis: A Review of Diagnostic Techniques. 8th National Veterinary hemoparasite Disease Conference.
- Vidotto, M. C.; Andrade, G. M.; Palmer, G. H.; McElwain, T. F. Y Knowles, D. P. (1998). Seroprevalence of *Anaplasma marginale* on cattle in Parana State, Brazil, by major surface protein 5 competitive enzyme linked immunosorbent assay. *Ann. NY Acad. Sci.* 849: 424-426.
- Vidotto, M.; McGuire, T.C.; McElwain, T. F.; Palmer, G. H. y Knowles D. P. (1994). Intermolecular relationships of major surface proteins of *A. marginale*. *Infect. Immun.* 62: 2940-2946.

- Viseshakul y col. (2002). Sequence and expression analysis of a surface antigen gene family of the rickettsia *Anaplasma marginale*. Department of Pathobiology, University of Florida. PO Box 110880.
- Visser, E. S.; McGuire, . C.; Palmer, G. H.; Davis, W. C.; Shkap, V.; Pipano, E. y Knowles, D. P. JR. (1992). The *Anaplasma marginale* msp5 genes encoded 19 kDa protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infect. Immun.* 60: 5139-5144.
- Visser, E. y Ambrosio, R. E. (1987). DNA probes for detection of *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale*. *Onderstepoort. J. vet. Res.* 54: 623-627.
- Walade, S. M.; Young, A. S. y Marzaria, S. P. (1996). Artificial feeding of Ixoded ticks. *Parasitol. Today.* 12: 272-278.
- Walker, D. H. y Dumler, S. D. (1996). Emergence of the ehrlichioses as human health problems. *Emerging Infect.* 2: 18-29.
- Wickwire, K. B.; Kocan, K. M. y Barron, S. J. (1987). Infectivity of three *Anaplasma marginale* isolates for *Dermacentor andersoni*. *Am. J. Vet. Res.* 48: 96- 99.
- Wirth, D. F.; ogers, W. O.; Barker, .; Dourado, Jr. H.; Suesebang, L. y Albuquerque, B. (1986). Leishmaniasis and malaria: new tools for epidemiologic analysis. *Science.* 234: 975-979.
- World Organization for Animal Health. (1996, 2000). Manual of standards for diagnostic test and vaccines: 295-300. World Organization for Animal Health, Paris, France.
- Wyatt, C. R.; Davis, W. C.; Knowles, D. P.; Goff, W. L.; Palmer, G. H. y McGuire, T. C. (1996). Effect on intraerythrocytic *Anaplasma marginale* of soluble factors from infected calf blood mononuclear cells. *Infect. Immun.* 64: 4846-4849.
- Yeruham, J. y Braverman, Y. (1981). The transmission of *Anaplasma marginale* to cattle by blood- sucking arthropods. *Refuah. Vet.* 38: 37-44.
- Zaugg, J. L. (1990). Seasonally of natural transmission of bovine anaplasmosis under desert mountain range conditions. *Jauma.* 196: 1106-1109.
- Zaugg, J. L.; Goff, W. L.; Foreyt, W. y Hunter, D. L. (1996). Susceptibility of elk (*Cervus elaphus*) to experimental infection with *Anaplasma marginale* y *Anaplasma ovis*. *J. Wildl. Dis.* 32: 62-66.
- Zaugg, J. L.; Stiller, D.; Coan, M. E. y Lincoln, S. D. (1986). Transmission of *Anaplasma marginale* (Theiler) by males of *Dermacentor andersoni* (Stiles) fed on an Idaho field infected chronic carrier cow. *Am. J. Vet. Res.* 47: 2269-2271.

Trabajo recibido el 07.01.05 nº de referencia 050504_REDNET. Enviado por su autor principal, miembro de la [Comunidad Virtual Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)®. Publicado en [REDNET](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet)® el 01/05/05.

Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica en su totalidad o parcialmente, siempre que se cite la fuente, enlace con [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org) - [www.veterinaria.org](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet) y [REDNET](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet)® y se cumplan los requisitos indicados en [Copyright](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet)

(Copyright) 1996-2005. [Revista Electrónica de Veterinaria REDNET](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet)®, ISSN 1695-7504 - [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)®