



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**

Informe de Trabajo Final presentado para optar al Grado de  
Médico Veterinario

Modalidad: Monografía / Trabajo de investigación.

*“Transmisión transestadial de Anaplasma marginale por  
la garrapata Amblyomma tonelliae”*

Alumno: Pedro Agustín Vidosa DNI: 36.479.210

Director: José María Raviolo

Co-Director: Matilde Mazzucco Panizza

Río Cuarto – Córdoba

Mes/Año: 10/2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO  
FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACION

Título del trabajo: Transmisión transestadial de *Anaplasma marginale* por la garrapata *Amblyomma tonelliae*

Autor: Vidosa, Pedro Agustin

D.N.I: 36.479.210

Director: Raviolo, Jose Maria

Co-Directora: Mazzucco Panizza, Matilde Nahime

Aprobado y corregido de acuerdo con la sugerencia de la comisión evaluadora:

Sambuceti, Nicolas

.....

Lovera, Hernan

.....

Fecha de presentación:

.....

Académico

Secretario

## ÍNDICE

### Índice

AGRADECIMIENTOS.....	I
RESUMEN.....	II
ABSTRACT .....	III
INTRODUCCIÓN .....	4
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	6
Historia de la anaplasmosis bovina .....	6
Agente etiológico .....	6
Epidemiología .....	6
Patogenia .....	11
Signos clínicos.....	12
Diagnóstico.....	12
Tratamiento .....	14
Prevención y control.....	14
OBJETIVOS.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
Primera etapa: infección experimental de garrapatas .....	19
Segunda etapa: infestación experimental de terneros susceptibles .....	22
RESULTADOS .....	24
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN .....	26
BIBLIOGRAFÍA.....	28

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al profesor MV Jose M. Raviolo y a la co-directora MV Matilde Nahime Mazzucco Panizza por su gran ayuda y colaboración en cada momento de consulta y soporte en este trabajo de investigación.

Al INTA Rafaela por la oportunidad y las herramientas para llevar a cabo este proyecto, desde lo técnico hasta lo financiero. A Paola Amrhedt por realizar los análisis serológicos, Ramón Mansilla por su colaboración en el mantenimiento de los animales y a todo el equipo de inmunología y parasitología por su trabajo, acompañamiento y actitud crítica.

A la UNRC por brindarme una formación de calidad como profesional y persona. A la empresa donde trabajé por darme tiempo necesario y el recurso financiero para poder cumplir con este logro.

Por último, a mi familia y amigos por ser pilares fundamentales en mi vida y educación y haberme mantenido firme durante este tiempo que comprendió mi carrera como Médico Veterinario.

## RESUMEN

La anaplasmosis bovina es una enfermedad infecciosa que provoca importantes pérdidas económicas en la Argentina. Es producida por *A. marginale*, una rickettsia que puede ser transmitida por dípteros hematófagos, fómites con sangre contaminada, garrapatas duras o vía transplacentaria. Se conoce poco sobre la transmisión de *A. marginale* por las garrapatas del género *Amblyomma* que parasitan al bovino. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la transmisión transtadial de *A. marginale* en la especie de garrapata *Amblyomma tonelliae*. Se alimentaron larvas y ninfas de *A. tonelliae* a partir de un ternero inoculado con la cepa S1P de *A. marginale*. Las ninfas y adultos resultantes del proceso de muda, se alimentaron sobre terneros susceptibles esplenectomizados. Durante 90 días se realizaron pruebas de observación directa (frotis), serológicas (ELISA) y moleculares (PCR) para detectar la presencia de *A. marginale* en los terneros susceptibles. Al finalizar dicho periodo todas las técnicas de detección resultaron negativas. Se concluye que la garrapata

*A. tonelliae* no fue capaz de transmitir transtadialmente la cepa S1P de *A. marginale* bajo las condiciones de este ensayo. Se propone seguir haciendo ensayos con otras cepas de *A. marginale* dado que existen reportes de variación en la transmisión según diferentes genotipos de *A. marginale*.

### ABSTRACT

Bovine anaplasmosis is an infectious disease that causes significant economic losses in Argentina. It is produced by *A. marginale*, a rickettsia that can be transmitted by hematophagous diptera, fomites with contaminated blood, hard ticks or transplacentally. Little is known about the transmission of *A. marginale* by ticks of the genus *Amblyomma* that parasitize cattle. The objective of this study was to evaluate the transstadial transmission of

*A. marginale* in the tick specie *Amblyomma tonelliae*. Larvae and nymphs of *A. tonelliae*—were fed on a calf inoculated with *A. marginale* (S1P strain). After the moulting process, nymphs and adults were fed on splenectomized susceptible calves. For 90 days, direct observation (smear), serological (ELISA) and molecular (PCR) tests were made to detect the presence of *A. marginale* in susceptible calves. At the end of this period, all detection techniques were negative. It is concluded that the tick *A. tonelliae* is not a competent vector for the S1P strain of *A. marginale* under the se experimental conditions. It is proposed to continue the research, since strains of *A. marginale* differ in transmission efficiencie according to different genotypes.

## INTRODUCCIÓN

La anaplasmosis de los bovinos es una enfermedad infecciosa producida por la rickettsia *Anaplasma marginale* que infecta únicamente los eritrocitos maduros, produciendo anemia hemolítica con consecuente pérdida de peso, pérdida de producción, abortos y muerte (Kocan *et al.*, 2003).

Su distribución es mundial, siendo endémica en zonas tropicales y subtropicales con presentaciones esporádicas en zonas templadas.

En Argentina la zona endémica abarca desde el norte del país al paralelo 33°S, siendo una gran limitante para la incorporación de reproductores con alto potencial genético para mejorar el rendimiento productivo de los establecimientos ganaderos. En rodeos considerados de estabilidad enzoótica la enfermedad pasa desapercibida, pero existen factores ambientales y de manejo que pueden alterar este equilibrio y desencadenar brotes de anaplasmosis. Al sur del paralelo 33°S, se dan brotes esporádicos generalmente asociados a movimientos de hacienda desde la zona endémica a la naturalmente libre (Mangold, 2005; Mangold y Mastropaolo, 2013).

La enfermedad tiene un período de incubación promedio de aproximadamente 30 días, seguido de una etapa aguda de una semana de duración, durante la cual *A. marginale* se multiplica activamente dentro de los eritrocitos, causando rickettsemias que varían entre el 10 y el 70% en los casos más severos. Los eritrocitos abandonados, son fagocitados y destruidos por las células del sistema retículo endotelial principalmente en el hígado y bazo. La enfermedad se caracteriza por hipertermia, palidez de las mucosas, ictericia, aborto y muerte.

Si bien los bovinos de cualquier edad pueden contraer la infección, la mayoría de los casos de anaplasmosis clínica ocurre en bovinos adultos. Los animales que se infectan antes de los 9 meses de edad, por lo general padecen enfermedad subclínica o inaparente. Los bovinos que superan la enfermedad permanecen infectados persistentemente y obtienen una inmunidad duradera. Las técnicas de biología molecular, permitieron demostrar que en portadores crónicos de *A. marginale* se producen ciclos continuos de rickettsemia con intervalos aproximados de 5 semanas. Estos ciclos están asociados a variaciones antigénicas que ocurren en las moléculas de la superficie de *A. marginale* (Kieser, Eriks, y Palmer, 1990).

Las formas de propagación de la anaplasmosis bovina incluyen la transmisión biológica por garrapatas, mecánica por dípteros hematófagos, garrapatas, objetos punzantes, y la vía transplacentaria. A pesar de estar encuadrada como una de las “enfermedades transmitidas por garrapatas”, en la actualidad el rol de estos artrópodos en la epidemiología de la anaplasmosis no está completamente dilucidado. Estudios de las últimas décadas han estado enfocados en la garrapata común del ganado bovino, *Rhipicephalus (Boophilus)*

*microplus*, con resultados contradictorios (Coronado, 2001). En países libres de *R. microplus* se han descripto como transmisores biológicos a garrapatas del género *Dermacentor* (Kocan *et al.*, 2004). En nuestro país, además de *R. microplus*, algunas especies del género *Amblyomma* pueden parasitar al bovino. Los estudios y conocimientos sobre la posible transmisión biológica de *A. marginale* por garrapatas del género *Amblyomma* son escasos.

El presente trabajo se propone evaluar la competencia vectorial de *Amblyomma tonelliae*, una garrapata de la región argentina del Chaco árido (Tarragona *et al.*, 2015) capaz de cumplir la totalidad de su fase parasítica sobre el bovino, para transmitir *A. marginale*.

Los procedimientos realizados sobre animales fueron revisados y avalados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) del Centro Regional Santa Fe-INTA.



## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Historia de la anaplasmosis bovina

En el año 1893 Smith y Kilborne (1893), estudiando la babesiosis descubrieron en los márgenes de los eritrocitos cuerpos cocoides de 0,2 a 0,5  $\mu$  de diámetro. Clasificaron a estas formas como un estadio del ciclo de las babesias. Theiler (1910) en Sudáfrica, describió un microorganismo carente de citoplasma y ubicado en el margen del eritrocito por lo que propuso el término de *Anaplasma marginale*, diferenciándolo del agente causal de la babesiosis. Un año después describió una nueva especie que denominó *Anaplasma centrale* (Theiler, 1911) por su ubicación preferentemente central dentro del eritrocito.

### Agente etiológico

La rickettsia *Anaplasma marginale* tiene como hospedador vertebrado a los rumiantes. Se encuentra dentro del orden *Rickettsiales*, familia *Anaplasmataceae*, género *Anaplasma* (Dumler *et al.*, 2001). Es una bacteria estrictamente intracelular, que infecta al eritrocito bovino y se localiza en los bordes en forma de corpúsculos de 0,3 a 0,8  $\mu$ m de diámetro. Contiene proteínas principales de superficie o membrana (MSP), que generan la respuesta inmune del hospedero contra el patógeno. Se han caracterizados seis MSPs y algunas de ellas presentan un polimorfismo variable entre distintos aislamientos de *A. marginale* (Tebele y McGuire, 1991).

### Epidemiología

En Argentina es endémica en el norte y en las provincias de Santa Fe, Córdoba y Entre Ríos, con apariciones esporádicas en zonas templadas naturalmente libres de la enfermedad, como la provincia de Buenos Aires y La Pampa (Mangold y Mastropaolo, 2013).

En gran parte de los rodeos en zonas endémicas, la anaplasmosis se encuentra en equilibrio enzoótico: los bovinos antes del año de edad se infectan de manera natural sin sufrir enfermedad clínica (Guglielmone, 1995). Esto se debe a la inmunidad pasiva provista por el calostro y a que poseen resistencia innata hasta cerca de los nueve meses de edad, explicada por la presencia de hemoglobina fetal, mayor competencia del timo, y sistema hematopoyético más activo (Richey y Palmer, 1990). Ante la ocurrencia de un brote pueden presentarse un 40% de morbilidad y 50% de mortalidad (Guglielmone, 1995), generalmente por movimientos de hacienda desde la zona endémica a la naturalmente libre (Mangold y Mastropaolo, 2013). Un bovino infectado que se recupera queda como portador crónico de *A. marginale* de por vida, este animal tendrá anticuerpos y glóbulos rojos parasitados en un porcentaje a veces indetectable, lo cual tiene importancia epidemiológica debido a que es una fuente de contagio para los no infectados (Alcaraz, 1999).

Las vías de transmisión son a partir picaduras de garrapatas, dípteros hematófagos (Richey y Palmer, 1990) o en forma iatrogénica a través de material quirúrgico contaminado (Palmer *et al.*, 2000). Además, existe la transmisión vertical (Zaugg, 1985).

### ***Transmisión por garrapatas***

La transmisión biológica de *A. marginale* fue descrita en distintas especies de garrapatas duras de los géneros *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Hyalomma* y *Amblyomma* (Kocan *et al.*, 2004). En el ciclo de transmisión, los eritrocitos infectados son ingeridos por la garrapata y los corpúsculos de *Anaplasma* invaden las células del intestino donde se multiplican e infectan otros tejidos, incluyendo las glándulas salivales desde donde alcanzan, vía saliva, a los bovinos susceptibles (Kocan *et al.*, 2003). La transmisión puede ocurrir de manera intraestadial (dentro del mismo estadio) o transestadial (de un estadio al siguiente, a través de la muda). También existe la transmisión transovárica como es el caso de *Babesia spp.* (Bock *et al.*, 2001). Esta vía no ha sido demostrada fehacientemente para *A. marginale* (Coronado, 2001).

El cuerpo o idiosoma de las garrapatas tiene la estructura característica de los arácnidos: más largo que ancho (Anderson y Magnarelli, 2008). El gnatosoma está formado por el capítulo, que incluye los quelíceros (utilizados para cortar y rasgar la piel), los palpos y el hipostoma con el que se fijan al hospedero (Anderson y Magnarelli, 2008; Sonenshine, 1991). Las garrapatas duras contienen escudo dorsal. En el caso de los machos, es completo. Mientras que en las hembras, ninfas y larvas el escudo es incompleto, recubriendo exclusivamente la porción anterior. Los adultos y las ninfas presentan cuatro pares de patas, las larvas sólo tienen tres pares, por otro lado, las ninfas y las larvas no poseen poro genital como en los adultos. Los machos y las hembras presentan una apertura genital que se sitúa ventralmente, al igual que el ano (rodeado por el surco anal que puede estar presente en todos los estadios de las garrapatas) (Sonenshine, 1991) (figura 1 y 2).

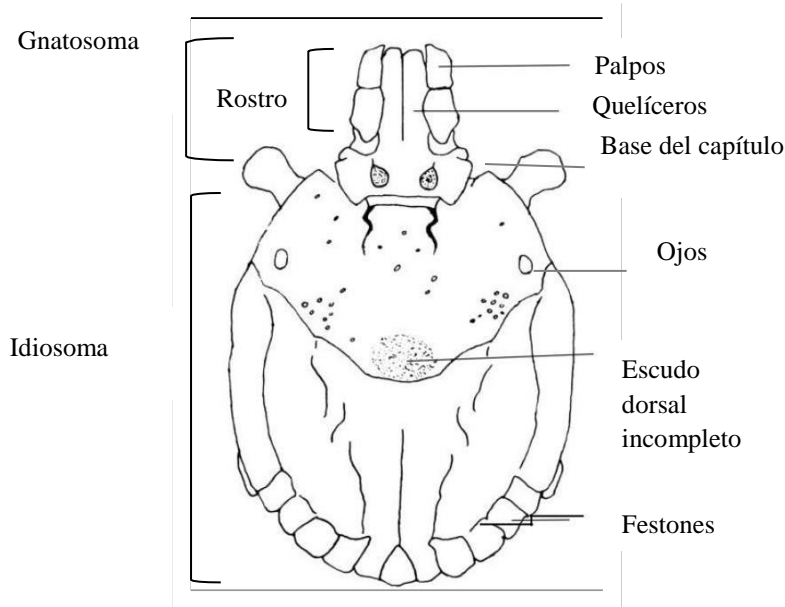


Figura 1: Morfología de garrapatas duras (Acari: Ixodidae) A. hembra vista dorsal

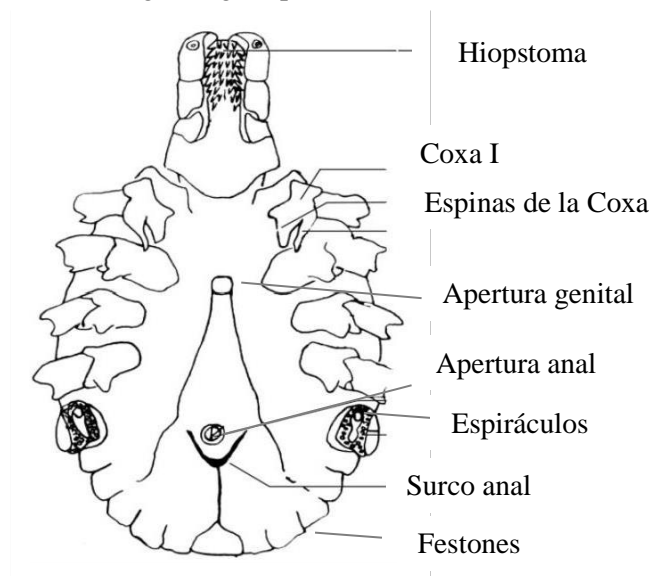


Figura2: Morfología de garrapatas duras (Acari: Ixodidae). Hembra vista ventral.

Las garrapatas que parasitan al ganado bovino en Argentina y que potencialmente podrían tener implicancia en la epidemiología de la anaplasmosis, son *Rhipicephalus microplus*, *Amblyomma neumanni*, *A. tonelliae* y *A. sculptum* (Guglielmone *et al.*, 1990<sup>a</sup>).

#### *Rhipicephalus microplus*

La garrapatas de la especie *R. microplus* posee en un capítulo hexagonal, corto y derecho, palpos con segmentos pequeños y ojos poco nítidos, no poseen festones, y el escudo es sin ornamentos. El surco anal está ausente o poco definido en hembras y es levemente visible en macho. Los espiráculos son pequeños y ovalados (figura 3).

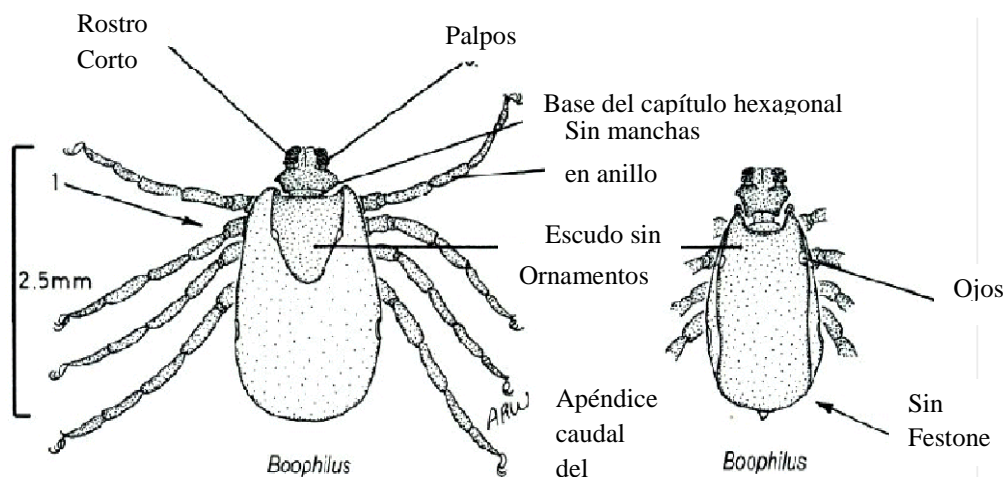


Figura 3: Vista dorsal de hembra (izq) y macho (der) de *R.*

Esta especie más importante en nuestro país, afectando al ganado de las provincias de Corrientes, Misiones, Chaco, Formosa, Santiago del Estero, Tucumán, Catamarca, Jujuy, Salta y zonas norteñas de Córdoba, Santa Fe y Entre Ríos (Romano, 1994). La transmisión transtadial a través de adultos alimentados como ninfas en terneros con distintos niveles de

*A. marginale* en sangre, fue demostrada por Aguirre *et al.* (1994). Pero teniendo en cuenta que *R. microplus* desarrolla su fase parasítica sobre un solo animal, las únicas vías con un potencial rol en la epidemiología de la anaplasmosis serían la intraestadial y la transovárica. En el caso de *R. microplus*, se ha demostrado la transmisión intraestadial de *A. marginale* (Connell y Hall, 1972). Sin embargo, tanto la dinámica de migración de *R. microplus* como la influencia que tendría en la transmisión de la anaplasmosis, no están aún dilucidados.

#### *Amblyomma spp.*

Las garrapatas de este género poseen un rostró mediano a largo, segundo segmento del palpo más largo, las coxas poseen manchas en anillo. El escudo es ornamentado y posee festones. Los espiráculos tienen forma de coma ancha (Figura 4, 5).



Figura 4: Macho adulto de *Amblyomma tonelliae*. Vista dorsal



Figura 5: Hembra adulta de *Amblyomma tonelliae*. Vista dorsal

Los estadios de las garrapatas del género *Amblyomma* se alimentan sobre distintos hospedadores, de la misma o distinta especie de vertebrados, desprendiéndose del hospedador al final del proceso de alimentación (figura 6). Lo antedicho podría tener relevancia epidemiológica para la transmisión de patógenos. Larvas y ninfas que se alimentan sobre un bovino infectado con *A. marginale*, podrían luego de la muda transmitir la infección al nuevo estadio, ninfa o adulto respectivamente, y éstos a su vez a un bovino susceptible. Todas las ninfas y adultos podrían acceder a diferentes bovinos amplificando de esa manera la difusión de *A. marginale* en un rodeo. Para garrapatas de tres hospedadores del género *Rhipicephalus*, esta vía de transmisión ha sido descrita en distintas partes del mundo (Shkap *et al.*, 1992; Potgieter *et al.*, 1983; Samish *et al.*, 1993). En un estudio Gaido *et al.* (1995) reportaron la transmisión transtadial de ninfas a adultos en *A. neumanni*. No existen estudios publicados de transmisión transovárica en el género *Amblyomma*.

En Argentina, las especies de *Amblyomma* capaces de alimentarse en todos sus estadios sobre bovinos son *A. neumanni*, *A. sculptum* y *A. tonelliae*. Esta última, seleccionada de interés para el presente trabajo, posee una marcada preferencia eco- geográfica por la región del Chaco seco (Estrada-Peña *et al.*, 2014). Tanto las larvas como las ninfas y adultos de esta última especie presentan una intensa actividad en todas las estaciones del año (Tarragona *et al.*, 2015).

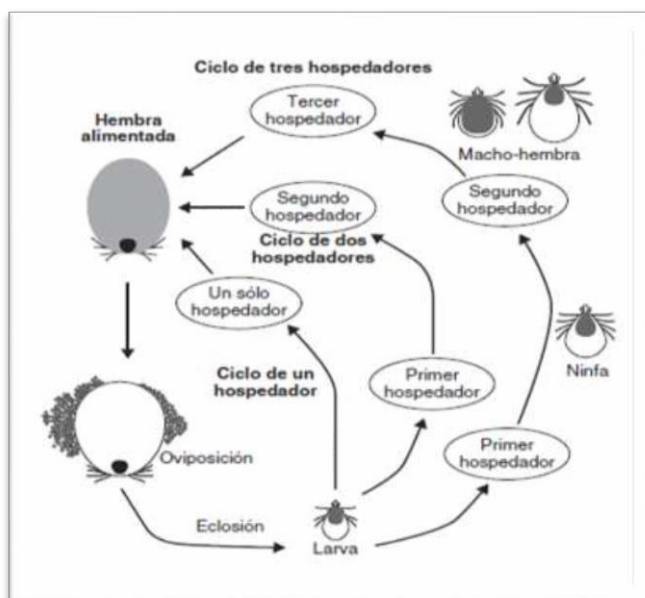


Figura 6: tipos de estrategias que presenta el ciclo biológico de las garrapatas duras (Ixodidae) (Márquez *et al.*, 2005)

### ***Transmisión por dípteros hematófagos***

La mosca del establo también conocida como mosca brava, (*Stomoxys calcitrans*), los tábanos, *Tábanus spp*; y mosquitos están involucrados en la transmisión mecánica de anaplasmosis (Potgieter *et al.*, 1981). Los tábanos puede transferir eritrocitos infectados a través del aparato bucal entre un animal y otro en un lapso no mayor de dos horas (Hawkins y *et al.*, 1982). La transmisión es notablemente mayor cuando la fuente de infección es un animal con Anaplasmosis clínica en lugar de un portador crónico (Piercy, 1956).

Existen pruebas donde se comparó la eficiencia de transmisión biológica de *D. andersoni* con la transmisión mecánica de *Stomoxys calcitrans* y *Tabanus fuscicostatus* y la garrapata, la cual resultó ser un mejor transmisor de *A. marginale* (Scoles *et al.*, 2005).

Los mosquitos no serían tan importantes en la difusión de la enfermedad (Piercy, 1956).

### ***Transmisión por vía iatrogénica***

La anaplasmosis puede transferirse mediante el uso de agujas e instrumentos no desinfectados y/o no esterilizados entre un animal y otro en prácticas como vacunación, castración, descorne (Blood *et al.*, 2002) y palpación rectal sin la higiene adecuada (Abdala *et al.*, 1992). A diferencia de los rodeos de cría, en rodeos lecheros se ha registrado la ocurrencia de brotes de anaplasmosis en cualquier estación del año (Guglielmone *et al.*, 2006) probablemente debido a prácticas veterinarias que implican el uso de agujas con la consecuente transmisión iatrogénica de *A. marginale*.

### ***Transmisión por vía transplacentaria***

La transmisión transplacentaria se da cuando la madre sufre anaplasmosis aguda, en el segundo y tercer trimestre de gestación (Zaugg, 1985). Un estudio en Argentina reportó transmisión transplacentaria de *A. marginale* en el 5,2% de los fetos de hembras portadoras crónicas, aunque no se logró reproducir la enfermedad luego de realizar inoculaciones experimentales de la sangre en terneros esplenectomizados (Sala, 2013).

### **Patogenia**

Una vez que *A. marginale* se encuentra dentro del huésped, toma contacto con la membrana plasmática del eritrocito, y por medio de un proceso de invaginación coloniza el mismo sin destruirlo (Francis *et al.*, 1979). El corpúsculo inicial (0.1-0.2  $\mu\text{m}$ ) dentro de esa vesícula se multiplica por división binaria con la producción de 3 a 8 cuerpos iniciales que conforman finamente el corpúsculo de inclusión (1  $\mu\text{m}$ ). Estos mismos abandonan el

eritrocito por mecanismos no líticos para colonizar eritrocitos vecinos (Richey, 1981). La rickettsemia se incrementa exponencialmente, y los eritrocitos infectados se eliminan mediante fagocitosis por las células del sistema retículo endotelial del bazo, hígado y nódulos linfáticos (Richey y Palmer, 1990). Esto hace que se produzcan alteraciones orgánicas debido a la respuesta de dicho sistema (Ristic y Watrach, 1963). La más importante es la anemia (que ocurre 1 a 6 días después del inicio de la rickettsemia) con consecuente ictericia, que pueden terminar en la muerte del animal (Potgieter y Stoltsz, 2004). Los animales que sobreviven disminuyen la rickettsemia y desarrollan una marcada respuesta regenerativa caracterizada por reticulocitosis, macrocitemia y granulopoyesis (Viseshakul *et al.*, 2002). Los portadores crónicos, en condiciones de estrés u otra causa que produzca una inmunosupresión pueden manifestar sintomatología clínica (Bock y De Vos, 2001).

Es importante destacar que los animales que sobreviven se convierten en portadores crónicos de *A. marginale*. Sus niveles de rickettsemia van desde 0,000001% a 0,1% (Watson, 2015), lo suficiente para constituir fuente de propagación hacia animales susceptibles. Las fluctuaciones en los ciclos de rickettsemia se deben a variantes antigénicas, siendo un mecanismo de evasión del sistema inmune y persistencia en el huésped (French *et al.*, 1998).

### **Signos clínicos**

La presentación de los signos clínicos está relacionada directamente con la edad del animal y estado inmunitario del mismo. Los casos subclínicos se dan en animales menores de 9 meses, presentando una leve anorexia y siendo resistentes a la enfermedad (Watson, 2015). En cambio, la presentación clínica en animales mayores de 1 año se observa anorexia, depresión y debilidad muscular, palidez de mucosas como consecuencia de la destrucción continua de eritrocitos sin liberación de hemoglobina. Posteriormente se desarrolla ictericia.

La orina puede ser oscura debido a los pigmentos biliares, pero no se observa hemoglobinuria. Otro signo importante es la marcada disminución de la producción láctea (Alcaraz, 1999). En la fase final de la enfermedad los bovinos pueden presentar hipotermia, pérdida de peso, aborto, fallo cardiopulmonar, síntomas nerviosos por anoxia cerebral y tendencia al decúbito y muerte (Alderink y Dietrich, 1981). Esto ocurre al cabo de las 24 a 36 horas del pico de rickettsemia, donde hasta un 70 % de los eritrocitos pueden estar infectados.

### **Diagnóstico**

En la práctica el diagnóstico presuntivo se hace mediante los síntomas clínicos y los hallazgos a la necropsia. El diagnóstico definitivo se hace mediante técnicas de laboratorio.

Los hallazgos post mortem que se encuentran son: emaciación, ictericia y palidez de tejidos, sangre con aspecto acuoso (Blood *et al.*, 2002). Se observa marcada esplenomegalia con aumento de friabilidad, debido al metabolismo de la hemoglobina por parte del sistema retículo endotelial (Anziani *et al.*, 1981). También hay agrandamiento del hígado y la vesícula biliar, con bilis oscura y espesa (Richey y Palmer, 1990).

A la histopatología se observa degeneración y/o necrosis centrolobulillar hepática debido a la hipoxia y una hemosiderosis esplénica por la fagocitosis extravascular (Anderson y Hurtado 1989).

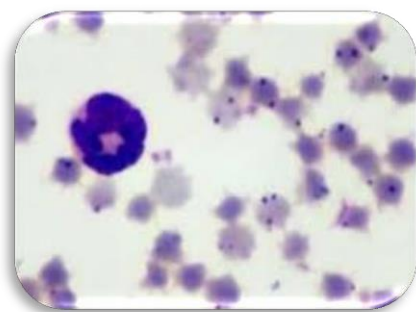
### ***Examen microscópico***

Las muestras obtenidas a partir de ganado vacuno vivo incluyen frotis de sangre y sangre con anticoagulante. Esta muestra es útil para preparar frotis frescos si los anteriores no fueran satisfactorios. Además, un hematocrito bajo y/o un recuento de eritrocitos bajo puede ayudar a poner de manifiesto la implicancia de *A. marginale* cuando en los frotis se detecta solo un bajo número de parásitos, como puede ocurrir en la fase de recuperación de la enfermedad.

Las muestras obtenidas de los animales muertos deben ser frotis de gota fina secados al aire, del hígado, riñón, corazón y pulmones (preferentemente de sangre, no de tejido) y de un vaso sanguíneo periférico.

Los extendidos se tiñen con una coloración de Giemsa al 10% y se observan al microscopio óptico con aumento 1000x. *A. marginale* tiene aspecto de cuerpos densos, redondeados y muy coloreados dentro de los eritrocitos, de 0,3–1,0  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 7). La mayor parte de estos cuerpos se localizan en el margen del eritrocito o en su proximidad. Esta característica lo diferencia de *A. centrale*, ya que en este último caso los microorganismos están más centrados en el eritrocito (OIE, 2015).

La infección se hace visible al microscopio 2–6 semanas después de la transmisión.



*Figura 7: Anaplasma marginale.*



### ***Reacción en cadena de la polimerasa***

La sensibilidad analítica de los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha estimado que es del 0,0001% de los eritrocitos infectados. La PCR en tiempo real también se ha descrito para la identificación de *A. marginale* y debe tenerse en cuenta (OIE, 2015).

### ***Pruebas serológicas***

Por lo general, a no ser que los animales hayan sido tratados o se encuentren en una fase muy inicial de la infección (<14 días), para identificar los anticuerpos en animales infectados se utiliza la prueba de aglutinación en placa “Card Agglutination Test” (CAT), ELISA indirecto (I-ELISA), o ELISA de competición (C-ELISA). La CAT tiene como ventaja la de ser una técnica sensible, que puede realizarse en el laboratorio o en el campo, y que proporciona el resultado en unos pocos minutos. Las reacciones inespecíficas y la subjetividad en la interpretación pueden ser un problema. Además, el antígeno para la CAT, que es una suspensión de partículas de *A. marginale*, puede ser difícil de preparar y puede variar de un lote a otro. El I-ELISA emplea un antígeno como el de CAT (OIE, 2015). La técnica C-ELISA ha sido validada utilizando animales verdaderamente positivos y negativos, definidos mediante la PCR anidada (Torioni *et al.*, 1998). Esta técnica utiliza un antígeno recombinante denominado rMSP5 y un anticuerpo monoclonal (MAb) específico para MSP5.

### **Tratamiento**

Los fármacos más utilizados para el tratamiento de la anaplasmosis (FAO, 1988) son oxitetraciclina y dipropionato de imidocarb. En el uso de estos fármacos debe tenerse en cuenta las restricciones en carne y leche.

En casos clínicos severos se hace necesaria la terapia de soporte, mediante hidratantes, antihistamínicos, analgésicos, y complejos vitamínicos y minerales. Las transfusiones de sangre también están indicadas como tratamiento de soporte en los animales con un hematocrito menor al 15% (Radostits *et al.*, 2002).

El tratamiento esterilizante para animales portadores crónicos se puede realizar con oxitetraciclina LA en tres dosis de 20 mg/kg con intervalos de siete días (Torioni y Echaide, 2003).

### **Prevención y control**

De acuerdo a la zona geográfica las medidas de prevención y control varían desde el control de artrópodos, profilaxis con antibióticos, elección de biotipos de bovinos resistentes, vacunación, y medidas de higiene para evitar la transmisión iatrogénica.

### ***Vacuna contra la anaplasmosis bovina***

La prevención de la anaplasmosis a través del empleo de vacunas suele decidirse según la situación epidemiológica de cada campo, a través del diagnóstico serológico (Alcaraz, 1999). El mismo consiste en analizar los sueros de una proporción de los terneros de 7 a 9 meses de edad para determinar la tasa de inoculación. Si la proporción de terneros con serología positiva a *A. marginale* es menor al 80 %, se presupone una mayor probabilidad de ocurrencia de brotes cuando los bovinos superen el año de edad, con lo cual se considera conveniente vacunar. En bovinos originarios de zonas libres que van a ser trasladados a las zonas endémicas, se recomienda la vacunación.

En nuestro país, la vacuna contiene eritrocitos parasitados con *A. centrale*, especie poco patógena para los bovinos y que brinda inmunidad cruzada parcial contra *A. marginale*. Si bien no previene la ocurrencia de una co-infección con *A. marginale*, es efectiva para prevenir las manifestaciones indeseables de la enfermedad (Mangold, 2005). Las recomendaciones de INTA son usarla exclusivamente en terneros/as de 4 a 10 meses de edad, en buen estado de salud. Una sola aplicación brinda protección de por vida contra la anaplasmosis a más del 90 % de los bovinos vacunados. Pueden producirse reacciones post vacúnales graves (incluso mortales) si la vacuna se utiliza en bovinos mayores de 10 meses de edad.

### ***Control de garrapatas***

Orientadas al control de la garrapata común del bovino, *R. microplus*.

Los acaricidas químicos pueden ser aplicados con buena eficiencia y bajo costo, a través de baños de inmersión. Otros métodos utilizados son la aplicación de garrapaticidas por vía tópica (pouron) o inyectables, y, eventualmente, por baños de aspersión. En líneas generales, los esquemas de control se pueden desagregar de la siguiente manera: tratamiento umbral, tratamiento oportunista (aprovechando el encierre con otros objetivos), tratamiento estratégico (concentra un mínimo de tratamientos en una determinada época del año afectando la evolución de la población de garrapatas en la pastura) (Morel *et al.*, 2017). El uso de acaricidas químicos puede conducir a problemas como la aparición de poblaciones de garrapatas resistentes, contaminación ambiental y restricciones para el consumo de carne o leche.

El método de rotación y descanso de pasturas, de acción sobre la fase de vida libre de del ciclo, tiene como objetivo disminuir los niveles de infestación con garrapatas en las pasturas otorgando períodos de descanso de las mismas (Nava *et al.*, 2011).

En cuanto a la utilización de biotipos bovinos resistentes a la infestación por garrapatas, existen varios estudios acerca de la capacidad de los animales *Bos indicus* y, en menor medida de algunas razas de *Bos taurus* como la Criolla, para controlar las infestaciones de *R. microplus* (Guglielmone *et al.*, 1990<sup>b</sup>). En la práctica, esta herramienta está subutilizada y tiene bajo impacto en la toma de decisiones para el control de la garrapata.

Existen vacunas contra *R. microplus* que actúan sobre la capacidad reproductiva de las garrapatas hembras. (Nava *et al.*, 2011). Los test de eficacia de estas vacunas en condiciones de campo han arrojado resultados dispares. Su uso no está extendido como método de control, y no se comercializan en Argentina.

## OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto es aportar conocimientos sobre la epidemiología de la anaplasmosis en Argentina, al evaluar la competencia vectorial de la garrapata *Amblyomma tonelliae* para transmitir *Anaplasma marginale*. La investigación parte de la hipótesis de que las distintas especies de garrapatas de los géneros *Amblyomma* presentes en Argentina, pueden tener un papel relevante en la epidemiología de *A. marginale* al actuar como vectores en la transmisión biológica de este patógeno a los bovinos.

El objetivo específico es evaluar la transmisión transestadial de *A. marginale* en la especie de garrapata *A. tonelliae*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La transmisión se evaluó siguiendo los pasos de Reisen (2002): 1) alimentar un potencial vector artrópodo sobre un hospedador vertebrado infectado con el patógeno en cuestión; 2) incubar por un período dado de tiempo al artrópodo alimentado sobre el vertebrado portador de la infección; 3) re alimentar este artrópodo sobre un hospedador vertebrado no infestado y susceptible; 4) y examinar al hospedador vertebrado para determinar si adquirió la infección.

El ensayo se realizó en la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Rafaela, Santa Fe, en corrales de aislamiento (figura 9) para evitar la transmisión por otros vectores que pudieran interferir en los resultados del experimento, así como la fuga de garrapatas al ambiente. Las medidas de aislamiento con que cuentan los corrales son: tela mosquitera doble en ventanas. Única puerta exterior separada de la entrada a los corrales por habitación intermedia. Doble puerta con cortina de aire entre zona intermedia y corrales (Figura 8), constituida por puerta sólida de chapa y puerta mosquitera. Lámpara UV para captura de insectos voladores en zona intermedia (1) y en corrales (2). El perímetro del edificio en su totalidad rodeado por un metro de grava y canaleta con cipermetrina en formulación similar a baño garrapaticida (20%).

Antes de ser trasladados al exterior, los desechos fueron tratados con cipermetrina 20% por 24 hs. Se limitó la entrada al corral a los dos veterinarios encargados del ensayo, que como medida complementaria utilizaron mamelucos descartables y botas. Se implementó pediluvio con cipermetrina 20% en zona intermedia.



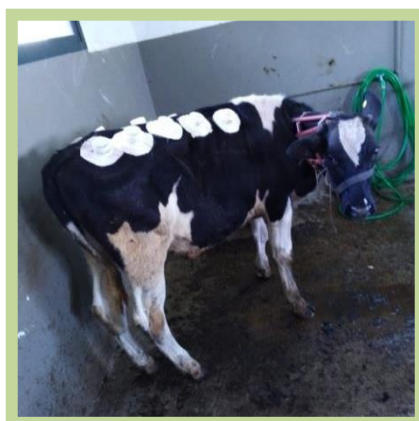
*Figura 8: sala intermedia de la estación experimental con doble puerta con cortina de aire y una puerta sólida de chapa. Pediluvio con cipermetrina para el lavado de botas a la entrada y salida de los corrales.*



*Figura 9: corrales de asilamiento de la estación experimental del INTA*

### **Primera etapa: infección experimental de garrapatas**

Se seleccionó como hospedador vertebrado a infectar, un ternero holando de 6 meses de edad (caravana 275) (figura 10). En primer lugar, se le realizó toma de muestra de sangre y suero para comprobar negatividad a *A. marginale* y *A. centrale*. Además, se chequearon los parámetros clínicos de temperatura rectal y hematocrito. Se inoculó el ternero con el aislamiento S1P de *A. marginale* mantenido en la EEA Rafaela del INTA (inyección subcutánea de 1 ml de dosis infectante constituida por  $1 \times 10^8$  eritrocitos infectados diluidos en solución isotónica PBS). A partir del día 13 post inoculación se realizó toma de muestra diaria de sangre yugular para caracterizar la dinámica de la infección con *A. marginale* mediante hematocrito (figura 11), frotis sanguíneo, PCR y serología. También se determinó temperatura rectal. El día 21 post inoculación, cuando la rickettsemia alcanzaba el 5%, se procedió a infestar el ternero con larvas y ninfas de *A. tonelliae* libres de *A. marginale*, originarias de la provincia de Salta y criadas en el laboratorio de la EEA Rafaela del INTA. En primer lugar, se realizó tricotomía e higiene de la piel con alcohol, y luego se pegaron las cápsulas contenedoras de garrapatas (foto 12). Se colocó collar de palos en el bovino para evitar rascado y consecuente rotura de las cápsulas.



*Figura 10: ternero holando de 6 meses de edad con capsulas ya colocadas.*



*Figura 11: medición de hematocrito con el ábaco.*



*Figura 12: imagen de la izquierda se encuentra una capsula en la que se van a colocar las garrapatas y en la imagen de la derecha se observa la capsula con ninfas en su interior.*

Una vez ingurgitados, se recolectaron todos los estadios y se colocaron en estufa a 25°C, 85% de humedad relativa y fotoperíodo de 12h luz-12h oscuridad para que realicen la muda (Figura 13). El último día de recolección de garrapatas, se colocó garrapaticida Bayticol *pour-on* (flumetrina) y se aplicó una dosis de oxitetraciclina LA 20 mg/kpv IM. Cinco días después, se realizó la eutanasia al animal según protocolo N° 002 del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación del Centro Regional Santa Fe del INTA.



Figura 13: imagen de la izquierda: Ninfas sin alimentar de *Amblyomma tonelliae*; imagen de la derecha: Ninfas de *Amblyomma tonelliae* a punto de mudar a adultos.



Figura 14: Ninfas de *Amblyomma tonelliae* en su vista dorsal y ventral.

#### *Hematocrito*

Para evaluar el paquete globular se utilizó la técnica de micro hematocrito a partir de 1 ml de sangre yugular, en un tubo con anticoagulante. Se utilizó EDTA (5mg/ml de sangre). Luego de haber homogenizado la muestra de sangre, se introdujo un capilar de vidrio en el tubo, inclinándolo para favorecer el llenado. El extremo sin sangre se selló con la llama de un mechero bunsen. Luego se sedimentaron las células por medio de una centrifuga ad hoc a 3500 rpm durante 10 minutos. Mediante un ábaco se estableció la proporción de eritrocitos con respecto al plasma.

#### *Extendido sanguíneo*

Se extrajo sangre de la yugular para realizar frotis sanguíneo. Se puso especial cuidado en que los frotis estén bien preparados y libres de sustancias extrañas, pues las partículas de los restos pueden confundir el diagnóstico. Para realizar el extendido fino se descargó una gota de sangre en el extremo del portaobjetos. Se apoyó un segundo portaobjetos en un ángulo de 35° sobre la gota, permitiendo que la sangre corra por capilaridad en el ángulo formado por los 2 portaobjetos. Se desplazó el segundo portaobjetos para formar una película fina sobre el primero. Para la coloración, se dejó secar el extendido antes de fijar con alcohol metílico. Luego se cubrió el portaobjeto con el colorante Giemsa preparado al 10% en solución bufferada (pH 7), durante 20 minutos. Posteriormente se lavó con agua suavemente para eliminar exceso de coloración, y se dejó secar al aire.



### *Análisis microscópico*

Se utilizó el objetivo de inmersión para lograr un aumento de 1000X. Se revisaron primero los bordes donde existen mayores posibilidades de encontrar eritrocitos infectados con *Anaplasma spp.* La proporción de eritrocitos infectados (rickettsemia), se obtuvo después de contar el total de eritrocitos de 5-10 campos microscópicos.

### *Serología*

Una vez extraída la muestra sangre sin coagulante se dejó reposar hasta la formación del coagulo. Se extrajo el suero y se colocó en tubos eppendorf para luego congelarse.

Para determinar la reacción de anticuerpos contra *A. marginale* se realizó ELISA de competición (kit comercial de VMRD Inc., Pullman, WA) siguiendo el protocolo descrito por Torioni de Echaide *et al.* (1998). La densidad óptica de cada muestra fue expresada como porcentaje de inhibición, y el punto de corte utilizado fue de 28.

### *Extracción de ADN a partir de muestras de sangre*

Se realizó la digestión con buffer lisis celular y proteinasa K. La purificación del ADN se realizó con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y la precipitación y lavados con isopropanol y etanol respectivamente (Mastroaolo, 2014).

### *PCR*

Para detección de *A. marginale* se amplificó el gen *msp1b* y para *A. centrale*, el gen *msp2* mediante PCR anidada utilizando los primers y condiciones descritas por Molad *et al.*, (2006). La mezcla de la reacción se preparó en una cabina de flujo laminar previamente irradiada con luz UV para minimizar el riesgo de contaminaciones. Se utilizaron controles positivos (*A. marginale* S1P) y controles negativos (sangre de animal negativo a *Anaplasma spp.*, agua libre de DNAsas y RNAsas). Luego del ciclado las muestras fueron corridas en un gel de agarosa al 1,5% y los productos visualizados mediante la tinción con Bromuro de Etidio (Promega).

## **Segunda etapa: infestación experimental de terneros susceptibles**

Transcurrida la muda, los nuevos estadios se sembraron en terneros (caravanas 6712, 6716, 1057, B825) de 3 meses de edad previamente esplenectomizados (técnica descrita en FAO, 1968) libres de *A. marginale* (figura 15, 16).

Se infestaron dos terneros con 200 ninfas de *A. tonelliae* y dos terneros con adultos (40 machos y 40 hembras) de *A. tonelliae* originados respectivamente de larvas y ninfas alimentadas sobre el ternero inoculado en la Etapa 1. Las garrapatas se alimentaron por un período de 7 a 10 días. Una vez transcurrido este período, en los terneros se midió temperatura

rectal y se realizó extracción de sangre con frecuencia semanal durante 90 días. La sangre de estos terneros se utilizó para determinar hematocrito y presencia/ausencia de infección con *A. marginale* por medio de observación microscópica (frotis sanguíneo), PCR (gen *msp1b*) y serología (ELISA), según los procedimientos descritos para la Etapa 1.



*Figura 15: corral con terneros de 3 meses de edad previamente esplenectomizados libres de A. marginale.*



*Figura 16: adultos de Amblyomma tonelliae luego de la muda, próximos a sembrarse en los terneros.*

## RESULTADOS

En la Etapa1, al día 17 post inoculación con la cepa S1P de *A. marginale*, se comenzó a detectar la presencia de parásitos en el interior de los eritrocitos (0.3%) dicho porcentaje se fue incrementando con el transcurso del tiempo (Figura 17), llegando a duplicar el valor inicial diariamente. Alcanzando el máximo nivel de parasitemia el día 24 con el 12 % de los eritrocitos infectados. A partir del día 25 se observó un descenso gradual en el nivel de rickettsemia.

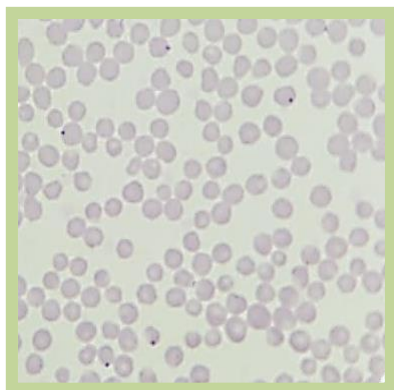


Figura 17: Frotis sanguíneo coloreado con Giemsa de animal infectado.

DÍA	HTO	PEI	SEROLOGÍA	PCR	COMENTARIOS
0	32	-	-	-	Inoculación
13	28	-	+	+	Anaplasma detectable pero no parasitemia patente
14	28	-	+	+	
15	28	-	+	+	
16	31	-	+	+	
17	32	0,3%	+	+	Parasitemia patente
18	35	1,0%	+	+	
19	31	1,5%	+	+	
20	32	2,7%	+	+	
21	29	5,0%	+	+	Siembra cápsulas de larvas (L) y ninfas (N)
22	26	7,6%	+	+	
23	26	9,3%	+	+	
24	20	12,0%	+	+	
25	19	9,8%	+	+	Recolección L y N ingurgitadas
26	17	7,0%	+	+	Recolección N por cápsula despegada
27	17	4,5%	+	+	Recolección L y N ingurgitadas

Tabla 1: Valores de Hematocrito (HTO) y Porcentaje de Eritrocitos Infectados (PEI), resultados de análisis por Serología y biología molecular (PCR).

La temperatura corporal alcanzó un valor máximo de 39.9°C el día 27 post inoculación. Las restantes determinaciones no mostraron valores significativos variando entre los 38 y 39 °C. Los valores de hematocrito fueron variables dentro de los valores de referencia para bovinos, hasta el día 23 post inoculación con *A. marginale*, luego se observó un descenso significativo de los valores hasta 17% el día 26.

La aparición de síntomas clínicos fue observada cuando el hematocrito descendió por debajo de 20 al día 24 post inoculación. La sinología clínica más evidente fue palidez de mucosas, debilidad general, la frecuencia respiratoria y cardíaca aumentada. No evidenciando una marcada disminución del consumo voluntario. Durante el período de ensayo, no fue necesario realizar transfusión sanguínea o tratamiento alguno con antibióticos.

La detección de *A. marginale* en el ternero inoculado por serología y por medio de PCR fue positiva a partir del día 13.

Las larvas y ninfa sembradas de *Amblyomma tonelliae*, se alimentaron durante el máximo período de parasitemia del ternero. Siendo recolectadas los días 25, 26 y 27. El tiempo de muda en estufa fue de 15 días para larvas y 21 días para ninfas coincidiendo con lo reportado en la bibliografía.

En la Etapa 2 el período de alimentación de las ninfas y adultos fue el esperado (7 a 10 días) con leves variaciones entre cápsulas. En todos los muestreos semanales realizados los valores de hematocrito y temperatura fueron normales en la totalidad de los animales. De la misma forma frotis, serología y PCR arrojaron resultados negativos. Confirmando que la especie *Amblyomma tonelliae* no fue capaz de transmitir transestadialmente la cepa S1P de *A. marginale* a terneros esplenectomizados bajo las condiciones del presente ensayo.

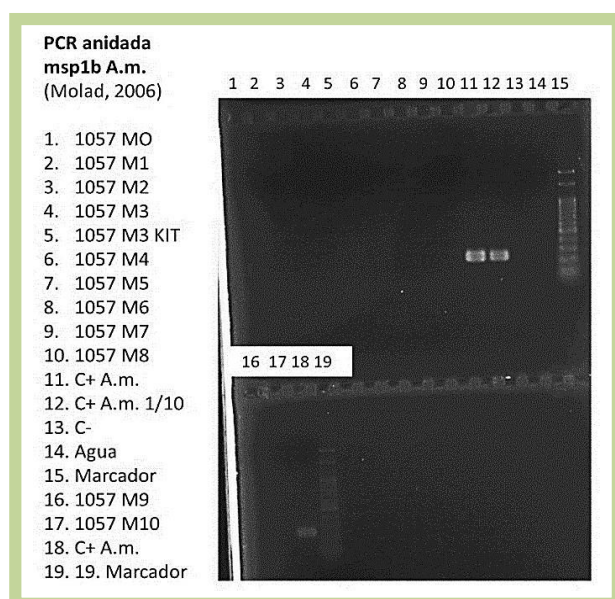


Figura 18: Corrida electroforética de productos de amplificación por PCR.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Respecto a la metodología se destaca la elección del sitio de ubicación de las cápsulas sobre el animal, ya que algunas cápsulas se desprendieron siendo más predisponentes las ubicadas en la zona de la grupa porque el ternero se alcanzaba a lamer. Se observó un mejor comportamiento de las cápsulas en lugares planos y parejos como la región de la parrilla costal respecto a la región de la grupa. Esto es un punto crítico ya que el pegamento utilizado como sostén de las mismas, poxiram y cianoacrilato (gotita) podría haber influido sobre la alimentación de las garrapatas, sobre todo en aquellas cápsulas desprendidas que tuvieron que ser pegadas nuevamente. El retardo de ingurgitación en algunas cápsulas podría deberse a la aplicación previa de antibiótico en el sitio.

Con el objetivo de lograr que las garrapatas se alimenten o ingurgiten en el pico máximo de rickettsemia del ternero, los diferentes estadios fueron sembrados en un período ascendente de la rickettsemia, corriendo el riesgo de que el ternero presente signos clínicos agudos pudiendo ser letales. En el presente ensayo no fue necesario recurrir al uso de antibióticos (oxitetraciclina) ni de transfusión sanguínea ya que el hematocrito no bajó a lo largo del estudio por debajo de 15, valor de referencia a partir del cual se recomienda la transfusión sanguínea y/o tratamiento medicamentoso. Otra opción hubiese sido infestar al ternero en un momento de bajo riesgo, cuando la parasitemia comienza a ser patente.

En el presente ensayo las garrapatas se ingurgitaron con valores máximos de rickettsemia (12% en el pico). Se priorizó la ingestión de eritrocitos infectados con *A. marginale* por parte de las garrapatas, más allá de que estos valores no son los más frecuentes en condiciones de campo o infección natural (en zonas endémicas los valores de parasitemia son menores al 1%).

Si bien en el presente ensayo *A. tonelliae* no fue capaz de transmitir *A. marginale*, debe considerarse que este resultado es específicamente para la cepa S1P. Otros estudios de este tipo han comparado la capacidad infectante de distintas cepas de *A. marginale* para las garrapatas. Smith *et al.* (1986) compararon la capacidad de transmisión de dos cepas de *A. marginale* (Illinois y Virginia) por *Dermacentor variabilis*, logrando transmitir la enfermedad con la cepa de Virginia mientras que la cepa de Illinois no se pudo transmitir luego de varios intentos. Para saber si *A. tonelliae* es capaz de transmitir *A. marginale* es necesario hacer otros estudios con diferentes cepas de *A. marginale*.

En cuanto a antecedentes de transmisión por el género de interés, se tomó como referencia el trabajo de Gaido (1995) en el cual se demuestra transmisión transestadial de la cepa S1P de *A. marginale* con *A. neumanni*. Las técnicas diagnósticas utilizadas en dicho

estudio (CAT y extendido sanguíneo) presentan menor sensibilidad que las actuales, como PCR que es capaz de detectar niveles tan bajos de parásitos en sangre como 30 eritrocitos por ml de sangre comparado con un extendido sanguíneo que es capaz de detectar a partir de  $10^6$  eritrocitos parasitados por ml (Torioni et al 1998). Es importante la sensibilidad de las pruebas al momento de determinar la negatividad de los terneros (provenientes de zona endémica) esplenectomizados al inicio del ensayo. La discrepancia en los resultados con el presente trabajo podría deberse también a que se trata de una especie de garrapata diferente.

Este estudio da respuesta a interrogantes de las ciencias básicas principalmente. Al igual que reportes previos, la negatividad en los resultados aporta antecedentes al discutido rol de las garrapatas en la epidemiología de la anaplasmosis bovina. Desde un enfoque orientado al control de esta enfermedad y considerando sólo prevención de la transmisión, se sugiere hacer énfasis en la vía iatrogénica, que está descrita y es fácil de prevenir; y en simultáneo continuar con estudios de transmisión para comprender el ciclo completo de *A. marginale* a través de sus vectores en Argentina.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdala, A.A.; Mangold, A.J. y De Echaide, S.T. (1992). Transmisión experimental de *Anaplasma marginale* por palpación rectal. *Vet Arg* 9: 683- 685.
- Aguirre, D.H.; Gaido, A.B.; Viñabal, A.E.; De Echaide, S.T. y Guglielmone, A.A. (1994). Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different levels of rickettsaemia. *Parasite* 1: 405-407.
- Alcaraz, E. L. (1999). INTA. Anaplasmosis bovina. Mercedes, Corrientes. Noticias y Comentarios N° 332.
- Alderink, F. G. y Dietrich, R. (1981). Anaplasmosis in Texas: epidemiologic and economic data from a questionnaire survey. *Proc. Natl. Anaplasmosis. Conf.* 7: 2744.
- Anderson JF, Magnarelli LA. Biology of ticks. *Infect Dis Clin North Am.* 2008; 22:195-215.
- Anderson ML y Hurtado BJ. 1989. Diagnosis of anaplasmosis in formalin fixed tissue using the Wolbach's Giemsa stain. *Vet Diagn Invest* 1:185- 186
- Anziani, O.S.; Hadani, A.; Ford, A.C.; Guglielmone, A.A.; Bermúdez, A.C.; Mangold, A.J.; Suárez, C.M. y Tarabala, H.A. (1981). Observaciones de campo y laboratorio sobre la inoculación de bovinos Holando Argentino con una cepa de *Anaplasma marginale* modificada y atenuada. *Gac Vet* 43:962-974
- Blood D.C. (2002). Medicina veterinaria. Trato de las enfermedades del Ganado bovino, porcino, caprino y equino. Edición n°9. Mc-Graww Hill. *Interamericana México.* 2: 1495-1500.
- Bock, R.E. y De Vos, A.J. (2001). Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Aust Vet J.* 79: 832-839.
- Connell, M. y Hall, W.T.K. (1972).Transmission of *Anaplasma marginale* by the cattle tick *Boophilus microplus*. *Aust Vet J.* 48: 477
- Coronado, A. (2001). Is *Boophilus microplus* the main vector of *Anaplasma marginale*? Technical note. *Revista Científica, FCV-LUZ.* 11: 408-411.
- 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. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51:2145–2165.

- Estrada-Peña, A., Tarragona, E. L., Vesco, U., Meneghi, D. de, Mastropaolo, M., Mangold, J., Nava, S. (2014). Divergent environmental preferences and areas of sympatry of tick species in the *Amblyomma cajennense* complex (Ixodidae). *Int J Parasitol*, 44(14): 1081–1089.
- FAO (1988). El tratamiento de las enfermedades de los bovinos transmitidas por garrapatas. En: El control de las garrapatas y las enfermedades que transmiten. *Manual Práctico de Campo*. Vol II p. 427-440
- 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.
- Gaido, A.B.; Viñabal, A.E.; Aguirre, S.T.; DE Echaide, S.T. y Giglielmone, A.A. (1995). Transmission of *Anaplasma marginale* by the three-host tick *Amblyomma neumanni* under laboratory conditions. *Folia Parasitol* 42: 72.
- Guglielmone AA, Mangold AJ, Aguirre DH, Gaido AB. 1990<sup>a</sup>. Ecological aspects of four species of ticks found on cattle, in Salta, Northwest Argentina. *Vet Parasitol*. 35: 93–101.
- Guglielmone, A.A., Mangold, A.J., Gaido, A.B. and Aguirre, D.H., 1990<sup>b</sup>. Parasitismo natural por *Boophilus microplus* en bovinos Hereford, Criolla, Nelore y cruza Herefordx Nelore. *Rev Med Vet*. (Buenos Aires), 71:108-117
- Guglielmone, A.A. 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet Parasitol*. 57: 109-119.
- Guglielmone AA, Nava S. 2006. Las garrapatas argentinas del género *Amblyomma* (Acari: Ixodidae): distribución y hospedadores. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 35: 135–155.
- Hawkins, J.A.; Love, J.N. y Hidalgo, R.J. (1982). Mechanical transmission of anaplasmosis by tabanids (Diptera: Tabanidae). *Am J Vet Res*. 43: 732-73.
- Kieser ST, Eriks IS, Palmer GH. (1990). Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infect Immun*. 58(4):1117-1119.
- Kocan, K.M.; De la Fuente, J.; Meléndez, R, D. y Guglielmone, A.A. (2003). Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. *Clinic Microbiol Rev* 16(4): 698–712.



Kocan, K.M.; De La Fuente, J.; Blouin, E.F.; y García, J.C. (2004). *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*. 129: 285-300.

Mangold, A.J. EEA INTA Rafaela (2005). Prevención de la Babesiosis y la Anaplasmosis de los bovinos [http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/parasitarias/Bovinos\\_garrapatas\\_tristeza/66-prevencion\\_anaplasmosisdi\\_y\\_babesiosis.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/Bovinos_garrapatas_tristeza/66-prevencion_anaplasmosisdi_y_babesiosis.pdf).

Mangold, A.J. y Mastropaolo, M. (2013). Epidemiología y control de hemoparásitos (Babesia y Anaplasma) en Argentina. En: Fiel, C. y A. Nari. Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Fundamentos epidemiológicos para su prevención y control. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, pp. 639–655

Márquez, FJ; Hidalgo, A; Contreras, F; Rodríguez, JJ; Muniain, MA. (2005). Las garrapatas (Acarina: Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 23 (02).

Morel N., Signorini M.L., Mangold A.J., Guglielmone A.A. y Nava S. (2017). Strategic control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation on beef cattle grazed in *Panicum maximum* grasses in a subtropical semi-arid region of Argentina. *Prev Vet Med*. 144 (1): 179-183.

Nava, S., Mastropaolo, M., & Mangold, A. J. (2011). Guía para el control de los parásitos externos en bovinos de carne del área central de la Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuaria RIA*, 1–9.

OIE(organizacion mundial de sanidad animal) (2015). “Anaplasmosis bovina”. Sección 3.4: 3.4.1.

Palmer, G. H.; Brown, W. C. y Rurangirwa, F. R. (2000). Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Microb Infect*. 2: 167.

Piercy, P.L. (1956).Transmission of Anaplasmosis. *Ann NY Acad Sci*. 64: 40-48.

Potgieter, F.T.; Sutherland, B. y Biggs, H.C. (1981).Attempts to transmit *Anaplasma marginale* with *Hippobos rufipes* and *Stomoxys calcitrans*. *Onderstepoort J Vet Res*. 48:119-122

Potgieter, F.T.; Kocan, K.M.; Mcnew, R.W. y Ewing, S.A. (1983). Demonstration of colonies of *Anaplasma marginale* in the midgut of *Rhipicephalus simus*. *Am J Vet Res*. 44: 2256- 2261.

Potgieter, F.T. y Stoltz W.H. (2004) Bovine anaplasmosis. En: Infectious Diseases of Livestock. 2a ed. Ed. Oxford University Press Southern Africa. p: 594-616.

- Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Blood, D.C. y Hinchcliff, K.W. (2002). Enfermedades causadas por Rickettsias. En: Medicina Veterinaria. 2ª ed. Ed. McGraw-Hill – Interamericana de España, S.A.U. p: 1495-1500.
- Reisen WK. (2002). Epidemiology of vector-borne diseases. *Med Vet Entomol.* P: 19- 34.
- Richey, E. J. (1981). Bovine anaplasmosis, En: Current Veterinary Theraphy Food Practice. Ed., W. B. Saunders. Philadelphia, 767.
- Richey, E. J. y Palmer, G. H. (1990). Bovine Anaplasmosis. En: The Compendium Food. Animal. 12: 1661-1669.
- Ristic, M. y Watrach, A. M. (1963). Anaplasmosis. VI. Studies and hypothesis concerning the cycle of development of the causative agent. *Am J Vet Res.* 24: 267-277.
- Romano, A. (1994). Garrapata. Epidemiología y control de *Boophilus microplus* en Argentina. En: Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Ed. Hemisferio Sur. p: 301-317.
- Sala, Juan Manuel (2013). Transmisión transplacentaria de *Anaplasma marginale* en bovinos nativos del noreste argentino. Tesis de Maestría. Universidad Nacional del Litoral, Esperanza, Santa Fe, Argentina.
- Samish, M.; Pipano, A.; y Hadani, A. (1993). Intrastadial and interstadial transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus annulatus* ticks in cattle. *Am J Vet Res.* 54: 411-414.
- Scoles, G.A.; Broce, A.B.; Lysyk, T.J. y Palmer, G.H. (2005). Relative Efficiency of Biological Transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) Compared with Mechanical Transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *J Med Entomol.* 42: 668-675.
- Shkap, V.; Pipano, E. y Knowles, JR. D.P., Visser, E.S.; Mcguire, T.C.; Palmer, G.H.; Davis, W.C.; (1992). The *Anaplasma marginale* msp5 Gene Encodes a 19-Kilodalton Protein Conserved in All Recognized *Anaplasma* Species. *Infect Immun.* 60: 5139-5144.
- Smith T. y Kilborne F.L. (1893). Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or Southern cattle fever. USDA Bureau of Anim Bull. 1:1- 301.
- Smith, R.D.; Levy, M.G.; Kuhlenschmidt, M.S.; Adams, J.H.; Rzechula, D.L.; Hardt, T.A. y Kocan, K.M. (1986). Isolate of *Anaplasma marginale* not transmitted by ticks. *Am J Vet Res.* 47:127-129.
- Sonenshine, D. (1991) Biology of Ticks. Ed: Oxford University Press. NY.
- Tarragona EL, Nava S., Saracho Bottero MN, (2015). Spotted fever group Rickettsiae in Amblyomma ticks likely to infest humans in rural areas from northwestern Argentina.

Medicina (Buenos Aires). 75: 391-395.

Tebele, N. y McGuire, T. C. (1991). Induction of protective immunity using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infect Immun.* 59: 3199- 3204.

Theiler, A. (1910). “*Anaplasma marginale*”.The marginal points in the blood of cattle suffering from specific disease. *Govt Vet Bacteriol Transvaal.* South Africa. p 6-64.

Theiler, A. (1911). Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. En: 1st. Report of the Director of Veterinary Research. Ed: Department of Agriculture of the Union of South Africa. p 7-46.

Torioni De Echaide, 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 a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *J Clin Microbiol.* 36: 777-782.

Torioni, S. y Echaide, I. (2003). Anaplasmosis de los bovinos.

[http://www.produccionbovina.com/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/parasitarias/parasitarias\\_bovinos/40\\_anaplasmosis\\_bovinos.htm](http://www.produccionbovina.com/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/parasitarias_bovinos/40_anaplasmosis_bovinos.htm)

Watson, J.L. (2015). Diseases of the Hematopoietic and Hemolymphatic Systems. En: Large Animal Internal Medicine. Ed: Elsevier. St. Louis, Missouri, pp. 1044–1083.

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