

MÉXICO 2010



CÓMO EVITAR LAS PÉRDIDAS POR LA ANAPLASMOSIS BOVINA

**GOBIERNO
FEDERAL**

SAGARPA

inirap

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias



**CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN DISCIPLINARIA EN
PARASITOLOGÍA VETERINARIA
FOLLETO TÉCNICO No. 9 DICIEMBRE 2010**

25 Aniversario
Ciencia y Tecnología
para el Campo Mexicano



Vivir Mejor

CÓMO EVITAR LAS PÉRDIDAS POR LA ANAPLASMOSIS BOVINA

Autores:

Vega y Murguía CA
Jiménez-Ocampo R,
García-Ortiz MA,
Preciado De la Torre JF,
Rojas Ramírez EE,
Rodríguez-Camarillo SD,

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES
AGRÍCOLA Y PECUARIAS
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN DISCIPLINARIA EN
PARASITOLOGÍA VETERINARIA
JIUTEPEC, MORELOS, MÉXICO

No esta permitida la reproducción total o parcial de este libro, ni la transmisión en ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, por fotocopia, por registro o por otros métodos, sin el permiso previo y por escrito a la Institución.

La información contenida en cada uno de los capítulos es responsabilidad del autor.

Primera edición 2010
Impreso en México

Esta obra se terminó de imprimir
En Diciembre del 2010

Editores de la publicación:

Zeferino S. García Vázquez
Estefan Miranda Miranda

ISBN: 978-607-425-479-2

Folleto Técnico No. 9, Diciembre de 2010
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN FORESTALES,
AGRÍCOLA Y PECUARIAS
Av. Progreso #5
Col. Barrio de Santa Catarina, Coyoacán
C.P 04010
Mexico D.F.
Teléfono:(55) 3871 8700
Correo electrónico:vega.carlos@inifap.gob.mx

CONTENIDO

Pág.

INTRODUCCIÓN	1
DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD	2
EPIDEMIOLOGÍA – HISTORIA NATURAL	6
TRATAMIENTO – QUIMIOTERAPIA	11
MÉTODOS DE PREVENCIÓN.....	12
CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS Y MOLECULARES DEL AGENTE CAUSAL	18
CONCLUSIONES - ¡QUÉ HACEMOS! ¡QUÉ RECOMENDAMOS!.....	31
LITERATURA CONSULTADA	32
¿A DÓNDE ACUDIR?:	44
Agradecimientos.....	44

INTRODUCCIÓN

La producción ganadera en México, es un recurso renovable que ha permitido alimentar a sus habitantes por varias décadas. Los retos que el crecimiento de la población representa, demandarán mayor nivel de producción dentro del mismo ámbito territorial, lo que nos enfoca a aprovechar las regiones tropicales y subtropicales de nuestro país. Ello deberá sustentarse en la innovación tecnológica, como una opción fundamental para sostener ese desarrollo.

El aprovechamiento del potencial forrajero y el mejoramiento productivo de los bovinos en zonas tropicales y sub-tropicales, tienen un serio obstáculo que es la anaplasmosis, debido a la susceptibilidad del ganado de regiones templadas a esta infección no contagiosa, puesto que no se transmite en forma directa y que son introducidos en esas zonas. En la Unidad de Anaplasmosis del INIFAP, nos dimos a la tarea de estructurar una estrategia de investigación que coadyuvara a encontrar las soluciones para el óptimo aprovechamiento del potencial de tales áreas, en las que es abundante la presentación de enfermedades, que son transmitidas por garrapatas, como es el caso de la anaplasmosis bovina. El presente Folleto Técnico, es producto de los resultados de éste y otros proyectos de investigación y satisface una de las metas comprometidas en ellos. Esperamos que de la misma forma, sea de utilidad a sus lectores.

DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD

La anaplasmosis bovina es causada por una bacteria, en este caso la rickettsia *Anaplasma marginale*. La estructura más simple conocida de éste microorganismo en los eritrocitos del bovino es el cuerpo inicial que tiene forma esférica o cocoide de aproximadamente 0.3 micras de diámetro, posteriormente los cuerpos iniciales se multiplican por fisión binaria para llegar a formar el cuerpo de inclusión que contiene entre 8 y 12 cuerpos iniciales (Ristic 1981); al abandonar el eritrocito por un proceso no lítico, los cuerpos iniciales infectan otros glóbulos rojos para repetir el proceso. (Figura 1). Se estima que *A. marginale* también puede infectar a las células endoteliales del bovino y posiblemente este sea el sitio donde permanezca la bacteria en los animales portadores, aunque no se conoce bien del proceso de replicación dentro de las células endoteliales (Munderloh *et al.*, 2004, Carreño *et al.*, 2007). La única especie presente en México es *Anaplasma marginale*, que precisamente es la más patógena y se distribuye en las áreas tropicales abarcando más allá de la mitad del territorio nacional (Rodríguez *et al.*, 1999; Barigye *et al.*, 2004). La rickettsia se perpetúa en la naturaleza a través de sus portadores bovinos y garrapatas (Carreño *et al.*, 2007) infectados.

La anaplasmosis se presenta clínicamente como una anemia hemolítica extravascular severa. Durante el período más crítico de la infección, el sistema inmune del bovino destruye una gran cantidad de glóbulos rojos infectados. Los animales menores a 18 meses son relativamente resistentes a la enfermedad, se cree

que esto se debe a un efecto compensatorio al tener una mayor tasa de producción de ciertos mediadores químicos importantes en la respuesta inmune con respecto a los animales adultos (Aboytes-Torres *et al.*, 1994). Por ello se le considera una enfermedad del ganado adulto y de primer contacto. La fuente de infección puede ser la sangre de bovinos infectados transportada por un vector, de un animal reservorio a uno susceptible, o la saliva de una garrapata portadora en el momento de su alimentación en un animal susceptible. Dependiendo de la cantidad de organismos inoculados, de la virulencia del aislado bacteriano y de la susceptibilidad del bovino, el periodo de incubación promedio es de 30 días, variando de 15 a 60 días, aunque se han observado casos que alcanzan 90 días o más.

Las formas de transmisión son: biológica o mecánica. En la primera, la rickettsia tiene un primer ciclo de replicación en el intestino de la garrapata después de haberse alimentado en un animal portador, de donde se disemina para infectar otros tejidos y cuando la garrapata muda (larva–ninfa o ninfa–adulto) o cuando ésta se alimenta de nuevo en un hospedero no infectado, transmite la rickettsia con la saliva que inyecta al alimentarse (Kocan *et al.*, 2002), iniciando un nuevo ciclo (Shimada *et al.*, 2004). Es importante destacar que dentro de la glándula salival la rickettsia se multiplica en forma logarítmica lo que amplía la transmisión haciendo notar que con no más de 5 garrapatas infectadas se logra la transmisión de *A. marginale* (Scoles *et al.*, 2005). No se sabe sin embargo hasta la fecha, sí las formas provenientes de la garrapata al momento de que el artrópodo

infecta al bovino, alcanzan primero los eritrocitos o las células endoteliales. Aunque se han mencionado muchas especies de garrapatas como transmisoras de *A. marginale* (Kocan et al., 2002), en México *Boophilus microplus* es la garrapata más importante y en nuestro laboratorio se ha comprobado que unos cuantos machos son capaces de transmitir la bacteria de un bovino infectado a otro que no lo está. Por otro lado, se ha documentado la transmisión de madre a cría en bovinos al través de la placenta, sin constatar su importancia. En ello se involucra a vacas portadoras que por la preñez están inmunodeprimidas y presentan ciclos de rickettsemia en los que las bacterias traspasan la barrera placentaria. (Salabarría y Pino, 1988; Potgieter y van Rensburg, 1987). En la transmisión mecánica, la rickettsia, solamente es pasada a otro animal; aquí intervienen moscas hematófagas (*Stomoxys*, *Haematobia*), algunos mosquitos (*Anopheles* y *Psorophora*), algunas especies de tábanos y el hombre. Éste, empleando prácticas de manejo en las que transfiere sangre a otro animal, como son vacunaciones con una misma aguja y curaciones.

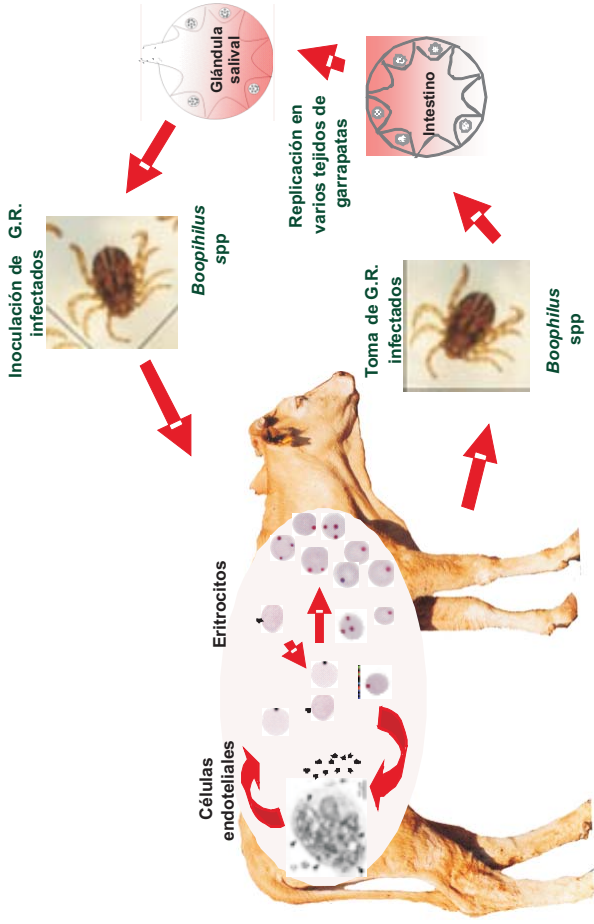


Figura 1. Ciclo de vida de *Anaplasma marginale*. La rickettsia se multiplica en los eritrocitos y células endoteliales del bovino, la garrapata lo adquiere al alimentarse y la rickettsia se multiplica en su intestino, otros tejidos y glándulas salivales. Las garrapatas, la transmiten al alimentarse en un nuevo hospedero.

EPIDEMIOLOGÍA – HISTORIA NATURAL

La anaplasmosis es casi endémica en diferentes partes del mundo, desde el lejano oriente, Australia, África, Europa y en América (Wen *et al.*, 2002; Ziam y Benaouf, 2004; Stevens *et al.*, 2007; Naranjo *et al.*, 2006; Bock *et al.*, 2003; Vidotto *et al.*, 2006; Jiménez Ocampo *et al.*, 2008); particularmente, en las regiones tropicales y subtropicales. *Anaplasma marginale* es altamente específica para ciertas especies de rumiantes, infectando ovinos, caprinos o cérvidos, así como antílopes, jirafas, borregos cuernos largos, búfalo americano, búfalo de agua y otras especies de ungulados del viejo y del nuevo mundo (Aguirre *et al.*, 1992; Deem *et al.*, 2004; Tonetti *et al.*, 2009; Yabsley *et al.*, 2005) y causando daño principalmente al ganado bovino. En Europa *A. marginale* se encuentra principalmente en países en el Mediterráneo y ha sido descrita en ganado o asociado con otras especies silvestres (De la Fuente *et al.*, 2005). En el continente americano, como en los EE UU A, la anaplasmosis es endémica en los estados del sur de las costas del Atlántico, y del Golfo de México, varios estados del medio oeste y la costa oeste. Sin embargo, ésta enfermedad ha sido reportada en casi todos los estados de la unión americana. Esta distribución tan amplia así como su incremento parece ser resultado de la movilización de bovinos con la subsecuente transmisión mecánica y biológica de bovinos asintomáticos infectados en forma persistente a bovinos susceptibles. Igualmente, es enzoótica en México, América Central y Sudamérica, así como en las Islas del Caribe; con excepción de áreas desérticas y ciertas hileras montañosas, como los Andes (Guglielmone, 1995).

De la misma forma, rumiantes silvestres usados para cacería en ranchos mexicanos han sido positivos a anticuerpos contra *A. marginale* y se asume que pueden ser reservorios de la bacteria (Gomes *et al.*, 2008; Ngeranwa *et al.*, 2008; De la Fuente *et al.*, 2005); ya que se ha postulado que los animales silvestres fungen como reservorios al ser también hospederos de las mismas

garrapatas e infectarse con *A. marginale* (Otim *et al.*, 1980).

Las tasas de seroprevalencia de *Anaplasma marginale* varían ampliamente entre los diferentes países de América y la variabilidad en estas tasas contribuye al desarrollo de regiones geográficas con estabilidad enzoótica. En un área enzoótica, la mayoría de los bovinos quedan infectados en las primeras 24 semanas de vida sin presentar signos clínicos severos. Estos animales pueden quedar como portadores sanos para toda su vida aunque en condiciones de estrés pueden nuevamente manifestar la enfermedad. Los bovinos de todas las razas, son igualmente susceptibles a la infección por *Anaplasma*; las razas cebuínas sin embargo, son más resistentes a la infestación por garrapatas y tienen una probabilidad menor de infectarse con la rickettsia.

En el año 2003 México cerró sus fronteras a la importación de vaquillas de reemplazo de los Estados Unidos y Canadá, debido a la presencia de casos de encefalopatía espongiiforme bovina en dichos países (Villamar y Olivera, 2005; Stack *et al.*, 2004; CDC, 2004; Nolen, 2004; FAO, 2008). Los reemplazos tuvieron que comprarse en Australia, Nueva Zelanda y otros estados en México donde la anaplasmosis está presente, pero no es problema (Villamar y Olivera, 2005). La introducción de bovinos portadores a hatos libres y la transmisión mecánica, trajo consecuencias muy severas en animales adultos como la pérdida de la producción láctea y la muerte en muchos casos. La industria lechera organizada, determinó que para la repoblación de los hatos con animales de origen mexicano, se deberían descartar todos aquellos que resulten ser positivos en alguna prueba diagnóstica que identifique la presencia del agente causal, en los hatos de donde se deseara obtener reemplazos (Parrodi, SENASICA, 2009); esto hizo que se incrementara el número de sueros probados para Anaplasmosis, de unos cientos en el año 2002 a varios miles entre los años 2004 hasta 2008, en estados como Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato y Nuevo León, donde la enfermedad no se consideraba un

problema (Figura. 2). Aunque el número de animales reactores positivos a la anaplasmosis se desconoce a nivel nacional, se ha observado que están presentes aún en zonas áridas y/o altitudes donde no hay, o solo existen pequeñas poblaciones de garrapatas *Boophilus* o *Dermacentor* (Parrodi, SENASICA, 2009; Fragoso, 1991). De la misma forma, ganado susceptible de alto registro de zonas de baja prevalencia, en las que el número de animales positivos es bajo, se pone en riesgo cuando se mueve a zonas donde la incidencia o el número de casos son altos o lugares donde las poblaciones de garrapatas fluctúan. Este ha sido el caso en el municipio de Soto la Marina, Tamaulipas; donde hasta un 30% de la población murieron en brotes durante el año 2006 (Observaciones personales; Almazán *et al.*, 2008).

El impacto de la anaplasmosis se debe a su efecto inmediato en el decremento de la producción láctea y la pérdida de peso vivo en la engorda; en la crianza, al retrasar la preñez en vacas afectadas y como causa secundaria no infecciosa de abortos; además de la muerte de animales, principalmente los de alta productividad, que no han tenido contacto con el agente patógeno y se trasladan a áreas endémicas. Esto se debe a la susceptibilidad de una porción del ganado nativo de áreas endémicas inestables, en las que las tasas de transmisión son insuficientes para asegurar que los bovinos estén inmunes antes de alcanzar la edad adulta. La Anaplasmosis tiene gran importancia económica en países con clima cálido y es menor en áreas templadas. Los gastos derivados de la aplicación de medidas de prevención, tales como control de vectores o quimioterapia, pueden ser negativamente cuantiosos a la economía de las explotaciones ganaderas. Las pérdidas por anaplasmosis son difíciles de estimar, excepto cuando ocurre la muerte y se asigna un valor al animal, que variará de acuerdo a la raza, sexo, edad y estado fisiológico; como es el caso de aquellos de alto registro, valuados en más de diez mil dólares (USCy). Igualmente, las pérdidas dependerán de la presencia de otras garrapatas y enfermedades parasitarias, el

uso frecuente de acaricidas y un número indeterminado de factores misceláneos (Jonsson *et al.*, 2008). Se sabe que la mayoría del territorio nacional está constituido por áreas tropicales en las que la enfermedad es endémica (Figura 2) (García *et al.*, 2000); como son la vertiente del Pacífico, el litoral del Golfo de México y el Sureste, en donde estudios serológicos y moleculares señalan prevalencias superiores a 50% (Fragoso, 1991, Figueroa *et al.*, 1993; Cossío *et al.*, 1997). Aunque en México no existen datos económicos que indiquen el grado de la pérdida, una compañía aseguradora de ganado sitúa a la Anaplasmosis como causante del 26% de la mortalidad en sementales y vaquillas asegurados, e introducidos a zonas endémicas (Rodríguez *et al.*, 1999); lo que ha sido una limitante al desarrollo de la ganadería. Se juzga que su distribución geográfica continuará cambiando como resultado del calentamiento global, por influir sobre la distribución de los vectores, al movilizar a las garrapatas con sus hospederos (Jonsson y Reid, 2000).

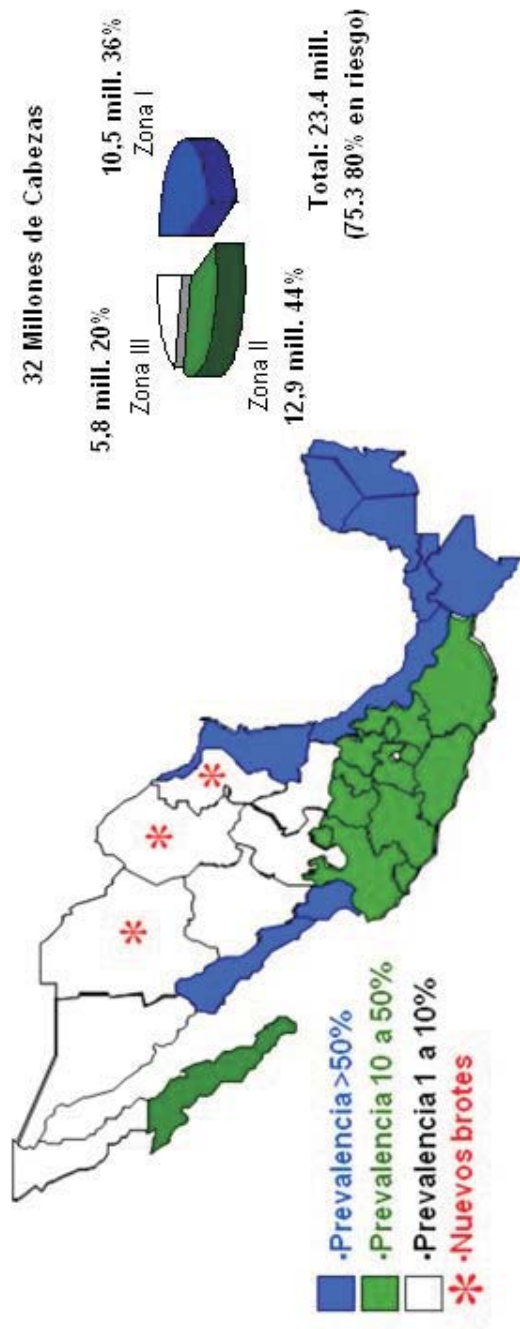


Figura 2. Distribución de la prevalencia de la anaplasmosis bovina en México y de brotes en los últimos tres años los estados de Chihuahua, Coahuila y Nuevo León. Se muestra la dispersión de ganado con relación a la endemidad en el mapa (Modificado de Rodríguez *et al.*, 2009).

TRATAMIENTO – QUIMIOTERAPIA

Las tetraciclinas son medicamentos bacteriostáticos que funcionan mediante la inhibición de la síntesis de proteínas, intercalándose con el ADN o uniéndose de manera reversible a los ribosomas y al ARN mensajero; al través de la unión con la subunidad ribosomal 30S (Scholar y Pratt, 2000). La clorotetraciclina y oxitetraciclina son los únicos compuestos derivados de la teraciclina aprobados para su uso en contra de brotes agudos de anaplasmosis bovina en los Estados Unidos (Bayley, 2005). La oxitetraciclina es obtenida a partir de *Streptomyces rimosus*.

La oxitetraciclina administrada mediante inyección intramuscular a razón de 20 mg/Kg en 2, 3 ó hasta 4 ocasiones con intervalos de 3 a 7 días ha sido reportada como efectiva en la eliminación del agente infeccioso. Los casos clínicos que se nos presentan en los bovinos en experimentación de la Unidad de Anaplasmosis del CENID-PAVET los hemos controlado utilizando cada 24 horas la dosis mencionada por 3 ó 4 días, hasta la desaparición de la rickettsemia y aplicando la presentación de larga duración en la última dosificación. Sin embargo, existen referencias bibliográficas que mencionan que este medicamento no elimina las infecciones de *A. marginale* a la dosis terapéutica usualmente recomendada (Kuttler y Simpson, 1978; Stewart *et al.* 1979).

La terapia con base en estos químicos quizás ha sido la medida más empleada en los Estados Unidos, más que en otras partes del mundo, pero resulta costosa. Otro medicamento utilizado en el tratamiento de Anaplasmosis bovina es el Imidocarb® a dosis de 5

mg por kg de peso vivo.

Para una mejor y más rápida recuperación la terapia puede incluir productos que contengan hierro y estimulantes de la hematopoyesis y del sistema inmune. El pronóstico del tratamiento depende en gran medida de la pérdida de glóbulos rojos y del porcentaje de eritrocitos infectados al momento de iniciar el tratamiento; hematocrito bajo, menor al 15%, y porcentaje de infección alto, mayor al 20%, se deberá tomar con pronósticos reservados.

MÉTODOS DE PREVENCIÓN

El control de esta enfermedad por medio de vacunas inactivadas o vivas prácticamente no ha variado en los últimos 78 años, desde que Omlin en Suiza en 1932 inmunizó con *Anaplasma centrale* bovinos destinados a zonas endémicas a *A. marginale* (REDLAB, 1992).

“INFECCIÓN NO CONTROLADA” Y QUIMIOPROFILAXIS SUPERVISADA: Para inmunizar bovinos susceptibles a esta rickettsia se ha empleado sangre infectada como inóculos no controlados proveniente de animales portadores o de animales con infección aguda. Esta estrategia de inmunización tiene varios inconvenientes: por un lado existe el riesgo de que la sangre no contenga el número adecuado de eritrocitos infectados para establecer una respuesta inmunoprotectora suficiente en los animales “vacunados” y, por el otro, el período para evidenciar la infección puede ser tan largo que los animales llegan a sufrir la

infección en ausencia de seguimiento; aunado a lo anterior, está el riesgo de transmitir otros agentes patógenos a través de la sangre como Babesia, Brucella, Mycobacterium o virus como los de diarrea viral bovina y leucosis bovina (Rogers et al., 1988).

Adicionalmente el uso de vacunas que contienen elementos de la sangre o sus derivados en cantidades significativas, puede provocar la presentación de isoeritrolisis neonatal (Dennis et al. 1979; Dimmock y Bell, 1970). Como alternativa se emplea la quimioprofilaxis supervisada durante el período de introducción de los animales susceptibles a zonas de riesgo; en este método, aquellos que se introducen sin protección son monitoreados hasta el momento en que comienzan a desarrollar una rickettsemia observable al microscopio, posteriormente se aplican quimioterapia específica antes de que se presenten los signos clínicos (Jorgensen et al., 1993). Este manejo lleva implícito el riesgo de tratar a los animales antes de que desarrollen una respuesta inmune capaz de proteger contra las infecciones subsecuentes, lo que puede llevar a resultados contrarios a los esperados (Rodríguez et al., 2004).

VACUNAS INACTIVADAS: Las vacunas muertas han tenido resultados variables (REDLAB, 1992), su mayor aplicación se encuentra cuando son elaboradas a partir de las cepas locales (homólogas) debido a que muchas veces la protección conferida por una cepa no protege contra otra cepa diferente (heteróloga) (Kuttler et al., 1984). En América, una de las primeras vacunas comerciales inactivadas evaluada contra *A. marginale* fue

Anaplaz®, que debido al deficiente proceso de purificación de los cuerpos iniciales estimularon la formación de isoanticuerpos, mismos que fueron responsables de una isoeritrolisis neonatal pronunciada (Ristic y Carson, 1977). En México, a mediados de la década de los años 90, se evaluó bajo condiciones controladas y de campo otra vacuna comercial inactivada (Plazvax®), que si bien había mejorado sustancialmente su proceso de purificación de los cuerpos iniciales de *A. marginale*, fracasó al enfrentarse al repertorio antigénico de las cepas nativas del país (Comité de Enfermedades Parasitarias, 1995; Figueroa *et al.*, 1999). Utilizando la misma cepa y la misma metodología empleada en la vacuna Plazvax, actualmente la Universidad Estatal de Louisiana, EE UU A, ofrece una vacuna inactivada que aseguran ha protegido contra la infección a bovinos de Estados Unidos y de Puerto Rico (Luther, 2005). De forma paralela, en México se han desarrollado vacunas inactivadas a partir de cepas locales. Inicialmente se emplearon dosis en valores equivalentes a números de eritrocitos infectados; al mejorar la purificación de los cuerpos iniciales, utilizando dosis de 30 µg de proteína de la rickettsia por animal, aplicada por vía intramuscular profunda en dos ocasiones con 21 días de diferencia, han brindado una protección superior al 85% ante desafíos homólogos (Rodríguez *et al.*, 1999, 2000).

Los animales que sufren la anaplasmosis bovina sea en forma natural o inducida, quedan protegidos contra posteriores reinfecciones (Vizcaino *et al.*, 1980; Kuttler *et al.*, 1984; Palmer, 1989), este principio se ha usado en el diseño de vacunas

(Palmer et al., 1988); sin embargo la variación antigénica de las cepas de *A. marginale* puede ser un factor muy importante a considerar. En este sentido, De la Fuente y cols. (2007) caracterizaron 131 aislados de *A. marginale* en el mundo, registrando 79 secuencias diferentes del gen *msp1 α* ; de los 7 aislados de México en ese trabajo, al menos 5 tienen secuencias diferentes. A la fecha, en varios países se cuenta con inmunógenos que confieren protección aceptable ante desafíos homólogos (REDLAB, 1992). Proteínas de Superficie Principales nativas y recombinantes, MSP1, MSP2, MSP3, MSP4 y MSP5, por sus siglas en inglés; también han sido evaluadas para proteger contra esta infección con resultados parciales o negativos (Kocan et al., 2000). Varios estudios se han dirigido también a la evaluación de proteínas relacionadas con el estímulo de linfocitos CD4+, productores de Interferón gamma e Interleucinas 2 y 12 con el propósito de aumentar la protección (Barigye et al., 2004).

Vacunas Vivas: Como inmunógenos vivos controlados se han empleado cepas vivas atenuadas o de baja virulencia de *Anaplasma marginale* y la subespecie *Anaplasma centrale*, que desde su descubrimiento se observó provocaba infecciones menos virulentas a las ocasionadas por *A. marginale* en bovinos (Theiler, 1911). Las vacunas vivas atenuadas tienen la ventaja de que los microorganismos empleados para su elaboración han perdido o disminuido su virulencia, de tal forma que no producen un cuadro clínico severo, pero siguen multiplicándose lo suficiente para que el sistema inmune pueda reconocer su amplia

gama de antígenos y por lo tanto pueden conferir una respuesta inmune sólida (Rodríguez et al., 2004).

Anaplasma subespecie centrale, originalmente descrita como de baja virulencia y que protege a los bovinos de una infección por *A. marginale*, se ha empleado extensamente por más de 70 años. En el continente Americano se ha evaluado en Argentina (1955), Venezuela (1958), Uruguay (1962), Perú (1966) y Brasil (1988); sin embargo, se han multiplicado los reportes de protección parcial o de aparición de brotes severos posvacunación (REDLAB, 1992; Kocan et al., 2000). En México esta especie no existe y su uso está prohibido por considerarse exótica.

Los principales métodos de atenuación de *A. marginale* han sido preponderantemente pases en ovinos y/o en venados, combinados con irradiación gamma. Los primeros intentos en América para atenuarla, se deben a Lignieres, en Argentina, al realizar pases de la rickettsia por ovejas (Lignieres, 1925). La cepa Florida de *A. marginale* atenuada en 1968 (Ristic y Carson, 1977) fue evaluada en Estados Unidos, Perú, Venezuela, Colombia, Brasil y México; sin embargo, a la fecha, la única vacuna viva de *A. marginale* que se comercializa en América del Norte es la vacuna viva modificada, multiplicada en ovinos, que ofrece la Universidad de California-Davis, de los EE UU A (Maas, 2005). Si bien se han descrito resultados positivos al emplear las anteriores vacunas, éstas solamente están indicadas para animales jóvenes y su protección es deficiente ante desafíos con cepas autóctonas de otras latitudes que cuenten con un repertorio antigénico diferente (Kocan *et al.*, 2000). En otros

países también se han registrado cepas de baja virulencia de *A. marginale*, ese es el caso de Australia (Bock *et al.* 2003), donde han descrito la cepa “*Dawn*” que tiene la cualidad de ser de baja virulencia; los estudios realizados hasta ahora la señalan como un buen prospecto para ser usada en ese país como vacuna viva. En México existe la cepa Yucatán de *A. marginale*, elegida por su baja virulencia natural, ya que después de haber sido inoculada en 113 bovinos a diferentes dosis, solamente requirió tratamiento en un bovino, por presentar la infección clínicamente; Posteriormente, más de 100 bovinos inoculados fueron desafiados con cepas heterólogas de *A. marginale* ofreciendo una protección del 86%; mientras que el 56% de los animales de los grupos testigo no vacunados requirieron tratamiento (Rodríguez *et al.*, 2008).

En otro ensayo más, dentro del Macroproyecto “Productividad sostenible de los hatos de cría en pastoreo” auspiciado por la UNAM, se aplicó la vacuna viva en animales jóvenes serológicamente negativos en el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y por la prueba de reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), observando que los animales vacunados alcanzaron una limitada eficacia del 21.8%, pero aunado a que padecen menos de los efectos del mantenimiento en condiciones de pastoreo en clima cálido húmedo, en comparación con los testigos, al reducir algunos signos clínicos asociados a la enfermedad.

CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS Y MOLECULARES DEL AGENTE CAUSAL

Anaplasma marginale es una bacteria patógena, gram negativa y agente causal de la Anaplasmosis bovina (Ristic, 1981); está clasificada dentro del orden Rickettsiales, recientemente organizado en dos familias Anaplasmataceae y Rickettsiaceae basados en análisis genéticos de las secuencias 16S del ARN ribosomal, groELS y proteínas de la superficie (Dumler *et al.*, 2001). Los miembros de la familia Anaplasmataceae son bacterias intracelulares obligadas que se ubican en vacuolas circunscritas por una doble membrana dentro del citoplasma de las células del hospedero, que normalmente permanece infectado de por vida (Eriks *et al.*, 1993; Kieser *et al.*, 1990).

Los avances en ciencias genómicas han hecho posible que ya se haya secuenciado el genoma completo de muchos organismos incluyendo el de *A. marginale* (Brayton *et al.* 2005) y de algunos organismo relacionados como *Ehrlichia ruminantium* (Collins *et al.*, 2005). *Anaplasma marginale* se clasifica en la misma familia junto con organismos como *A. centrale* y *A. ovis*. En esta clasificación se incluyen organismos que antes se clasificaban en el género Ehrlichia, como el agente causal de la ehrlichiosis granulocítica *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum*, *Anaplasma (Ehrlichia) bovis* y *Anaplasma (Ehrlichia) platys* (Dumler *et al.*, 2001). *A. marginale* y *E. ruminantium* tienen un genoma circular muy pequeño (1'197,687 pb y 1'516,355 pb) pero su contenido en bases puricas (G+C) es muy diferente ya que para *A. marginale* es de 47% mientras que para *E. ruminantium* es de 27.5%. El genoma de *A. marginale* está dominado por dos superfamilias de proteínas, MSP1 y MSP2 y, de los 950 marcos abiertos de lectura (regiones codificantes) se espera que solo 62 estarían localizadas en la superficie y 49 de ellas corresponden a las superfamilias MSP1 y MSP2 (Brayton *et al.*, 2005; Rodriguez *et al.*, 2008). El genoma de *E. ruminantium* por su lado es más

parecido a *E. chaffeensis* y a *Rickettsia prowazekii* con un contenido de G+C de 29.1% con 834 marcos abiertos de lectura (Dunning Hotopp *et al.*, 2006; Andersson *et al.*, 1998). El tamaño del genoma de *A. marginale* es similar al otros patógenos intracelulares obligados como *Chlamydia*, *Rickettsia*, *Ehrlichia*, micoplasmas y espiroquetas (Andersson, 2006). Se ha aceptado que el tamaño reducido del genoma de estos patógenos es el resultado de un proceso de evolución reductiva en el que los patógenos derivan de un precursor más grande. Este proceso inicia con una mutación seguida de la pérdida de la función, más mutaciones y la eliminación del gen en cuestión (Andersson *et al.*, 2001). El genoma de *Anaplasma* tiene 14% de ADN no codificante, similar a lo encontrado en *Borrelia*, *Rickettsiae* y *Chlamydiae* donde la eliminación de genes está directamente relacionada con la pérdida de funciones metabólicas, incluyendo la reducción de vías redundantes y genes duplicados (Andersson *et al.*, 2001). Especulativamente, también puede ser a consecuencia de que sus funciones metabólicas le sean provistas por la célula huésped.

Variabilidad y Diversidad: El éxito de un parásito se basa en su capacidad para establecer una infección persistente, de esta manera se optimiza la oportunidad de ser transmitido a otros hospederos (Palmer *et al.*, 2009; Futse *et al.*, 2008). En el caso de *A. marginale*, se sabe que una vez que se controla la primoinfección, los animales pueden permanecer infectados de por vida (Bock *et al.*, 2003; Ooshiro *et al.*, 2009), a pesar del tratamiento, que solo ayuda a controlar la infección (Coetzee *et al.*, 2006). Por otro lado, también se sabe que a pesar de haber padecido la enfermedad, los animales infectados pueden presentar signos clínicos de la enfermedad, que pueden deberse a una recaída o la infección con una nueva cepa a la que el sistema inmune del hospedero no está familiarizado (Rodríguez *et al.*, 2009). Dos mecanismos exitosamente usados por patógenos en general para evadir el sistema inmune de los hospederos son, por un lado la diversidad genética, es decir la

existencia de subpoblaciones de patógenos muy similares pero con diferencias que permiten que más de un patógeno pueda invadir al mismo hospedero inmunizado (Futse *et al.*, 2008); en segundo término se presenta el fenómeno de la variabilidad genética o cambio de determinantes antigénicos (mutaciones) dentro de la misma población del parásito una vez que se ha establecido un equilibrio hospedero/parásito (Palmer *et al.*, 2009). Para explicar la permanencia de *A. marginale* hablaremos primero de la diversidad y en segundo término de la variabilidad. Por diversidad genética se entiende la variación o diferencias de los genes dentro de cada especie. La diversidad permite a varias poblaciones o subpoblaciones de la misma especie infectar en algunos casos al mismo hospedero. En el caso de *A. marginale* la relación de la rickettsia y el bovino es compleja ya que tiene interacciones con el eritrocito y con las células endoteliales, que recubren los vasos sanguíneos (Ristic, 1981; Carreño *et al.*, 2007).

En la superficie de la rickettsia existe una serie de proteínas que se han estudiado ampliamente que sin duda tienen alguna función importante para la rickettsia (Rodríguez *et al.*, 2009) pero en particular algunas están relacionadas con la capacidad de garantizar la permanencia de la rickettsia dentro del hospedero, normalmente de por vida.

La primera proteína de interés es Msp1, que se compone de dos péptidos, Msp1a (100 kDa) y Msp1b (105 kDa), no están relacionados estructuralmente pero están unidos en forma no covalente y expuestos en la superficie de *A. marginale* (Barbet *et al.*, 1987). Msp1a está codificada por un solo gen (*msh1a*), tiene una región variable en el extremo amino terminal, compuesta de unas secuencias de 28 a 32 aminoácidos, que puede presentarse en forma individual o hasta con once (11) repeticiones (Figura 3) (Allred *et al.*, 1990). Msp1b es codificada por una familia compuesta de al menos dos genes (*msh1β1* y *msh1β2*) y tres genes truncados (*msh1β1pg*, *msh1β2pg* y *msh1β3pg*) que aparentemente se recombinan para ampliar la

diversidad genética (Barbet y Allred, 1991; Viseshakul *et al.*, 2000). Msp1a es una adhesina específica de los eritrocitos y las células de garrapata (McGarey y Allred, 1994; McGarey *et al.*, 1994; De la Fuente *et al.*, 2001c), la cual contiene epitopos tipo B considerados distractores del sistema inmune, aunque los anticuerpos específicos son capaces de neutralizar la infección hacia eritrocitos o células epiteliales de garrapata (Palmer *et al.*, 1987; Blouin *et al.*, 2002). Asimismo, en el dominio conservado Msp1a también tiene epitopos de tipo Th1 asociados a la inmunoprotección (Brown *et al.*, 2001). Estudios filogenéticos de Msp1a, muestran una amplia diversidad a nivel mundial y aún a nivel de cada país (De la Fuente *et al.*, 2007). Nuestros trabajos y de otros laboratorios en México han mostrado que en lugares donde ocurren brotes severos se pueden presentar una amplia variedad de cepas y que algunos animales dentro del mismo rancho pueden estar infectados con más de una cepa (Jiménez-Ocampo *et al.*, 2008; Almazán *et al.*, 2008). El sistema inmune de la población de bovinos ejerce presión sobre la bacteria y la obliga a mutar para que persista en la naturaleza (De la Fuente *et al.*, 2003; Jiménez-Ocampo *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2009) y la nueva variante sea transmitida a otro animal o hato.

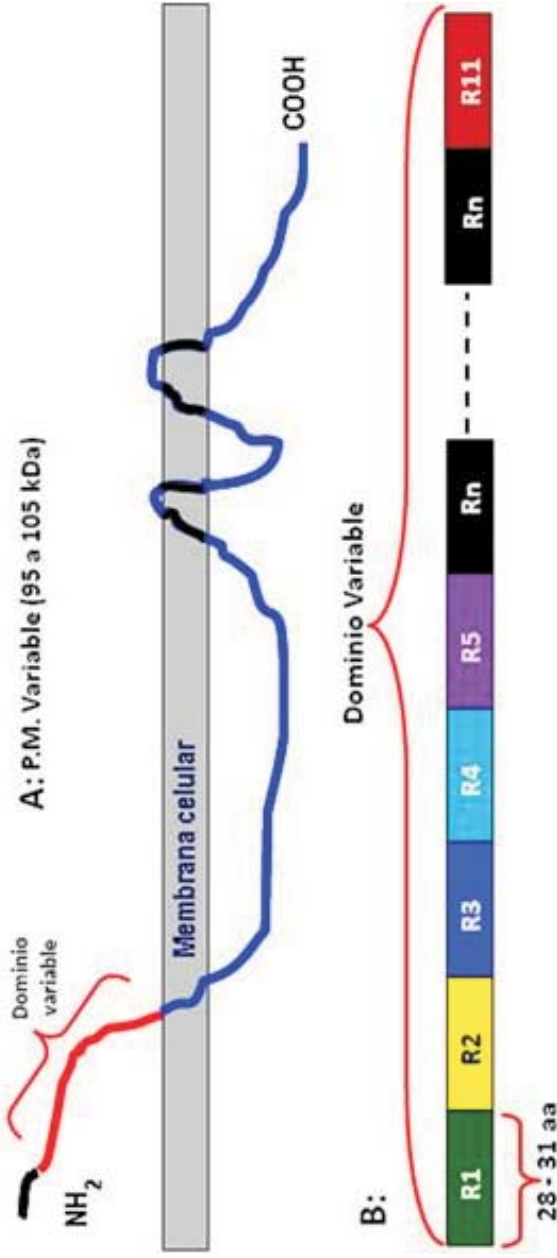


Figura 3. **Estructura de la proteína Msp1a.** A. Msp1a se conforma de un segmento citoplásmico conservado (azul), que incluye dos dominios transmembranales (negro); en el extremo amino, tiene un dominio variable extramembranal (rojo). B: El dominio variable se compone de una o más secuencias de 28 a 31 aminoácidos (REPETIDOS) que pueden ser las mismas o otras muy parecidas. Se han descrito desde una hasta once repetidos (de colores); modificado de: De la Fuente, AHRR, 2001; 2:163-173.

La segunda estrategia y quizá la más importante para garantizar la infección persistente se basa en la rápida variabilidad antigénica de proteínas de superficie. La variabilidad en este sentido se entiende como la capacidad de un gen, para cambiar en un periodo relativamente corto. Este es el caso de la proteína Msp2. Msp2 es una proteína de 36 kDa, altamente inmunogénica codificada por una familia multigénica compuesta por un gen funcional que codifica por sus extremos amino y carboxilo y 5 a 7 genes truncados (pseudogenes) que se recombinan al centro con el gen principal en un solo sitio de expresión un proceso conocido como conversión génica, de manera que se expresa una nueva variante en cada ciclo de rickettsiemia, en forma periódica cada 6 a 8 semanas (Eriks *et al.*, 1989; French *et al.*, 1999; Barbet *et al.*, 2000; Palmer and Brayton, 2007). Figura **4.A** Los pseudogenes de Msp2 codifican por secuencias hidrofílicas hipervariables que contienen epitopos B altamente inmunogénicos que inducen una respuesta inmune para cada variante de Msp2 (Barbet *et al.*, 2000; Rurangirwa *et al.*, 2000). Los extremos carboxilo y amino de la proteína son hidrofóbicos, están insertados en la membrana de la rickettsia (Noh *et al.*, 2006) y contienen epitopos de tipo Th que están conservado en varias cepas geográficas (Brown *et al.*, 1998; McGuire *et al.*, 1984; Palmer *et al.*, 1988). Más allá de que los pseudogenes se pueden recombinar en forma individual en el sitio de expresión, se ha comprobado que bajo presión del sistema inmune, la complejidad de la variante aumenta ya que fragmentos derivados de varios pseudogenes pueden recombinarse entre sí para dar una estructura “mosaico” que al

expresarse como una variante, no son reconocidos por el sistema inmune del hospedero ya inmune Figura 4.B (Barbet *et al.*, 2000; Brayton *et al.*, 2002). Sin embargo, si una variante de *A. marginale* es transmitida en ausencia de anticuerpos específicos para Msp2, los mosaicos regresan a una variante simple donde un pseudogen completo sin modificaciones se recombina con el gen conservado (Palmer *et al.*, 2007). Esto explica el que un animal ya infectado por mucho tiempo, pueda recaer con un cuadro agudo cuando es sometido a estrés o es de alguna manera inmunodeprimido (Rodríguez *et al.*, 2009).

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR. El financiamiento al proyecto “Clasificación de aislados de la rickettsia *Anaplasma marginale* mediante el uso de marcadores moleculares, para fundamentar programas de control y desarrollo de vacunas mexicanas” fue otorgado por el fondo SEP-CONACYT para efectos de establecer un banco de germoplasma. El proyecto se enfocó a la tipificación de aislados de *A. marginale* de diferentes regiones de México. Para esto, se usaron principalmente dos marcadores moleculares, los genes *msp1α* y *msp4*.

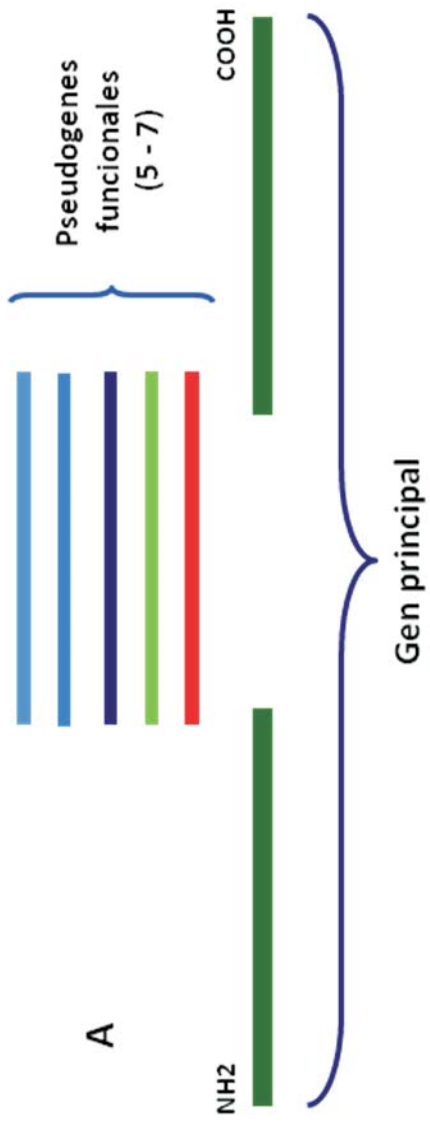


Figura 4.A Estructura de la proteína Msp2. sp2 compuesto de un gen principal que codifica los extremos amino y carboxilo, más 5 a 7 pseudogenes que se recombinan en la región central con el gen principal. Basado en: Palmer *et al.*, *Infect Immun.* 2007; 75:1502-1506.

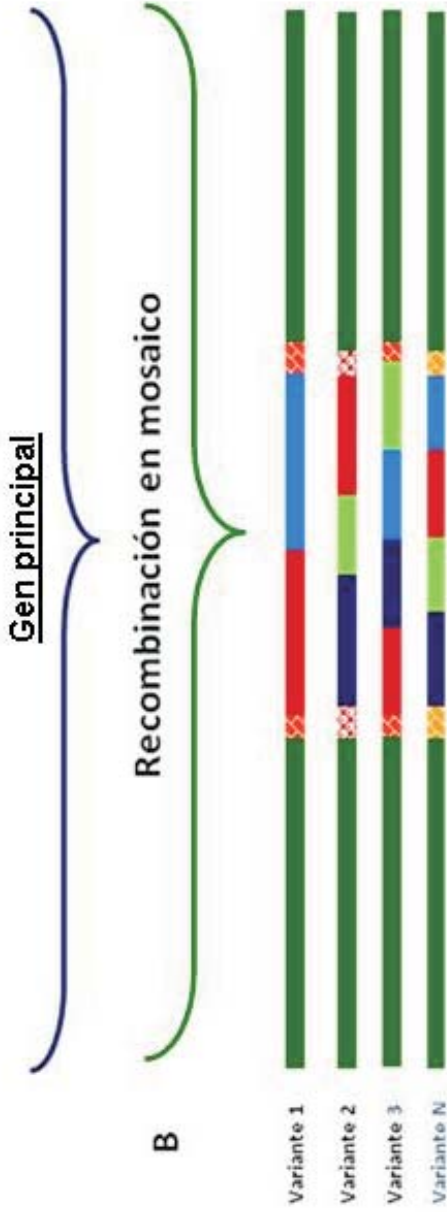


Figura 4.B **Recombinación en mosaico Msp2**. Los pseudogenes se recombinan primero en forma completa hasta agotar el repertorio, una vez que esto ocurre, segmentos de los pseudogenes se combinan entre ellos en forma de mosaico para aumentar la complejidad de las variantes que surgen cada ciclo de rickettsemia aproximadamente entre 6 a 8 semanas. **Basado en: Palmer et al., Infect Immun. 2007; 75:1502-1506.**

MSP1a

En México se ha caracterizado la región variable del gen *msp1α* en 27 aislados provenientes de 10 Estados distribuidos en el territorio nacional, como son: Aguascalientes, Chiapas, Estado de México, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Nayarit, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán; de los cuales 17 aislados han sido trabajados en el laboratorio de Anaplasmosis del CENID-PAVET y de estos varios de ellos han sido caracterizados gracias al proyecto P62525 (Jiménez-Ocampo *et al.*, 2008; Almazán *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos de las secuencias repetidas en tándem de la región variable del gen *msp1α* muestran gran diversidad entre los aislados estudiados en México y los reportados en otras partes del mundo; con estos estudios se ha logrado comprobar la amplia diversidad de este marcador, dicha diversidad ha sido observada en aislados de regiones geográficas distantes, en aislados de una misma región geográfica y aún en aislados obtenidos en un mismo rancho.

En los aislados mexicanos, el número de secuencias repetidas va desde 3 (Tlapacoyan, Ver. 01; Ticul, Yuc. y Puente de Ixtla, Mor.) hasta 7 (Tizimin Yuc.) Los aislados Texcoco, Mex.; Yautepec, Mor.; Veracruz, Ver. y Tepic, Nay.; comparten los mismos repetidos inicialmente identificados con letras del alfabeto griego (α , β , β , Γ) y los aislados Atitalaquia, Hgo.; Soto la Marina, Tamaulipas 01 y Tamaulipas G9 comparten los mismos repetidos (τ , 57, 13, 18), mientras que el resto de los aislados caracterizados presentan diferentes repetidos, los cuales se han identificado sucesivamente con números arábigos.

MSP4

La proteína MSP4 codificada por el gen *msp4* de 31 kDa, es altamente conservada entre los distintos aislados de *A. marginale*. Esta proteína contiene bloques de aminoácidos relacionados con la proteína MSP2 (Alleman y Barbet, 1996). Actualmente se usa en estudios filogenéticos dada su baja variabilidad. Estudios realizados en 2008 en México revelaron que MSP4 era conservada en un 100% de los aislados hasta ese momento estudiados (Jiménez-Ocampo *et al.*, 2008). En ese mismo año estudios en un brote de Anaplasmosis en Tamaulipas revelaron la existencia de diversidad para ese marcador en los aislados secuenciados (Almazán *et al.*, 2008). Estudios recientes revelan que *msp4* tiene una secuencia de 849 pares de bases con diferencias puntuales en la secuencia de nucleótidos que codifican para una proteína 282 aminoácidos con una gran homología, pero se comprueba la existencia de diversidad en este marcador para los aislados mexicanos.

Una estrategia adicional ha sido la revisión de otros marcadores que también estuvieran genéticamente regulados, como es el caso del sistema homólogo de secreción tipo IV e intercambio molecular.

Proteína VirB9

El sistema de secreción tipo IV ha sido descrito por su papel en la invasión, permanencia y virulencia de bacterias gram negativas (Bao y col., 2009) dentro de esas proteínas se encuentra VirB9 la cual fue caracterizada en tres aislados mexicanos de *A. marginale* de regiones geográficas distantes (Aguascalientes,

Ags, Yautepec, Mor. y Tizimín Yuc). La secuencia de VirB9 revela 840 pares de bases que codifican para una proteína de 279 aminoácidos, los resultados obtenidos en los aislados mexicanos revelan la existencia de mutaciones silenciosas en la secuencia de nucleótidos, la secuencia de aminoácidos sin embargo, presenta 100% de identidad entre los aislados mexicanos. Ello coincide con lo previamente informado para cepas de Brasil y Estados Unidos (López *et al.*, 2007; Vidotto *et al.*, 2008). VirB9 contiene un péptido señal (posición 1-23) con un peso molecular de 28.20 kDa y presenta un dominio funcional Cag-X que va de la posición 36-278. Por lo que se asume que es una proteína de transferencia conyugal, de igual forma rVirB9 fue reconocida por suero de bovinos inmunes y suero anti-rVirB9 producido en conejos, reconoció a la rickettsia *A. marginale* al través del ensayo de inmunofluorescencia indirecta.

En la figura 5, se muestra la gran diversidad y dispersión en la conformación genética de aislados mexicanos estudiados con el marcador MSP1a.

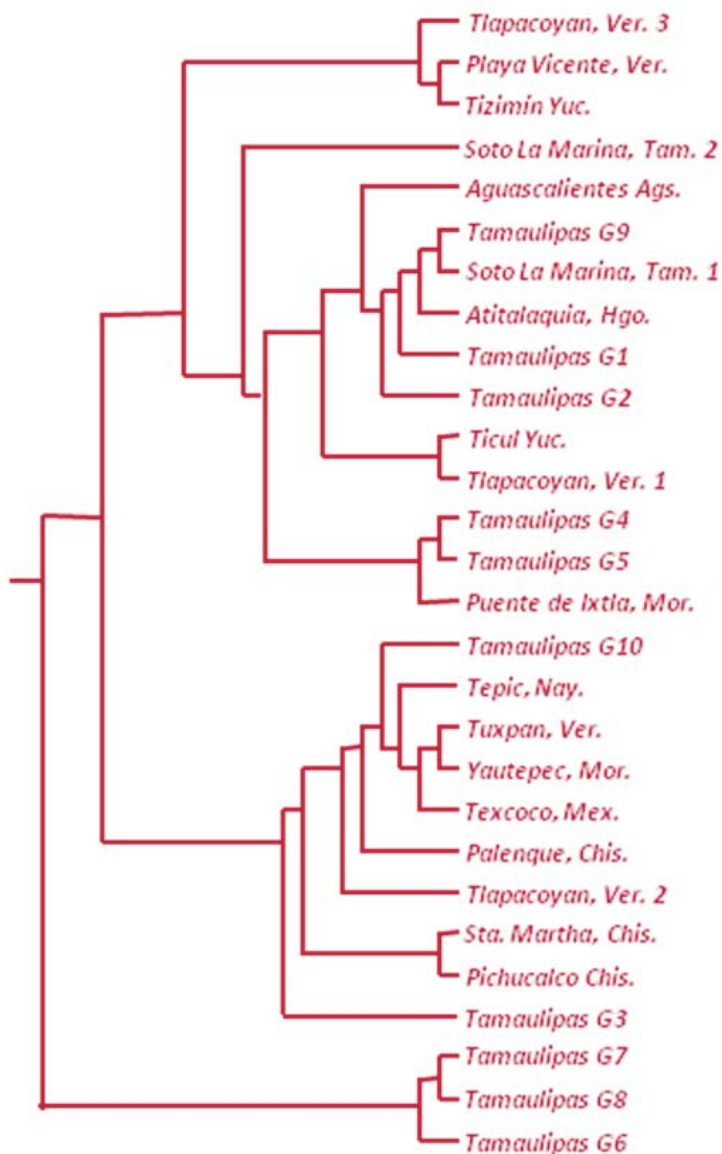


Figura 5. Árbol filogenético de *msp1α* de cepas de México, utilizando el algoritmo *Neighbor Joining* (Clustal W).

CONCLUSIONES - ¡QUÉ HACEMOS! ¡QUÉ RECOMENDAMOS!

Por el momento, lo encontrado sugiere que la prevención de esta enfermedad no es una fácil tarea; sin embargo, actualmente en México contamos ya con vacunas experimentales (varias inactivadas y una vacuna viva) que estimulan una protección adecuada ante desafío homólogo y heterólogo, pero siguen haciendo falta más evaluaciones en condiciones de campo, tanto en zonas de transición, como en zonas altamente endémicas. Con base en nuestros hallazgos, existe mucha certidumbre de que a largo plazo podremos identificar los determinantes antigénicos primordiales, suficientes para estimular una adecuada protección a través de proteínas nativas o recombinantes. Mientras esto sucede, el empleo de vacunas inactivadas conformadas por mezclas de cepas locales, la identificación de sus características genéticas, aunado a la aplicación de la vacuna viva cepa Yucatán de *Anaplasma marginale*, ofrecen en corto o mediano plazo, una herramienta de suma utilidad para disminuir las pérdidas económicas y el impacto negativo de esta infección en animales susceptibles antes de ser introducidos a las zonas endémicas de nuestro país.

LITERATURA CONSULTADA

1. Ristic M. 1981; Anaplasmosis. En: Ristic M, McIntyre I. (Eds.), Diseases of Cattle in the Tropics. Curr. Topics Vet. Med. Ani. Sci., Vol. 6. Martinus Nijhoff Publishers. pp. 327–344.
2. Munderloh UG, Lynch MJ, Herron MJ, Palmer AT, Kurtti TJ, Nelson RD, Goodman JL. 2004; Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. Vet Microbiol. 101(1):53-64.
3. Carreño AD, Alleman AR, Barbet AF, Palmer GH, Noh SM, Johnson CM. 2007; *In vivo* endothelial cell infection by *Anaplasma marginale*. Vet Pathol 44: 116 - 118.
4. Rodríguez CSD, García OMA, Cantó AGJ, Hernández GS. 1999; Ensayo de un inmunógeno experimental inactivado contra *Anaplasma marginale*. Tec Pecu Méx 37 (1):1 - 12.
5. Barigye R, García OMA, Rojas REE, Rodríguez SD, 2004; Identification of IgG2-specific antigens in mexican *Anaplasma marginale* strain. Ann. NY Acad. Sci. (1026): 84-94.
6. Aboytes-Torres R, Rodríguez SD, Vega CA, 1994; Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis. Arch Med Res, 25: 247-252.
7. Kocan KM, De La Fuente J, Blouin EF, Garcia-Garcia JC. 2002; Adaptations of the tick-borne pathogen, *Anaplasma marginale*, for survival in cattle and ticks. Exp Appl Acarol. 28(1-4):9-25.
8. Shimada MK, Yamamura MH, Kawasaki PM, Tamekuni K, Igarashi M, Vidotto O, Vidotto MC, 2004; Detection of *Anaplasma marginale* DNA in larvae of *Boophilus microplus* ticks by polymerase chain reaction. Ann N Y Acad Sci, 1026: 95 – 102.
9. Scoles GA, Broce AB, Lysyk TJ, Palmer GH. 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(4):668-75.

10. Salabarría FF, Pino R. 1988; Transmisión vertical de *Anaplasma marginale* en bovinos infectados durante el período final de la gestación. Rvta Cub Cienc Vet, 19 (3):179-182.
11. Potgieter FT, van Rensburg L, 1987; The persistence of colostral *Anaplasma* antibodies and incidence of in utero transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. Onderstepoort J Vet Res, 54 (4): 557 – 560.
12. Guglielmone AA.1995; Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. Vet. Parasitol. 57:109-119.
13. De la Fuente J, Lew A, Lutz H, Meli MI, Hofmann-Lehmann R, Shkap V, Molad T, Mangold AJ, Almazán C, Naranjo V, Gortázar C, Torina A, Caracappa S, García-Pérez AI, Barral M, Poprto B, Ceci L, Carelli G, Blouin EF, Kocan KM. 2005. Genetic Diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. Anim. Health Res. Rev. 6. 75-89.
14. Wen, B., Jian, R., Zhang, Y., Chen, R., 2002. Simultaneous detection of *Anaplasma marginale* and a new *Ehrlichia* species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* by sequence analyses of 16S ribosomal DNA in *Boophilus microplus* ticks from Tibet. J. Clin. Microbiol. 40, 3286–3290.
15. Ziam H, Benaouf H. 2004; Prevalence of blood parasites in cattle from wilayates of Annaba and El Tarf east Algeria. Arch. Inst. Pasteur Tunis 81:27–30.
16. Stevens KB, Spickett AM, Vosloo W, Pfeiffer DU, Dyason E, Du Plessis B. 2007. Influence of dipping practices on the seroprevalence of babesiosis and anaplasmosis in the foot-and-mouth disease buffer zone adjoining the Kruger National Park in South Africa. Onderstepoort J. Vet. Res. 74, 87–95.
17. Naranjo V, Ruiz-Fons F, Höfle U, Fernández de, MIG, Villanua, D., Almazán C, Torina A, Caracappa S, Kocan KM, Gortázar C, de la Fuente J. 2006. Molecular epidemiology of human and bovine anaplasmosis in southern Europe. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1078, 95–99.

18. Bock RE, de Vos AJ, Kingston TG and Carter PD., 2003: Assesment of a low virulence Australian isolate of *Anaplasma marginale* for pathogenicity, inmunogenicity and transmissibility by *Boophilus microplus*. Vet. Par. 2003 (118): 121-131. 1.
19. Vidotto MC, Venancio EJ, Vidotto O. 2008. Cloning sequencing and antigenic characterization of rVirB9 of *Anaplasma marginale* isolated from Parana State, Brazil. Genet. Mol. Res. 7:460-466.
20. Jiménez Ocampo R, Rodríguez Camarillo SD, Rosario Cruz R, Orozco Vega LE, De la Fuente J. 2008; *Anaplasma marginale*: análisis de las secuencias del fragmento variable del gen msp1 α y del gen msp4 de cuatro nuevas cepas mexicanas. Tec Pecu Méx 46(1):69-78.
21. Aguirre DH, Gaido AB, Vinabal AE, De Echaide ST, Guglielmone AA. 1994. Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different levels of rickettsaemia. Parasite 1, 405–407.
22. Deem SL, Noss AJ, Villarroel R, Uhart MM, Karesh WB, 2004. Disease survey of free-ranging grey brocket deer (*Mazama gouazoubira*) in the Gran Chaco, Bolivia. J. Wildl. Dis. 40, 92–98.
23. Tonetti N, Berggoetz M, Rühle, C., Pretorius, A.M., Gern, L., 2009. Ticks and tickborne pathogens from wildlife in the free state province, SouthAfrica. J. Wildl. Dis. 45, 437–446.
24. Yabsley MJ, Davidson WR, Stallknecht DE, Varela AS, Swift PK, Devos JC, Dubay SA, 2005. Evidence of tick-borne organisms in mule deer (*Odocoileus hemionus*) from the western United States. Vector Borne Zoonotic Dis. 5, 351–362.
25. Gomes, R.A., Machado, R.Z., Starke-Buzetti, W.A., Bonesso, M.A., 2008. Immunehumoral response of water buffalo (*Bubalus bubalis*) against *Anaplasma marginale* (Theiler 1910). Rev. Bras. Parasitol. Vet. 17, 73–80.

26. Ngeranwa JJ, Shompole SP, Venter EH, Wambugu A, Crafford JE, Penzhorn BL, 2008. Detection of *Anaplasma* antibodies in wildlife and domestic species in wildlife-livestock interface areas of Kenya by major surface protein 5 competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. Onderstepoort J. Vet. Res. 75, 199–205.
27. Otim C, Wilson AJ, Campbell RS, 1980; A comparative study of experimental anaplasmosis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. Aust Vet J, 56 (6): 262-266.
28. Villamar AL, Olivera CE, 2005. Situación actual y perspectiva de la producción de leche de bovino en México 2005. Coordinación General de Ganadería. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación 1–39.
29. Stack MJ, Balachandran A, Chaplin M, Davis L, Czub S, Miller B, 2004. The first Canadian indigenous case of bovine spongiform encephalopathy (BSE) has molecular characteristics for prion protein that are similar to those of BSE in the United Kingdom but differ from those of chronic wasting disease in captive elk and deer. Can. Vet. J. 45, 825–830.
30. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2004. Bovine spongiform encephalopathy in a dairy cow—Washington State, 2003. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 52, 1280–1285.
31. Nolen RS, 2004. Washington state dairy cow nation's first case of BSE. J. Am. Vet. Med. Assoc. 224, 345–346.
32. FAO 200
<http://www.rlc.fao.org/es/prioridades/transfron/eeb/enfermedad/dis tri.htm>.
33. Parrodi F. 2009; SENASICA, Comunicación Personal.
34. Fragoso SH, 1991; La anaplasmosis bovina en México. Garrapatas y enfermedades que transmiten. Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal: 153 - 160.
35. Almazan C, Medrano C, Ortiz M, De la Fuente J. 2008; Genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains from an outbreak of bovine anaplasmosis in an endemic area. Vet Parasitol. 158(1-2):103-109.

36. Jonsson NN, Bock RE, Jorgensen WK. 2008; Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Vet. Parasitol.* 155:1-9.
37. García OMA, Aboytes TR, Hernández SG, Cantó AGJ, Rodríguez CSD. 2000; *Anaplasma marginale*: Diferentes grados de virulencias en dos aislados mexicanos. *Vet. Méx.* 31(2):157-160.
38. Figueroa JV, Alvarez JA, Vega CA, Buening GM. 1993; Use of multiplex polymerase chain reaction-based assay to conduct epidemiological studies on bovine hemoparasites in Mexico. *Rev Elev Med Vet Pays Trop.* 46(1-2):71-75.
39. Cossío BR, Rodríguez SD, García OMA, García TD, Aboytes TR. 1997; Bovine anaplasmosis prevalence in northern Veracruz state, Mexico. *Prev Vet Med.* 32 (3 -4): 165 - 170.
40. Jonsson NN, Reid SWI. 2000; Global climate change and vector borne diseases. Guest editorial. *Vet. J.* 160.87-89.
41. Rodríguez SD, García-Ortiz MA, Jiménez-Ocampo R, Vega y Murguía CA. 2009; Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in México. *Infect Genet Evol.* 9(6):1092-1101.
42. Kuttler KL, Simpson JE. 1978; Relative efficacy of two oxytetracycline formulations and doxycycline in the treatment of acute anaplasmosis in splenectomised calves. *Am. J. Vet. Res.* 39:347-349.
43. Stewart CG, Immeiman A, Grimbeek P, Grib G. 1979; The use of a short and long acting oxytetracycline for the treatment of *Anaplasma marginale* in splenectomized calves. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 50:83-85.
44. Scholar EM, Pratt WB. 2000; Bacteriostatic inhibitors of protein synthesis-tetracyclines. En: *The Antimicrobial Drugs.* 2nd ed. Oxford University Press. New York, pp. 184-199.
45. Bayley AJ. (Publisher) 2005; *Compendium of Veterinary Products*, Eighth Edition. North American Compendiums Inc. Port Huron. MI.

46. REDLAB (Red de Cooperación Técnica entre Laboratorios de Investigación y Diagnóstico Veterinario), 1992:. Programa de Hemoparásitos. Inmunógenos y métodos de inmunización para el control de la anaplasmosis y babesiosis bovina. GAN-41 Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Santiago, Chile: 1-34
47. Rogers RJ; Dimmock CK, de Vos AJ, Rodwell B J. 1988; Bovine leucosis virus contamination of a vaccine produced in vivo against bovine babesiosis and anaplasmosis. Aust. Vet. J. 65:285.
48. Dennis RA, O'Hara PJ, Young MF, Dorris KD. 1979; Neonatal immunohemolytic anemia and icterus of calves. J. Am. Vet. Med. Assoc. 156:1861-1869.
49. Dimmock CK, Bell k. 1970; Hemolytic disease of the newborn in calves. Aust. Vet. J. 46:44.
50. Jorgensen WK, Bock RE, de Vos AJ, Shiels IA. 1993; Sheep-adapted *Anaplasma marginale* maintains virulence for cattle. Aust. Vet. J., 70 (5): 192.
51. Rodríguez CDS, García OMA, Aboytes TR, Cantó AGJ, Barigye R. 2004: Inmunología e immuno-profilaxis de la anaplasmosis bovina. En: Moreno ChR. (Editor). Ciencia Veterinaria 9:123-164. 1ª edición UNAM, México, D.F.
52. Kuttler KL, Zaugg JL, Jonson LW. 1984; Serologic and clinical responses of premunized vaccinated and previously infected cattle to challenge exposure by two different *Anaplasma marginale* isolates. Am. J. Vet. Res. 45:2223-2226.
53. Ristic M, Carson AC. 1977; Methods of immunoprophylaxis against bovine anaplasmosis with emphasis on use of the attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. En: Immunity to blood parasites of animals and man. Miller HH, Pino JA, McKelvey JJ Editors. Ney York, New York USA, Plenum Publishing Corporation. pp. 151-188.
54. Comité de Enfermedades Parasitarias, 1995; Experiencias sobre el uso de vacunas contra *Anaplasma marginale* En: 4ª Reunión Anual del Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal. México, D.F.: 452-467.

55. Figueroa MJV, Cantó AGJ, Ramos AJA, Rojas REE, Santiago VC, Granjeno CG, García OMA, Parrodi F. 1999; Evaluación en condiciones de campo de la vacuna inactivada de *Anaplasma marginale* denominada "Plazvax". Vet. Méx. 30:221-225
56. Luther G. 2005; Anaplasmosis Vaccine. Louisiana State University, Department of Veterinary Science at Baton Rouge, Louisiana. Disponible en: <http://www.anaplasmosisvaccine.com/>. Consultado 24 de mayo, 2010.
57. Rodríguez CDS, García OMA, Hernández GS, Santos CNA, Aboytes TR, Cantó AGJ. 2000; *Anaplasma marginale* inactivated vaccine: dose titration against a homologous challenge. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 23:239-252.
58. Vizcaino O, Corrier DE, Terry MK, Carson CA, Lee AJ, Kuttler KL, Ristic M, Trevino GS. 1980; Comparison of three methods of immunization against bovine anaplasmosis: evaluation of protection afforded against field challenge exposure. Am. J. Vet. Res., 41(7):1066.
59. Palmer GH. 1989; Anaplasma vaccines. En: Veterinary and hemoparasite vaccines. Wright IG. (Ed.) CRC Press, Inc. Boca Raton, Fl. pp. 2-29.
60. Palmer GH, Barbet AF, Musoke AJ, Katende JM, Rurangirwa F, Shkap V, Pipano E, Davis WC, McGuire TC. 1988; Recognition of conserved surface protein epitopes on *Anaplasma marginale* isolates from Israel, Kenya and the United States. Int. J. Parasitol. 18:33.
61. De la Fuente J, Ruybal P, Mtshali MS, Naranjo V, Shuqing L, Mangold AJ, Rodríguez SD, Jiménez R, Vicente J, Moretta R, Torina A, Almazán C, Mbatia PM, Torioni de Echaide S, Farber M, Rosario-Cruz R, Gortazar Ch, Kocan KM, 2007; Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. Vet Microbiology 119: 382–390.
62. Kocan KM, Blouin EF, Barbet AF, 2000; Anaplasmosis control: past, present, and future. Ann. N Y Acad. Sci. (916):501-509.

63. Barigye R, García-Ortiz MA, Rojas Ramírez EE, Rodríguez Camarillo SD. 2004; Identificación de antígenos IgG2 específicos en tres cepas mexicanas de *Anaplasma marginale*. TecPecu Mex; 42(2):219-236.
64. Theiler A, 1911; Further investigations into anaplasmosis of South African cattle, 7-46. En: 1st Report of the Director of Veterinary Research, Department of Agriculture of the Union of South Africa. Citado por Kocan et al., 2003.
65. Lignieres J., 1925: Receptividad del carnero a la anaplasmosis y atenuación del parásito por pasajes sucesivos en este animal. Rev. Fac. Agron. Vet. Univ. Buenos Aires, Argentina 5:5, Citado por: REDLAB, 1992.
66. Maas J. 2005; Buying Bulls: Protecting Your Investment & Protecting Your Herd. UCD Vet Views California Cattlemen's Magazine Jul/Aug. Disponible en: http://www.vetmed.ucdavis.edu/vetext/INF-BE_cca/INF-BE_cca05/cca050708-BullDisPrv.pdf Consultado: 24 de mayo, 2010.
67. Rodríguez CSD, García OMA, Rojas REE, Cantó AGJ, Preciado de la TJF, Rosario CR, Ramos AJA, Aboytes TR, 2008; *Anaplasma marginale* Yucatan (Mexico) Strain Assessment of Low Virulence and Potential Use as a Live Vaccine. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1149:98–102
68. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. 2001; Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int J Syst Evol Microbiol. 51(6):2145-2165.
69. Eriks IS, Stiller D, Palmer GH. 1993; Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. J Clin Microbiol. 31(8):2091-2109.

70. Kieser ST, Eriks IS, Palmer GH. 1990; Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infect Immun.* 58(4):1117-1119.
71. Palmer GH, Bankhead T, Lukehart SA. 2009; 'Nothing is permanent but change'-antigenic variation in persistent bacterial pathogens. *Cell Microbiol.* 11(12):1697–1705.
72. Futse JE, Brayton KA, Dark MJ, Knowles DP Jr, Palmer GH. 2008; Superinfection as a driver of genomic diversification in antigenically variant pathogens. *Proc Natl Acad Sci.* 105(6):2123-2127.
73. Ooshiro M, Zakimi S, Matsukawa Y, Yafuso M, Katagiri Y, Inokuma H. 2009; *Anaplasma marginale* infection in a Japanese Black cow 13 years after eradication of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Okinawa, Japan. *Vet Parasitol.* 160(3-4):351-355.
74. Coetzee JF, Apley MD, Kocan KM. 2006; Comparison of the efficacy of enrofloxacin, imidocarb, and oxytetracycline for clearance of persistent *Anaplasma marginale* infections in cattle. *Vet Ther.* 7(4):347-360.
75. Barbet AF, Palmer GH, Myler PJ, McGuire TC. 1987; Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for polypeptide Am105L. *Infect Immun.* 55(10):2428-2435.
76. Allred DR, McGuire TC, Palmer GH, Leib SR, Harkins TM, McElwain TF, Barbet AF. 1990; Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 87(8):3220-3224.
77. Barbet AF, Allred DR. 1991; The msp1 beta multigene family of *Anaplasma marginale*: nucleotide sequence analysis of an expressed copy. *Infect Immun.* 59(3):971-976.
78. Viseshakul N, Kamper S, Bowie MV, Barbet AF. 2000; Sequence and expression analysis of a surface antigen gene family of the rickettsia *Anaplasma marginale*. *Gene.* 253(1):45-53.

79. McGarey DJ, Allred DR. 1994; Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. *Infect Immun.* 62(10):4587-4593.
80. McGarey DJ, Barbet AF, Palmer GH, McGuire TC, Allred DR. 1994; Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b. *Infect Immun.* 62(10):4594-4601.
81. De la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, McEwen BR, Clawson D, Kocan KM. 2001c; Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of *Anaplasma marginale*. *Int J Parasitol.* (14):1705-1714.
82. Palmer GH, Waghela SD, Barbet AF, Davis WC, McGuire TC. 1987; Characterization of a neutralization-sensitive epitope on the Am 105 surface protein of *Anaplasma marginale*. *Int J Parasitol.* 17(7):1279-1285.
83. Blouin EF, De la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Sauer JR, Saliki JT, Kocan KM. 2002; Applications of a cell culture system for studying the interaction of *Anaplasma marginale* with tick cells. *Anim. Health Res. Rev.* 3:57-68.
84. Brown WC, Palmer GH, Lewin HA, McGuire TC. 2001; CD4(+) T lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* major surface protein 1 (MSP1), a heteromeric complex of MSP1a and MSP1b, preferentially recognize the MSP1a carboxyl terminus that is conserved among strains. *Infect Immun.* 69(11):6853-6862.
85. De la Fuente J, Van Den Bussche RA, Prado TM, Kocan KM. 2003; *Anaplasma marginale* msp1alpha genotypes evolved under positive selection pressure but are not markers for geographic isolates. *J Clin Microbiol.* 41(4):1609-1616.
86. Eriks IS, Palmer GH, McGuire TC, Allred DR, Barbet AF. 1989; Detection and quantitation of *Anaplasma marginale* in carrier cattle by using a nucleic acid probe. *J Clin Microbiol.* 27(2):279-284.

87. French DM, Brown WC, Palmer GH. 1999; Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. *Infect Immun.* 67(11):5834-5840.
88. Barbet AF, Lundgren A, Yi J, Rurangirwa FR, Palmer GH. 2000; Antigenic variation of *Anaplasma marginale* by expression of MSP2 mosaics. *Infect Immun.* 68(11):6133-6138.
89. Palmer GH, Brayton KA. 2007; Gene conversion is a convergent strategy for pathogen antigenic variation. *Trends Parasit.* 23:408-413.
90. Rurangirwa FR, Stiller D, Palmer GH. 2000; Strain diversity in major surface protein 2 expression during tick transmission of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun.* 68(5):3023-3027.
91. Noh SM, Brayton KA, Knowles DP, Agnes JT, Dark MJ, Brown WC, Baszler TV, Palmer GH, 2006. Differential expression and sequence conservation of the *Anaplasma marginale* msp2 gene superfamily outer membrane proteins. *Infect. Immun.* 74, 3471–3479.
92. Brown WC, Shkap V, Zhu D, McGuire TC, Tuo W, McElwain TF, Palmer GH. 1998; CD4(+) T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infect Immun.* 66(11):5406-5413.
93. McGuire TC, Palmer GH, Goff WL, Jonsson MI, Davis WC. 1984;. Common and isolate-restricted antigens of *Anaplasma marginale* detected with monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 45,697–700.
94. Palmer GH, Barbet AF, Musoke AJ, Katende JM, Rurangirwa F, Shkap V, Pipano E, Davis WC, McGuire TC. 1988; Recognition of conserved surface protein epitopes on *Anaplasma marginale* isolates from Israel, Kenya and the United States. *Int. J. Parasitol.* 18:33.
95. Brayton KA, Palmer GH, Lundgren A, Yi J, Barbet AF. 2002; Antigenic variation of *Anaplasma marginale* msp2 occurs by combinatorial gene conversion. *Mol Microbiol.* 43(5):1151-1159.

96. Alleman AR, Barbet AF. 1996. Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen. J Clin Microbiol.; 34(2):270-76.
97. Bao W, Kumagai Y, Niu H, Yamaguchi M, Miura K, Rikihisa Y. 2009. Four VirB6 paralogs and VirB9 are expressed and interact in *Ehrlichia chaffeensis*-containing vacuoles. J. Bacteriol. 191: 278-286.
98. Lopez JE, Palmer GH, Brayton KA, Dark MJ, Leach SE, Brown WC. 2007; Immunogenicity of *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins in a protective outer membrane vaccine. Infect. Immun. 75:2333-2342.

¿ADÓNDE ACUDIR?:

Unidad de Anaplasmosis Bovina, CENID Parasitología Veterinaria / INIFAP

Carretera Federal Cuernavaca – Cuautla No. 8534, Col. Progreso, CP 62550, Jiutepec, Morelos. MÉXICO

Tel. +52 (777) 319-2848 ext. 116

Fax +52 (777) 319-2848 ext. 129

Agradecimientos:

La información generada para la elaboración de este folleto se obtuvo al través de los siguientes financiamientos:

- Proyecto SEP-CONACyT P 62525: “Clasificación de aislados de la rickettsia *Anaplasma marginale* mediante el uso de marcadores moleculares, para fundamentar programas de control y desarrollo de vacunas mexicanas”
- Macroproyecto UNAM: “Productividad sostenible de los hatos de cría en pastoreo - Línea: Enfermedades Parasitarias” Proyecto 7.1.7 Valoración de una cepa atenuada de *Anaplasma marginale* para la inmunización de bovinos nativos, PCR- y ELISA-negativos, bajo condiciones de campo.
- INIFAP: Fondos concurrentes.

Grupo Garlong Impresores, S.A. de C.V.
Plaza del Árbol #7
Col Doctor Ortiz Tirado
Deleg. Iztapalapa
C.P 09020, México DF.

Esta publicación se imprimió en Diciembre de 2010
Numero de ejemplares, 500
Jiutepec, Morelos