



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

**Análisis de transmisibilidad y diversidad de
especies de hemoparásitos en bovinos y
garrapatas Ixodidae de la región del NEA**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área: CIENCIAS BIOLÓGICAS

Lic. Sofía de la Fournière

Directora de tesis: Dra. Marisa D. Farber

Consejero de estudios: Dr. Ricardo Gürtler

Lugar de trabajo: Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar

Buenos Aires, 2018

Fecha de defensa: 15 de marzo de 2018

RESUMEN

“Análisis de transmisibilidad y diversidad de especies de hemoparásitos en bovinos y garrapatas Ixodidae de la región del NEA”

Las garrapatas son consideradas como uno de los vectores más importantes en cuanto a la transmisión de enfermedades al hombre en todo el mundo, además de ser los principales vectores implicados en la transmisión de patógenos a los animales domésticos y de vida silvestre. En particular, las infecciones por hemoparásitos transmitidos por vectores son un problema importante que afecta a las industrias ganaderas en todo el mundo, generando importantes pérdidas económicas. En América del Sur, la garrapata del ganado, *Rhipicephalus microplus*, transmite dos enfermedades de relevancia en la actividad ganadera: la babesiosis, ocasionada por los protozoarios *Babesia bovis* y la anaplasmosis, ocasionada por la rickettsia *Anaplasma marginale*. En conjunto, estas dos enfermedades constituyen el complejo que se conoce comúnmente como Tristeza bovina.

En este trabajo, se realizó un relevamiento epidemiológico de la presencia de los hemoparásitos mencionados en bovinos y garrapatas de distintos establecimientos del noreste argentino. Se hallaron diferencias en las prevalencias según los establecimientos realizaban control del vector o no. En el relevamiento de hemoparásitos realizado en garrapatas, se halló la presencia de tripanosomas de distintas especies. Se logró amplificar por PCR y secuenciar por primera vez en el país tripanosomas aislados de hemolinfa de *R. microplus*.

Se reportó la existencia de transmisión vertical de *A. marginale* en el vector *R. microplus*, a partir del hallazgo de ADN de la bacteria en larvas obtenidas de teleoginas naturalmente infectadas, siendo la primera demostración experimental del ciclo completo de la bacteria en la garrapata. A su vez, se utilizaron estas larvas infectadas para infestar un bovino sano, esplenectomizado (susceptible), en el que se logró reproducir la infección. Mediante la amplificación del gen marcador de genotipo *mSP1a*, se lograron identificar los genotipos de *A. marginale* involucrados en el proceso de infección.

PALABRAS CLAVE: BABESIOSIS, ANAPLASMOSIS, *TRYPANOSOMA SPP.*, *RHIPICEPHALUS MICROPLUS*.

SUMMARY

"Analysis of transmissibility and diversity of hemoparasitic species in bovines and Ixodidae ticks of the NEA region"

Ticks are considered to be one of the most important vectors in the transmission of diseases to humans throughout the world, as well as being the main vectors involved in the transmission of pathogens to domestic and wildlife animals. In particular, infections by vector-borne hemoparasites are a major problem affecting the livestock industries throughout the world, generating significant economic losses. In South America, the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, transmits two diseases of relevance to livestock activity: babesiosis, caused by the protozoa *Babesia bovis* and anaplasmosis, caused by the rickettsia *Anaplasma marginale*. Together, these two diseases constitute the complex commonly known as Tristeza Bovina.

In this work, an epidemiological survey of the presence of the hemoparasites mentioned in bovines and ticks from different establishments in northeastern Argentina was carried out. Differences were found in the prevalences according to the establishments carried out control of the vector or not. In the hemoparasite survey performed on ticks, the presence of trypanosomes of different species was found. It was possible to amplify by PCR and to sequence for the first time in the country trypanosomes isolated from hemolymph of *R. microplus*.

The existence of vertical transmission of *A. marginale* in the vector *R. microplus* was reported, as from the DNA finding of the bacterium in larvae obtained from naturally infected engorged females, being the first experimental demonstration of the complete cycle of the bacterium in the tick. Also, these infected larvae were used to infest a healthy, splenectomized bovine, in which the infection was reproduced. By amplifying a genetic marker gene *msp1a*, the genotypes of *A. marginale* involved in the infection process were identified.

KEY WORDS: BABESIOSIS, ANAPLASMOSIS, *TRYPANOSOMA SPP.*, *RHIPICEPHALUS MICROPLUS*.

Agradecimientos

Agradezco haber tenido el privilegio de formarme en una universidad pública, gratuita y de excelencia, la Universidad de Buenos Aires.

Gracias a mis profesores, jefes de TP y ayudantes de la FCEN y al personal administrativo por la paciencia.

No habría podido desarrollar y concluir este trabajo sin el beneficio de las tres becas que recibí del FONCYT y CONICET.

Gracias

al INTA, mi lugar de trabajo y de pertenencia estos años.

A Marisa, mi directora, gracias por el espacio y la confianza en mí. Creo que hemos recorrido un largo camino.

A Silvina, gracias por estar siempre, por los consejos en todo momento.

A Néstor Sarmiento, gracias por recibirme siempre, por el trabajo en conjunto, por las idas y venidas y los cientos de kilómetros en un día.

A Celeste Sosa, por su ayuda fundamental en todo el trabajo de campo, su amistad y su hospitalidad en todas mis estadías en Mercedes.

A mis hemo amigos,

a Lu: largo camino amiga! Y todavía sigue! Quien hubiera pensado que te iba a seguir hasta acá! Que alegría que la vida y la ciencia nos sigan uniendo. Te quiero, gracias!

A Marti, mi guía desde el día cero. Que hubiera sido de mi sin vos Marti! Cuantas horas de trabajo, vacaciones y de campo compartidas! Cuantas cosas me enseñaste con tanta paciencia y generosidad!

A Pepo, que tuvo la mala idea de chusmear esta dedicatoria antes de tiempo y sin mi autorización. Gracias por todo, no hubiera sido lo mismo sin vos. Gracias a Freddy, Lucy, al señor de la terminal, al muchacho de las mixivas, al locutor de radio Morónd y al trapito durazno amigo de la Yesi.

A Chris, siempre presente a la distancia

a Vale por sumarse con más locura a la locura

a Maga, por estar en los momentos finales y bancar a este grupo de locos.

Y a Eli, no sé cómo expresar lo agradecida que estoy con vos, lo fundamental que fuiste en todo este proceso. Me guiaste siempre con responsabilidad, humildad y amor, no podría pedir más. Y esto recién comienza!

Los quiero, no podría haber elegido un lugar más lindo para trabajar.

A Graciela Garbossa, gracias por su apoyo inicial, su presencia a la distancia. Gracias por darme el espacio desde donde todo comenzó.

A Marcos Trangoni, por recibirme en su "cabinita de peaje" y ayudarme con los datos y planillas.

A Nati Pin Viso, por su gran ayuda con los datos meteorológicos y su buena onda siempre.

A todos los integrantes del Instituto de Biotecnología, en especial a aquellos que más frecuentemente nos visitan, a Flor, Emi, Rubén. A Yami Eirin, gracias por los turnos de PCR. Gracias a las chicas del lavadero por su trabajo de apoyo.

A mis amigos de la vida, Nacha, Marion, Clara, Gaby. Con su compañía y amistad fueron parte de mis días.

A Pili, Ana, Caro y Luli, bioloamigas por siempre.

A Salva, bienvenido a bordo. La ruta es nuestra.

En especial agradezco la compañía y el apoyo de mi familia,

Mis tías Annie y Jacqueline por estar atentas siempre por mis cosas, a mis tíos, primos, a todos, son lo más!

A mis lindas hermanas, Vero, Soli y Eli, las amo; a mis cuñados el fenómeno-Nico y Dani, mi soporte informático 24hs,

A mis sobrinos Sebi, Inés Y Santi: la vida es más hermosa desde que llegaron

A mis padres, los amo, no sé cómo agradecerles todo lo que me brindan. Gracias a ustedes soy quien soy y seré siempre.

A Dios, soy una eterna agradecida y me siento bendecida por eso.

INDICE

Introducción general	10
1. La garrapata del bovino, <i>Rhipicephalus microplus</i>	11
1.2. Ciclo de vida de <i>R. microplus</i>	12
2. Babesiosis Bovina	15
2.1. Ciclo biológico de <i>Babesia spp.</i>	18
2.1.1. <i>Babesia bovis</i>	20
2.1.2. <i>Babesia bigemina</i>	22
3. Anaplasmosis bovina	22
3.1. Ciclo biológico de <i>A. marginale</i>	24
Hipótesis	28
Objetivos generales	28
Objetivos específicos	28
Capítulo 1: Epidemiología de Babesiosis y Anaplasmosis en el NEA	29
1. Introducción	30
1.1. Epidemiología de la Babesiosis y la Anaplasmosis bovina en Argentina ...	30
1.2. Concepto de estabilidad enzoótica	32
1.3. Vacunas disponibles	32
1.4. Diagnóstico	33
1.4.1 Diagnóstico directo	33
1.4.1.1. Diagnóstico directo de <i>B. bovis</i> y <i>B. bigemina</i>	34
1.4.1.2. Diagnóstico directo de <i>A. marginale</i>	34
1.4.2. Diagnóstico indirecto	35
1.4.2.1. Diagnostico indirecto de <i>B. bovis</i> y <i>B. bigemina</i>	35
1.4.2.2. Diagnóstico indirecto de <i>A. marginale</i>	35
2. Materiales y métodos	36
2.1. Área de muestreo	36
2.2. Obtención de muestras	40
2.2.1. Sangre y suero	40
2.3. Extracción de ADN a partir de sangre entera	40
2.4. Diagnóstico molecular por PCR	40
2.5. Evaluación de los sueros mediante la técnica de ELISA	42
2.6. Análisis estadístico de los resultados	42
3. Resultados y discusión	43
3.1. Diagnóstico molecular	43
3.2. Frecuencias de hemoparásitos por provincias	43

3.3. Prevalencias de hemoparásitos por provincias	44
3.4. Prevalencias de infecciones simples o por más de un parásito	47
3.5. Prevalencias según el tipo de infección por establecimientos	49
3.5.1. Provincia de Corrientes	50
3.5.2. Provincia de Misiones	51
3.5.3. Provincia de Formosa	52
3.6. Prevalencias del tipo de infección por provincias	54
3.7. Diagnóstico serológico	55
3.8. Prevalencias por diagnóstico serológico	55
3.9. Prevalencias de animales positivos con anticuerpos contra uno o más parásitos	58
3.10. Prevalencias de bovinos con anticuerpos contra los hemoparásitos según los tipos de infección, por establecimientos	60
3.10.1. Provincia de Corrientes	60
3.10.2. Provincia de Misiones	61
3.10.3. Provincia de Formosa	62
3.11. Análisis de las prevalencias en relación a datos meteorológicos	63
Capítulo 2: Transmisibilidad de <i>A. marginale</i>	68
1. Introducción	69
2. Materiales y métodos	74
2.1. Obtención de muestras	74
2.1.1. Sangre y suero bovinos	74
2.1.2. Garrapatas	74
2.1.3. Hemolinfa de <i>R. microplus</i>	74
2.1.3.1. Tinción diferencial	75
2.1.4. Larvas de <i>R. microplus</i>	75
2.1.5. Órganos de <i>R. microplus</i>	76
2.2. Extracción de ADN	76
2.2.1. A partir de sangre entera utilizando kit de extracción	76
2.2.2. A partir de sangre entera por el método Fenol-cloroformo	76
2.2.3. A partir de teleoginas de <i>R. microplus</i>	77
2.2.4. A partir de larvas de <i>R. microplus</i>	78
2.2.5. A partir de órganos de <i>R. microplus</i>	78
2.3. Diagnóstico por PCR en sangre bovina, teleoginas y larvas	78
2.3.1. Diagnóstico de <i>B. bovis</i> y <i>B. bigemina</i>	78
2.3.2. Diagnóstico de <i>A. marginale</i>	78

2.3.2.1. Por amplificación del gen <i>msp1b</i>	78
2.3.2.2. Por amplificación del gen <i>msp5</i>	79
2.4. Infestación de bovino susceptible	80
2.5. Caracterización molecular de las cepas de <i>A. marginale</i> en todas las instancias del ensayo de transmisibilidad	85
2.5.1. PCR para genotipificación de <i>A. marginale</i>	85
2.5.2. Purificación de los productos de PCR	86
2.5.3. Clonado de fragmentos génicos	86
2.5.4. Transformación de bacterias <i>Escherichia coli</i> competentes	87
2.5.5. Purificación de ADN plasmídico y análisis por restricción	88
2.5.6. Secuenciación y análisis de las secuencias	88
3. Resultados	90
3.1. Detección de hemoparásitos en bovinos	90
3.2. Detección de <i>A. marginale</i> por PCR en larvas de <i>R. microplus</i>	90
3.3. Observación microscópica de hemolinfa de <i>R. microplus</i>	90
3.4. Detección de <i>A. marginale</i> por PCR en teleoginas de <i>R. microplus</i>	90
3.5. Detección de <i>A. marginale</i> en el bovino infestado	91
3.5.1. Genotipos de <i>A. marginale</i> en los distintos estadios involucrados en el proceso de infección	93
3.6. Detección de <i>A. marginale</i> en hemolinfa de <i>R. microplus</i>	95
3.7. Detección de <i>A. marginale</i> en órganos de <i>R. microplus</i>	96
4. Discusión	97
Capítulo 3: <i>Trypanosoma spp.</i> en garrapatas <i>R. microplus</i> de la región del NEA	101
1. Introducción	102
1.1. Tripanosomas bovinos	102
2. Materiales y métodos	105
2.1. Obtención de muestras	105
2.1.1. Sangre bovina y garrapatas	105
2.1.2. Hemolinfa	105
2.1.2.1. Tinción diferencial	105
2.2. Extracción de ADN a partir de extendidos de hemolinfa previamente teñidos	105
2.3. Extracción de ADN genómico a partir de garrapatas	106
2.4. Diagnóstico de <i>Trypanosoma spp.</i> por hibridación reversa en línea	106

2.5. Diagnóstico de tripanosomas por PCR semianidada seguida de secuenciación	107
2.5.1. Secuenciación de los productos de PCR	109
2.5.2. Análisis de secuencias	109
3. Resultados	110
3.1. <i>Trypanosoma spp.</i> en extendidos de hemolinfa	110
3.2. Detección de tripanosomas por RLBH	113
3.3. Detección de tripanosomas por PCR seguida de secuenciación	114
3.3.1. Detección de tripanosomas en teleoginas de <i>R. microplus</i>	114
3.3.2. Detección de tripanosomas en hemolinfa de <i>R. microplus</i>	115
3.3.3. Detección de tripanosomas a partir de un extendido de hemolinfa de <i>R. microplus</i>	115
3.3.4. Detección de <i>T. theileri</i> en un bovino de zona endémica	116
4. Discusión	118
5. Conclusiones finales	120
Anexo I	122
Anexo II	123
Referencias bibliográficas	128

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las garrapatas son consideradas como los principales vectores implicados en la transmisión de patógenos a los animales domésticos y de vida silvestre (de la Fuente et al., 2008). El conjunto de enfermedades que éstas pueden transmitir son conocidas mundialmente con el término *Tick-Borne Diseases* (TBDs) e incluyen agentes tanto virales como protozoarios y bacterianos. A pesar de ser responsables de pérdidas económicas significativas a nivel mundial (Kivaria, 2006; Minjauw and McLeod, 2003), en muchos casos y principalmente en los países en vías de desarrollo la importancia de estas enfermedades no se halla bien establecida (Ybañez et al., 2017).

En particular, las infecciones por hemoparásitos transmitidos por garrapatas son un problema importante que afecta a las industrias ganaderas en todo el mundo, especialmente en las regiones tropicales y subtropicales. En América del Sur, se presentan dos enfermedades de relevancia en la actividad ganadera, la babesiosis y la anaplasmosis; ambas enfermedades en conjunto constituyen el complejo que se conoce comúnmente como Tristeza bovina (Luciani, 2003), el cual se presenta asociado a un cuadro de decaimiento general y anemia que son responsables del nombre con el que se refiere este síndrome.

Las pérdidas económicas asociadas a estas enfermedades están vinculadas a las tasas de mortalidad, pérdida de peso, abortos en hembras infectadas, costos de los tratamientos y profilaxis y pérdidas en la producción lechera debido a que los animales enfermos tienen una menor tasa de conversión alimenticia y niveles productivos más bajos.

1. La garrapata del bovino, *Rhipicephalus microplus*

En particular, en nuestro país, la especie *Rhipicephalus microplus* es la garrapata que infesta a los bovinos al norte de paralelo 30°S. Esta garrapata pertenece a la familia Ixodidae (garrapatas duras); anteriormente se la conocía como *Boophilus microplus* pero en el año *Boophilus* se ha convertido en un subgénero del género *Rhipicephalus* (Horak et al., 2002). *R. microplus* ocupa el primer lugar entre las ectoparasitosis del bovino, generando pérdidas económicas por 38,9 millones de dólares anuales según fue estimado en el año 1994 (Späth et al., 1994).

Según Nuñez y colaboradores (Nuñez et al., 1982) la acción perjudicial de *R. microplus* se puede evaluar desde distintos aspectos, como por ejemplo la acción debilitante que ejerce sobre el hospedero, la transmisión de enfermedades y las pérdidas económicas que sufre la industria curtidora. El primer aspecto está directamente relacionado con la cantidad de ectoparásitos, que cuando se encuentran en infestaciones importantes

pueden causar bajas considerables en un rodeo. Por ejemplo, una teleogina (hembra adulta completamente ingurgitada) puede llegar a succionar hasta 3 ml de sangre durante su ciclo parasitario. Esto puede derivar en pérdidas de hasta 50 kg de peso por año por cabeza, sumado a que las razas utilizadas para el mejoramiento zootécnico son las más susceptibles a las garrapatas. Respecto a la transmisión de enfermedades, los patógenos transmitidos por garrapatas provocan grandes pérdidas en los rodeos afectados, ya sea por mortalidad o por los gastos necesarios para su control.

Por último, los daños que produce la picadura de garrapata en los cueros no son menores (además es frecuente que involucren infecciones secundarias).

1.2. Ciclo de vida de *R. microplus*

Respecto a su ecología, *R. microplus* se caracteriza por ser una garrapata de un solo hospedero; esto se denomina ciclo monoxénico e implica que todos los estadios de vida parasitaria transcurren sobre un mismo bovino, sin traspaso de artrópodos de un animal a otro. Sin embargo, los machos adultos de *R. microplus* pueden alimentarse de varios bovinos que se encuentren en estrecha proximidad (Callow et al., 1979).

Los estadios principales de la garrapata comprenden huevos, larvas hexápodos, ninfas octópodos y adultos octópodos; a su vez, el ciclo de vida posee fases de vida libre y de vida parasitaria (Figura 1). El ciclo de vida libre comienza cuando la teleogina madura (Figura 1E) se desprende del hospedero y cae al suelo. A partir de este evento, se producirá el desove de 2000 a 3000 huevos (que culminará con la muerte de la teleogina), la incubación de los mismos, la eclosión y la vida larvaria libre. La duración de este período es variable, y está estrechamente relacionada con las condiciones ambientales tales como temperatura, humedad y luz entre otros. La fase de vida parasitaria ocurre sobre el hospedero y presenta una duración de aproximadamente 21 días (Núñez et al., 1982). La misma comienza cuando la larva, que se encuentra en el ápice de los pastos a la espera del paso de un hospedero (Figura 1A), logra subir al bovino.

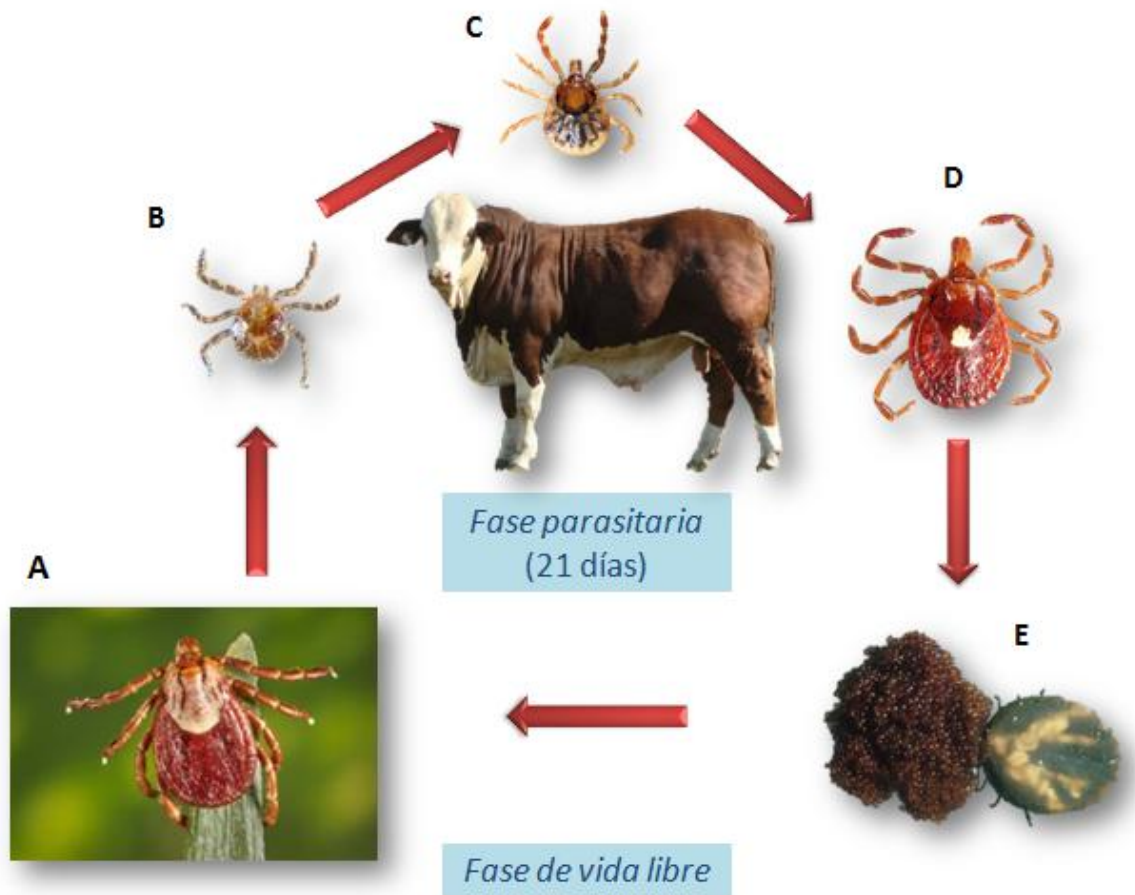


Figura 1. Principales estadios evolutivos de *R. microplus*. Los estadios infectivos para el bovino son las larvas eclosionadas en el ambiente (A, B), las ninfas (C) y los adultos (D). Luego las hembras ingurgitadas o teleoginas (E) caen al pasto para desovar.

En líneas generales, esta fase parasitaria puede dividirse en una etapa larval (Figura 1B), una ninfal (Figura 1C) y una adulta (Figura 1D).

En la primera etapa, una vez que la larva está sobre el hospedero camina buscando un lugar para fijarse, se fija y comienza a alimentarse. Cuando la larva muda (alrededor del día 5 post fijación), emerge la ninfa (Figura 1C). Esta, casi no se traslada y se fija nuevamente para alimentarse. Por último, la etapa adulta comienza con la emergencia del adulto a partir de la muda ninfal (Figura 1D); los machos se movilizan para fecundar a las hembras que se encuentran fijadas al hospedero, las cuales se alimentarán hasta quedar completamente ingurgitadas. En este estado, se desprenden del bovino para desovar en las pasturas (Figura 1E), finalizando la fase parasitaria.

En cuanto a las estrategias de control, se postula que el método más eficaz es aquel que logre evitar que los ejemplares de *R. microplus* albergados en el hospedero alcancen el estadio de teleogina, previniendo la eclosión de larvas (Núñez et al., 1982). Estos métodos involucran productos químicos que difieren entre otras cosas en su modo de utilización; un método muy utilizado debido a su alta eficiencia es el baño de inmersión, en el cual el bovino infestado se sumerge en una solución acaricida logrando el contacto directo del compuesto con todos los estadios presentes en el hospedero. También se aplican soluciones acaricidas en forma de aspersión fija o manual, derrame (pour-on) y en forma inyectable los acaricidas sistémicos.

Los productos utilizados pueden dividirse en distintos grupos según la naturaleza química a la cual pertenecen: arsenicales, organoclorados, diclorodifeniltricloroetano (DDT), hexacloruro de benceno (BHC), organofosforados, carbamatos, piretroides sintéticos, y nuevas drogas acaricidas entre otros. Todos ellos difieren en su toxicidad a los mamíferos, modo de acción y poder residual.

Últimamente, el amplio uso de estos acaricidas químicos para el control de las garrapatas ha llevado al aumento de la fármaco resistencia para arsenicales, piretroides, órganos fosforados y amidinas (Cutullé et al., 2013; Grillo Torrado and Pérez Arrieta, 1977; Guglielmone et al., 2006; Mangold et al., 2004).

En Argentina, *R. microplus* actúa como vector para la transmisión de los agentes causales de la babesiosis y la anaplasmosis: los parásitos protozoarios *Babesia bovis* y *B. bigemina*, y la bacteria *Anaplasma marginale*.

2. Babesiosis Bovina

La Babesiosis es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios del género *Babesia*, que afecta a un amplio rango de animales domésticos y silvestres (Bock et al., 2004) y está distribuida en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. Estos organismos fueron reportados por primera vez en 1888 por Viktor Babes en Rumania, quien detectó la presencia de cuerpos redondeados intra eritrocíticos en sangre de ganado infectado. El género *Babesia* pertenece al phylum *Apicomplexa*, clase *Sporozoasida*, orden *Eucoccidiorida*, suborden *Piroplasmorina* y familia *Babesidae*.

En la figura 2 se muestra un árbol filogenético construido por el método de máxima verosimilitud utilizando el concatenado de las secuencias aminoacídicas de los genes COX1 y COB para organismos del género *Babesia* y su relación filogenética con otros microorganismos de importancia médica del phylum *Apicomplexa* (Hikosaka et al., 2012). Se observa la relación monofilética entre el grupo de las babesias, las theilerias y archeopiroplasmidos, separados del clado de las especies del género *Plasmodium*.

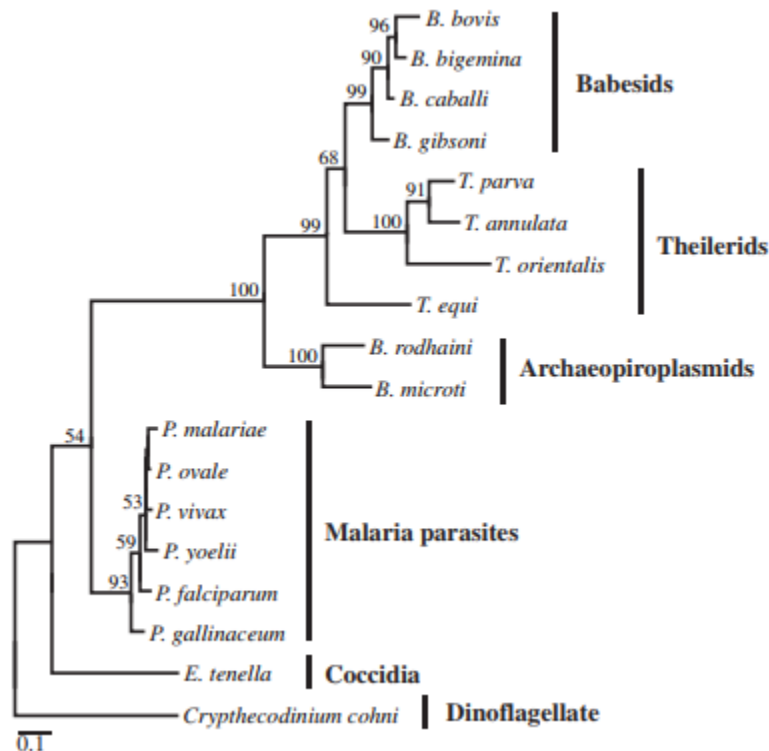


Figura 2: Árbol filogenético construido por el método de máxima verosimilitud a partir de las secuencias aminoacídicas concatenadas de los genes mitocondriales *cox1* y *cob*, de 17 organismos apicomplejos. Se utilizó al dinoflagelado *Crypthocodium cohnii* como outgroup.

Como todos los organismos del phylum *Apicomplexa*, las babesias se caracterizan por ser exclusivamente endoparásitos y poseer un complejo apical en la región anterior (Figura 3), adaptación que permite la entrada en la célula hospedera, en este caso los eritrocitos. Este complejo apical, posee diferentes organelas con diversas funciones que en conjunto participan activamente del proceso de invasión del eritrocito: el conoide es un conjunto de microtúbulos dispuestos en espiral con acción perforadora, las roptrias tienen función secretora y las micronemas son vesículas secretoras que se encuentran rodeadas por uno o dos anillos polares (formados por microtúbulos). Además del complejo apical, existen unos orgánulos esféricos secretores situados alrededor de la célula (denominados gránulos densos), que actúan después de la penetración en la célula hospedera.

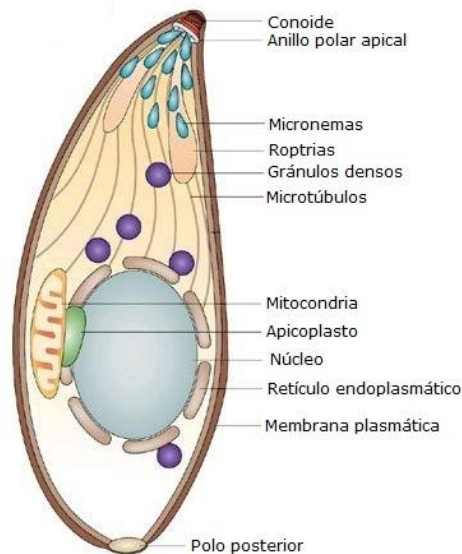


Figura 3. Esquema generalizado de un organismo apicomplejo. Se detallan organelas y estructuras que conforman el complejo apical (Copyright © 2006 Nature Publishing Group – Nature Reviews – Microbiology)

En el ganado bovino las dos especies más importantes responsables de generar babesiosis son *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* (Bock et al., 2004). Estos protozoarios son transmitidos al hospedador vertebrado por medio de la garrapata *R. microplus* en la cual cumplen parte de su ciclo de vida. En el hospedero vertebrado, *Babesia spp.* parasita exclusivamente los glóbulos rojos y es posible identificar a *B. bovis* y *B. bigemina* en el interior de los mismos por observación al microscopio óptico de extendidos de sangre periférica bovina utilizando la coloración de May Grünwald-Giemsa (Figura 4).

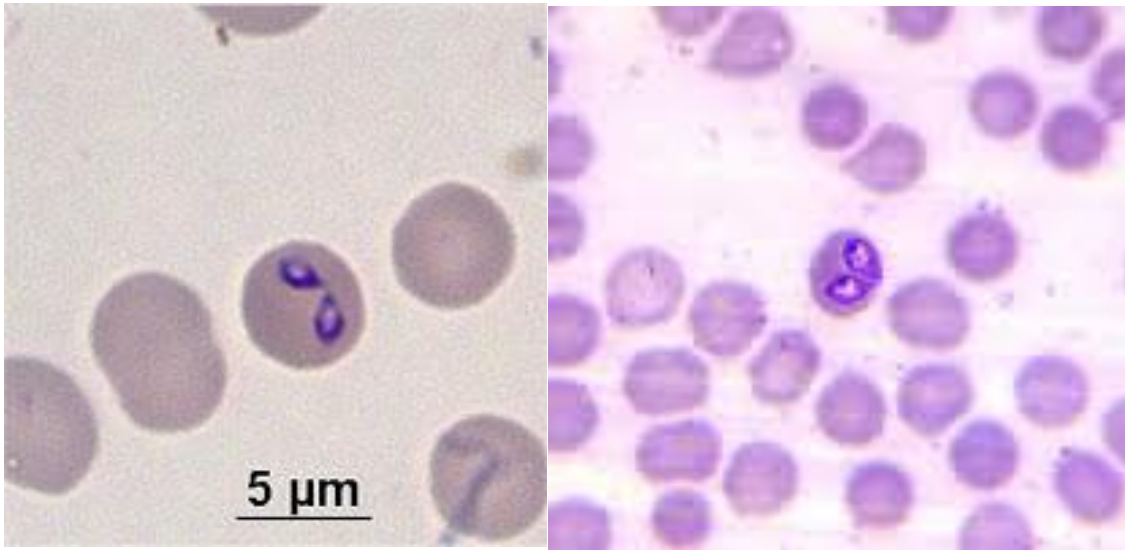


Figura 4. Glóbulos rojos infectados con *B. bovis* (izquierda) y con *B. bigemina* (derecha).

En la figura 5, se observan esquematizados distintos estadios del parásito en el interior de los eritrocitos infectados: las formas simples ovaladas (merozoítos), la forma de anillo (trofozoíto) y las formas pares (merozoítos luego de la división celular). En el caso de *B. bovis*, estos cuerpos ovalados miden alrededor de $2 \times 1,5 \mu\text{m}$, mientras que los de *B. bigemina* miden $4,5 \times 2 \mu\text{m}$.

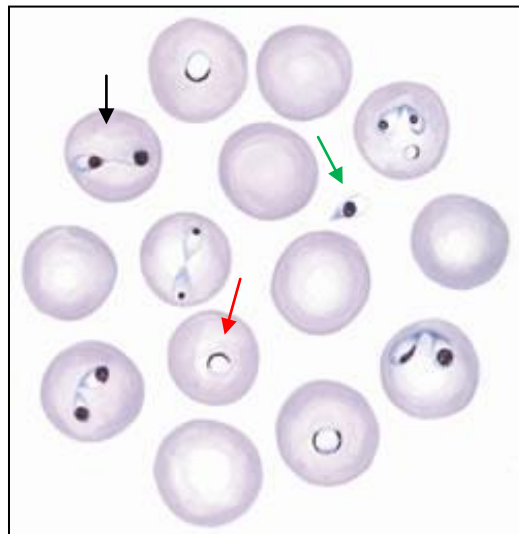


Figura 5. Representación de los distintos estadios de *Babesia sp* en el hospedador bovino. Se observan merozoítos libres (flecha verde), trofozoítos (flecha roja) y formas pares (flecha negra). (Imagen cortesía de State of Queensland, Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. <http://www.merckvetmanual.com/circulatory-system/blood-parasites/babesiosis>).

2.1. Ciclo biológico de *Babesia* spp.

Cuando la garrapata *R. microplus* se alimenta de un bovino infectado, inocula esporozoítos que invaden al eritrocito bovino mediante proteínas de superficie y proteínas secretadas por el complejo apical (Bock et al., 2004). Dentro del citoplasma, el parásito escapa rápidamente de la vacuola fagocítica y se diferencia a trofozoíto (Figura 6A, 6B, 6C). Esta estructura toma una forma de anillo y luego se divide por fisión binaria generando dos merozoítos (Figura 6D). Los merozoítos coexisten dentro del eritrocito, y pueden ocupar una gran parte de la célula (*B. bigemina*) o una porción menor (*B. bovis*). Al alcanzar la madurez, los merozoítos se separan y lisan la célula alcanzando el espacio extracelular (Figura 6E, 6F). Allí algunos invadirán otras células repitiendo el ciclo asexual, mientras que otros serán captados durante el proceso de alimentación de una garrapata y continuarán el ciclo sexual en el hospedador invertebrado. Los estadios sexuales se liberan de los eritrocitos en el lumen del intestino de la garrapata (Figura 6G) y se diferencian en gametocitos, que a su vez van a dar lugar a gametas femeninas y masculinas que se fusionarán formando un cigoto (Figura 6H). Este cigoto se convierte en un estadio infectivo y penetra las células intestinales del artrópodo (Figura 6I), donde se formarán cuerpos de fisión que se desarrollarán en kinetos móviles (Figura 6J). Los kinetos destruyen las células intestinales, escapan a la hemolinfa e invaden diferentes tejidos y tipos celulares, incluyendo los ovarios, donde infectan a los embriones (transmisión transovárica) (Bock et al., 2004) (Figura 6K, 6L, 6M). Las larvas infectadas emergen de los huevos, se adhieren a un bovino y los kinetos migran a las glándulas salivales de la garrapata, donde forman un esporoblasto (Figura 6N). De cada esporoblasto emergen miles de esporozoítos que se liberan al sistema circulatorio del bovino a través de la saliva (Figura 6O).

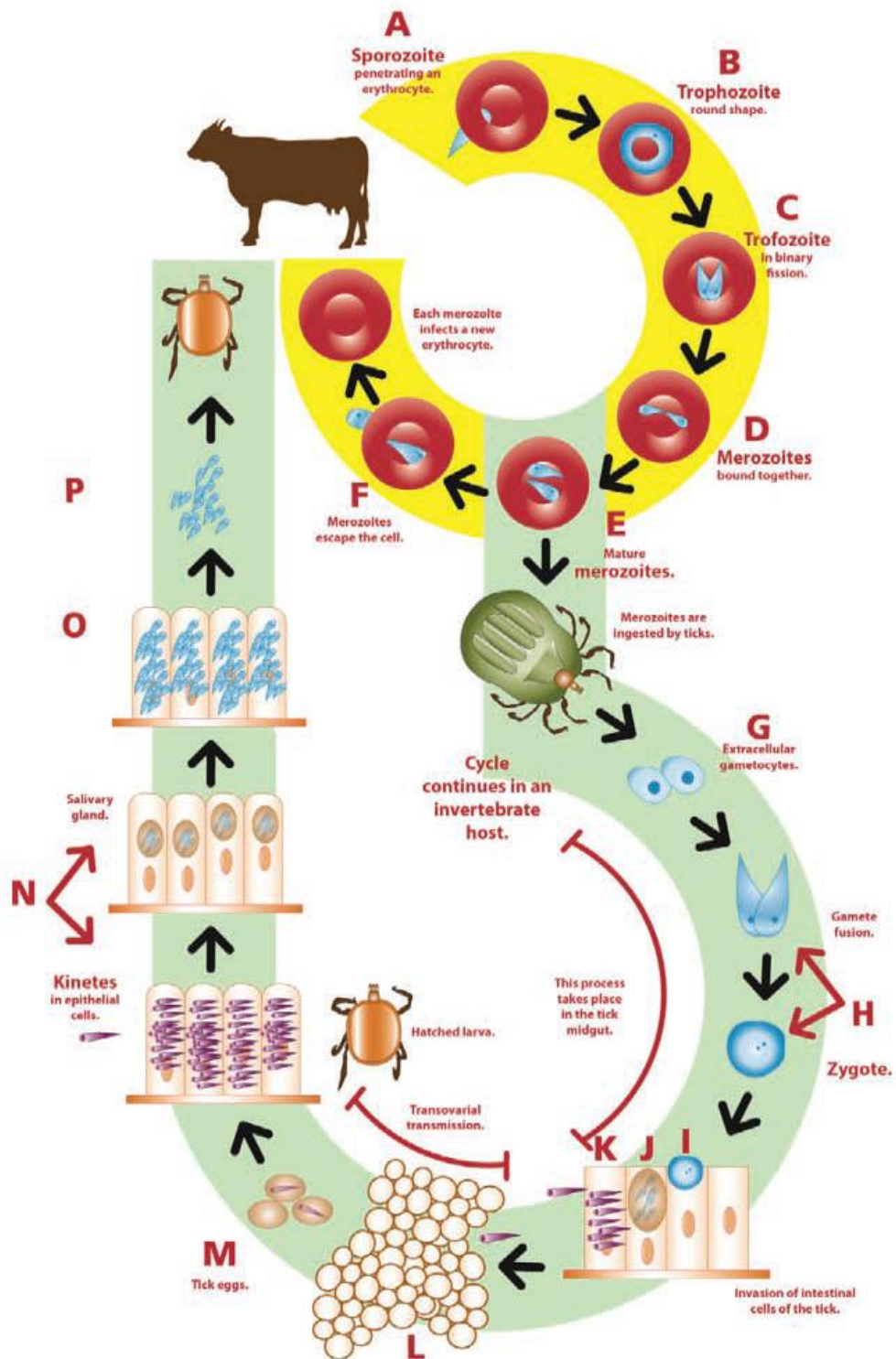


Figura. 6. Ciclo biológico de *Babesia* spp. en el hospedero bovino y en el vector garrapata (Mosqueda et al., 2012).

Si bien la enfermedad producida por ambos hemoparásitos en el bovino presenta varios aspectos en común, existen ciertas particularidades de cada uno de los dos agentes que dan lugar a cuadros clínicos y aspectos de la patogenia específicos.

2.1.1. *Babesia bovis*

La alteración de la estructura y funcionalidad de los eritrocitos por parte del parásito parecería ser crítico para la supervivencia de *B. bovis* en el hospedero y a su vez explicaría la patogénesis producida por este agente.

Los eritrocitos bovinos infectados con *B. bovis* resultan ser más rígidos que los eritrocitos normales. Esta alteración es debida en parte a la presencia de una inclusión intracelular anormal no deformable (el parásito) que reduce la deformabilidad general de la célula, pero también responde a una mayor rigidez de la estructura de la membrana eritrocitaria causada por una modificación de los componentes del citoesqueleto por proteínas derivadas del parásito. El mecanismo preciso por el cual *B. bovis* deposita estas proteínas en la membrana celular no se ha esclarecido aún. Parecería que algunas proteínas pueden ser directamente "inyectadas" durante el proceso de invasión y otras son sintetizadas y secretadas al citoplasma celular una vez infectado el eritrocito. Inmediatamente después de la invasión celular, y producto de las alteraciones descritas, la membrana de los glóbulos rojos infectados aparece tachonada con proyecciones similares a crestas (Figura 7). Esta modificación altera la capacidad de deformación de los glóbulos rojos que les permite adaptarse rápidamente a las secciones vasculares más estrechas (capilares sanguíneos). En consecuencia, se produce un tránsito capilar más lento que predispone al secuestro de células rojas infectadas en la microvasculatura, generando lesiones importantes en los pulmones y el cerebro (babesiosis cerebral). Por otra parte, este secuestro evita la destrucción de parásitos por parte de las células fagocíticas del bazo, el cual cumple un rol crítico en la inmunidad contra *B. bovis* (Gohil et al., 2010) ya que allí ocurre la hemólisis celular de los eritrocitos infectados.

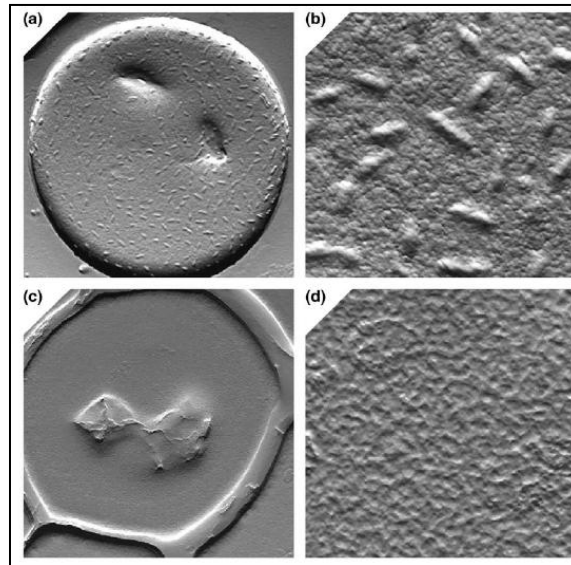


Figura 7. Imagen por microscopía electrónica de la superficie de eritrocitos bovinos. (a) Eritrocitos infectados con *B. bovis* en los que se observa la presencia de rugosidades de la membrana. (b) mayor aumento de la imagen (a). (c) Eritrocitos infectados con *B. bigemina*. (d) mayor aumento de la imagen (c) (Gohil et al., 2010).

Estas rugosidades favorecen la acumulación de eritrocitos infectados en la microvasculatura debido a que aumentan la capacidad de adhesión de estos últimos a células endoteliales y posiblemente a otros eritrocitos (Figura 8). Estas rugosidades de la membrana están completamente ausentes en eritrocitos infectados por *B. bigemina* (Figura 7 c y d).

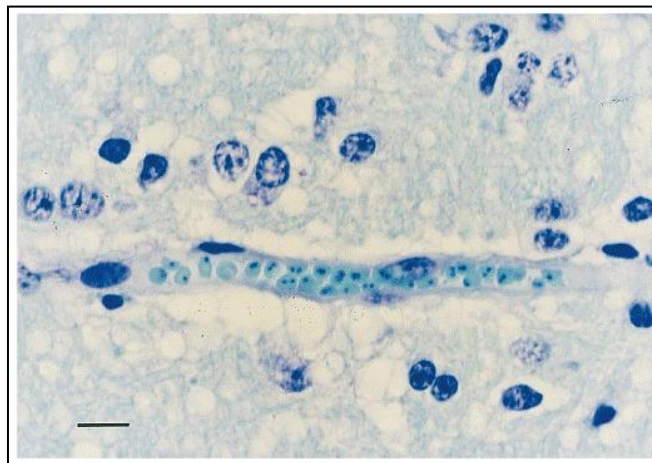


Figura 8. Corte histológico de cerebro coloreado con May Grünwald-Giemsa (100X). Se observa un corte longitudinal de un capilar cerebral conteniendo eritrocitos bovinos parasitados con *B. bovis*. Los eritrocitos se encuentran secuestrados en el capilar. (Fuente: https://www.researchgate.net/figure/227069235_fig2_Fig-2-Section-of-brain-from-a-calf-inoculated-with-clone-F1-Note-the-B-bovis-within)

Por este motivo la babesiosis causada por *B. bovis* está típicamente asociada con niveles bajos de parasitemia periférica y acumulación de glóbulos rojos parasitados en la circulación capilar de diversos órganos (Gohil et al., 2010). Las lesiones más graves asociadas a este mecanismo patogénico se hallan en el encéfalo y los pulmones. Estas lesiones pueden resultar en babesiosis cerebral y un síndrome de distress respiratorio asociado a infiltración neutrofílica, permeabilidad vascular aumentada y edema pulmonar. La babesiosis cerebral se manifiesta por una variedad de signos neurológicos por daño del sistema nervioso central y la resolución de la enfermedad es casi invariablemente fatal (Bock et al., 2004).

La enfermedad aguda generalmente cursa con 3 a 7 días de hipertermia (> 40°C) seguidos de inapetencia, depresión, aumento de la frecuencia respiratoria, debilidad y reticencia al movimiento. Se produce un cuadro de anemia hemolítica progresiva acompañada de ictericia principalmente en los cuadros más prolongados y en la que interviene el bazo. La anemia es de tipo macrocítica e hipocrómica. Los casos no fatales suelen demorar varias semanas en recuperar la condición física y productiva, pero esta recuperación suele ser completa.

2.1.2. Babesia bigemina

La patogénesis asociada a *B. bigemina* está casi completamente vinculada a una hemólisis intravascular rápida y masiva, es por ello que la hemoglobinuria se evidencia más tempranamente en el curso de la enfermedad y de manera más intensa que en la enfermedad por *B. bovis*. No se ve afectado el sistema nervioso central y la recuperación de los casos no fatales suele ser rápida y de manera completa. Sin embargo en algunos casos la enfermedad puede evolucionar de manera abrupta cursando con un cuadro de anemia e ictericia severas y culminando con la muerte del animal (Bock et al., 2004).

El mecanismo de invasión de las células eritrocíticas, su multiplicación por fisión binaria y posterior liberación al torrente sanguíneo es compartido entre *B. bovis* y *B. bigemina*, si bien este último no altera la membrana de los glóbulos rojos con formación de crestas como sucede con *B. bovis*.

3. Anaplasmosis bovina

La anaplasmosis es una enfermedad de los rumiantes producida por una bacteria Gram negativa del género *Anaplasma* (phylum *Proteobacteria*, clase *alpha Proteobacteria*, orden *Rickettsiales*, familia *Anaplasmataceae*). Afecta a rumiantes, principalmente al ganado bovino y a otros como búfalo de agua, bisontes y ciervos (Aubry and Geale,

2011) aunque recientemente también ha sido reportada en el oso hormiguero gigante (*Myrmecophaga tridactyla*) (Guillemi et al., 2016). En la figura 9, se muestra la relación filogenética del género *Anaplasma* respecto de otras bacterias de la clase *alpha Proteobacteria* (Dunning Hotopp et al., 2006).

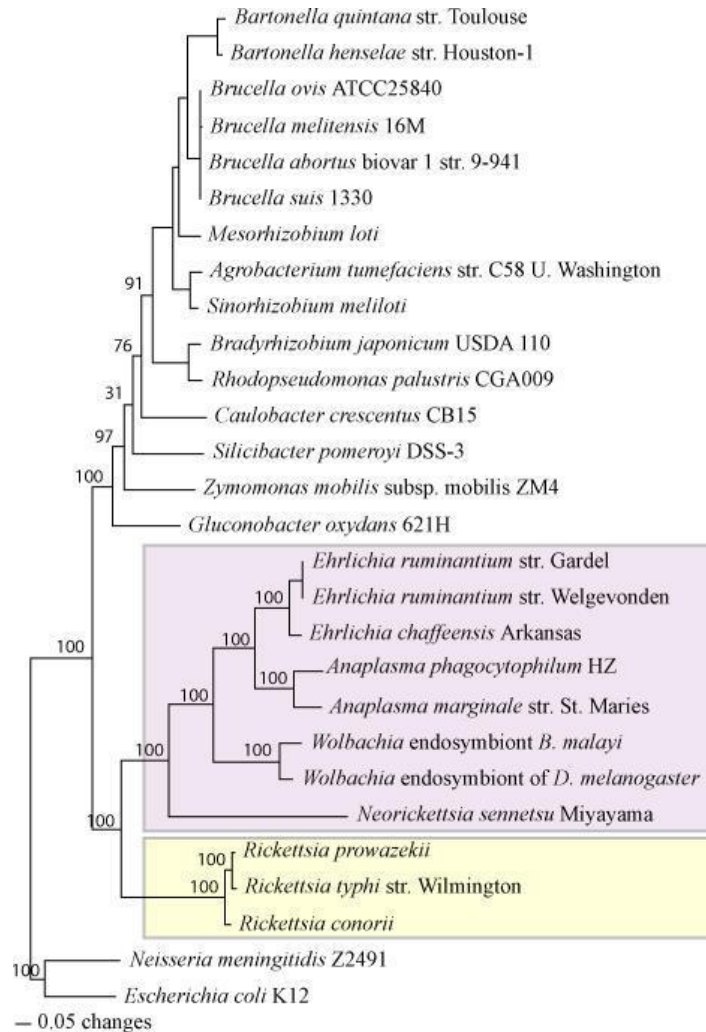


Figura 9. Árbol filogenético construido por el método de máxima verosimilitud a partir de un concatenado de 31 secuencias proteicas codificadas por genes conservados de α -Proteobacterias (Dunning Hotopp et al., 2006). En el recuadro violeta se muestran, del orden Rickettsiales, los organismos de la familia Anaplasmataceae y en amarillo los de la familia Rickettsiaceae. Se utilizaron como *outgroup* para enraizar el árbol a la c-Proteobacteria *E. coli* y b-Proteobacteria *Neisseria meningitides*.

La Anaplasmosis bovina, al igual que la Babesiosis, genera importantes pérdidas económicas asociadas no solo a las tasas de morbilidad y mortalidad en el ganado

vacuno, sino también por pérdidas vinculadas a una menor tasa de ganancia de peso en el ganado, menor producción lechera, abortos y gastos en tratamientos de los animales enfermos. Es una enfermedad infecciosa no contagiosa, transmitida biológicamente por garrapatas y mecánicamente por transferencia de eritrocitos infectados a través de insectos hematófagos (tábanos), agujas y equipamiento de cirugía, descorne, castración y tatuaje (Ewing, 1981). La anaplasmosis es una enfermedad endémica en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, incluyendo México, América Central y del Sur y el Caribe (Kocan et al., 2003).

Anaplasma marginale es un microorganismo intracelular obligado de los eritrocitos bovinos que produce infecciones persistentes generando cuadros graves de anemia. En el país también se encuentra la subespecie *A. centrale*, la cual es menos patógena y suele no generar cuadros clínicos en los bovinos. Debido a éstas características, *A. centrale* se utiliza en muchos países, incluido Argentina, como vacuna viva contra la Anaplasmosis causada por *A. marginale*.

3.1. Ciclo biológico de *A. marginale*

El tipo celular principalmente afectado por *A. marginale* en el hospedero mamífero son los eritrocitos (De la Fuente et al., 2003; Ristic and Watrach, 1963) y el sitio conocido de replicación de esta bacteria es dentro de las inclusiones de la membrana en el citoplasma del glóbulo rojo, donde se multiplica por fisión binaria. Sin embargo, dado que durante el período de alimentación de las garrapatas éstas no acceden con el aparato bucal de manera directa a los capilares, sino que al contrario, se alimentan de fluidos tisulares y sangre que se acumula en forma de lagunas por el daño de los vasos sanguíneos, se propuso recientemente que en el pasaje de los patógenos desde la saliva del vector hasta su célula blanco, existe una instancia de replicación en otro tipo celular íntimamente asociado al lugar donde la garrapata muerde. De esta manera, parecería existir una replicación inicial de *A. marginale* en células endoteliales. En el año 2004, Munderloh y colaboradores (Munderloh et al., 2004) lograron infecciones persistentes de *A. marginale* en células endoteliales de primate y de bovino.

Luego de la infección inicial y de un período de incubación de entre 7 y 60 días, *A. marginale* invade los eritrocitos y sufre ciclos de replicación, remoción de los eritrocitos infectados por el sistema reticuloendotelial y reinvasión de los glóbulos rojos (Kocan et al., 2003). Se conoce que al menos 15% de los eritrocitos deben estar parasitados para generar una respuesta clínica (Radostits et al., 2007).

Las estructuras de replicación de la bacteria asociadas a la membrana celular del eritrocito son llamadas "corpúsculos iniciales" y están compuestos por cuatro a ocho bacterias (Figura 10). Estas estructuras pueden visualizarse en extendidos de sangre bovina coloreados con la tinción de May Grünwald-Giemsa como una estructura puntiforme ubicada en la periferia del eritrocito (Figura 11).



Figura 10. Imagen por microscopía electrónica de una inclusión de *A. marginale* en un eritrocito bovino, en la que se observan al menos tres organismos (Kocan et al., 2003).

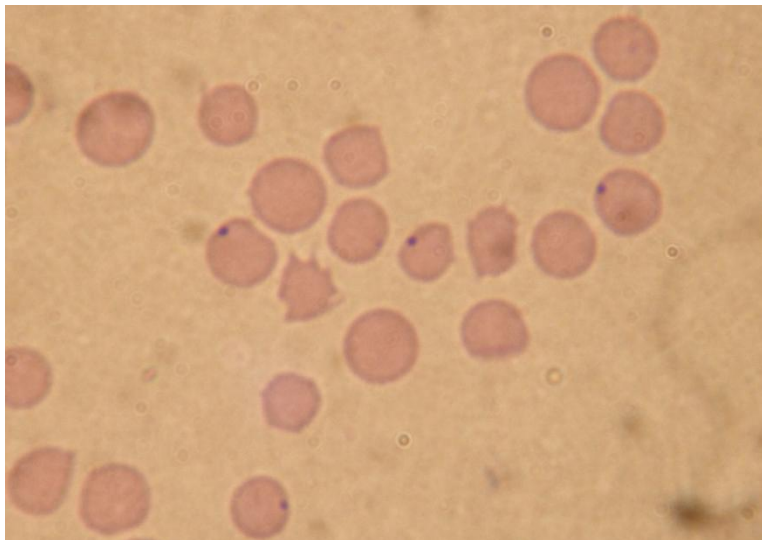


Figura 11. Extendido de sangre bovina teñido con la técnica May Grünwald-Giemsa. Se observan las estructuras puntiformes correspondientes a *A. marginale* en el margen de los eritrocitos. (Imagen propia)

Los eritrocitos bovinos infectados con *A. marginale* son ingeridos por la garrapata durante la alimentación y sirven como fuente de infección para las células intestinales del artrópodo. La bacteria se multiplica no sólo en estas células sino que muchos otros tejidos de la garrapata pasan a estar infectados incluyendo las glándulas salivales, desde donde *A. marginale* es nuevamente transmitida a otro bovino junto con la saliva (Kocan et al., 1992b). En cada sitio de multiplicación *A. marginale* se desarrolla como colonias en vacuolas asociadas a la membrana celular. La primera forma que puede identificarse en la colonia es la reticulada (vegetativa) que luego se divide por fisión binaria dando lugar a grandes colonias que pueden llegar a contener cientos de organismos. La forma reticulada luego cambia a la forma densa, que es la estructura infectiva y capaz de sobrevivir fuera de la célula. El hospedador bovino se infecta cuando al alimentarse de él, la garrapata le transmite la forma densa proveniente de sus glándulas salivales (Figura 12).

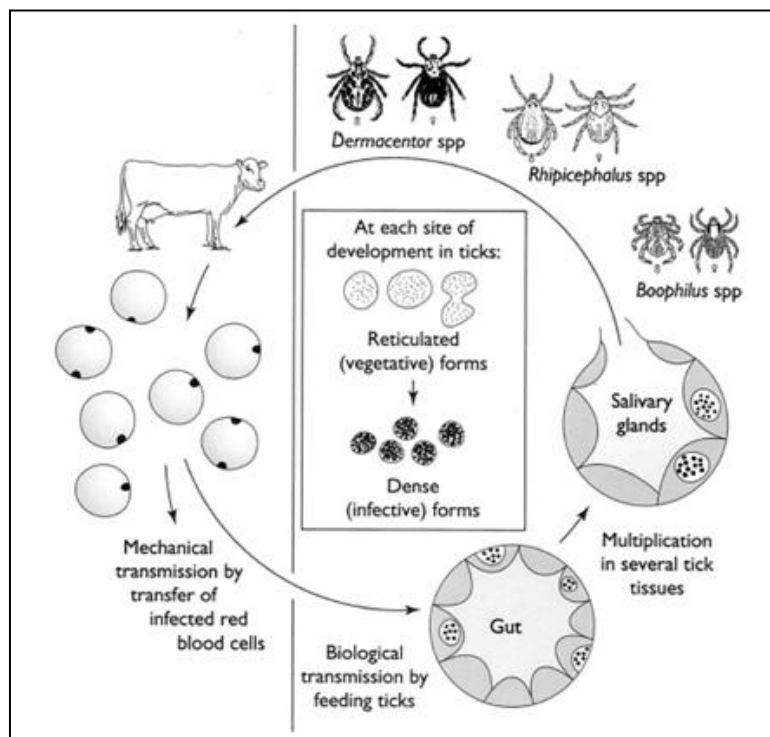


Figura 12. Ciclo biológico de *A. marginale* (Palmer et al., 1999).

La transmisión de *A. marginale* en la garrapata puede ocurrir entre los distintos estadios de la misma, y su transmisión al bovino está determinada por la movilidad de las garrapatas machos, ya que a pesar de ser una especie de ciclo monoxénico, estos son los únicos que pueden ocasionalmente cambiar de hospedero con el fin de

aumentar la posibilidad de apareamiento. Hasta la fecha, no se ha podido demostrar la existencia de transmisión transovárica de la bacteria en la teleogina, por lo que se cree que este mecanismo no ocurre en condiciones naturales (Connell and Hall, 1972; Dumler et al., 2001; Leatch, 1973; Ribeiro and Lima, 1996; Stich et al., 1989). Sin embargo (Shimada et al., 2004) lograron identificar la presencia de ADN correspondiente a *A. marginale* en larvas de *R. microplus* recolectadas de la pastura correspondiente a una región endémica para *A. marginale* y en larvas obtenidas de hembras ingurgitadas alimentadas de terneros infectados por la bacteria.

Además de la transmisión mecánica y biológica mencionadas, *A. marginale* puede ser transmitida transplacentariamente de la madre al ternero durante la gestación (Zaugg, 1985; Zaugg and Kuttler, 1984).

Los signos clínicos de la anaplasmosis incluyen anemia, ictericia sin hemoglobinemia y hemoglobinuria, resultado de la fagocitosis masiva de los eritrocitos infectados por el sistema reticuloendotelial bovino (de la Fuente et al., 2001; Potgieter and Stoltsz, 2004). Otros signos pueden incluir fiebre, pérdida de peso, abortos, letargia y muerte (Kocan et al., 2003). La severidad de estos signos depende de la edad del ganado: los terneros menores a 6 meses raramente se enferman, ya que presentan una resistencia natural posiblemente asociada a un alto perfil de Linfocitos T y δ (Hein and Mackay, 1991), mientras que los animales de entre 1 y 2 años sufren signos agudos y en los mayores a 2 años la enfermedad es aguda y a menudo fatal (Kocan et al., 2003). Independientemente de la edad del animal y del momento de infección, el ganado permanece infectado persistentemente de por vida (Richey, 1991). Durante esta etapa, se producen ciclos relativamente uniformes de entre 10 y 14 días en los cuales el número de eritrocitos infectados aumenta y disminuye (Kieser et al., 1990; Viseshakul et al., 2000). El ganado que se recupera de la infección aguda permanece infectado persistentemente y sirve como reservorio (de la Fuente et al., 2003).

HIPOTESIS

Las hipótesis de este trabajo son:

- Las distintas condiciones agroepidemiológicas modifican las prevalencias de las infecciones por hemoparásitos en el ganado bovino en establecimientos ganaderos del NEA.
- Las hembras de la garrapata *Rhipicephalus microplus* cumplen un rol como vector biológico en la transmisión de *Anaplasma marginale*.

OBJETIVOS GENERALES

Utilizar herramientas moleculares para la identificación de especies de hemoparásitos en bovinos y garrapatas en provincias del NEA, a fin de estimar sus prevalencias y su relación con distintas características agro-epidemiológicas.

Estudiar el rol de la hembra de la garrapata *Rhipicephalus microplus* como vector biológico de *A. marginale*, a partir de un ensayo de transmisibilidad de la bacteria en todos los estadios de la garrapata.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar un estudio transversal utilizando herramientas de diagnóstico molecular y para detección de anticuerpos, a fin de estimar prevalencias de los hemoparásitos transmitidos por garrapatas *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale*, en hospederos bovinos de zonas con distintas condiciones agro-epidemiológicas de la región del NEA.
2. Evaluar la presencia de *A. marginale* en larvas de *R. microplus* obtenidas a partir de hembras adultas (teleoginas) colectadas sobre bovinos de zona endémica persistentemente infectados
3. Utilizar larvas infectadas con *A. marginale* para reproducir el ciclo de infección en un bovino sano.
4. Evaluar la transmisibilidad de genotipos de *A. marginale* a través de la amplificación y secuenciación del gen marcador de genotipo *msp1a*.

CAPÍTULO 1:
Epidemiología de Babesiosis y
Anaplasmosis en el NEA

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Epidemiología de la Babesiosis y la Anaplasmosis bovina en Argentina

Los dos microorganismos responsables de la babesiosis bovina, *B. bovis* y *B. bigemina* se presentan juntos en la mayoría de las áreas donde esta enfermedad es enzoótica¹, con una alta incidencia entre los paralelos 40°N y 33°S. Este hecho es consecuencia de la transmisión de ambos patógenos por la misma garrapata, *R. microplus* (McCosker, 1981), principal ectoparásito de los bovinos en Argentina. Además, la transmisión de estos microorganismos depende también de otros factores, como la población de vectores que, a su vez, depende de patrones de hábitat espacio-temporales (Gachohi et al., 2011), de la capacidad de transmisión de la garrapata, la susceptibilidad del hospedero (Kocan et al., 2010), prácticas de manejo de pastoreo (Gachohi et al., 2012), etc.

En el año 1938, se estableció en Argentina el Plan de lucha contra la garrapata (Núñez et al., 1982), en el cual se establecieron distintas zonas según su situación respecto a la garrapata (Figura 13):

- Zona infestada o control: ocupada por el vector y no incorporada al régimen de la reglamentación.
- Zona de lucha (de erradicación y preparatoria): en la cual se desarrollaría la extinción obligatoria de la garrapata.
- Zona indemne: abarca el área liberada del vector.
- Zona indemne natural: naturalmente inhóspita para el vector.

¹ Según definieron Collantes y Alfaro en el año 1852, una zona enzoótica es aquella en la cual una enfermedad, que reina sobre una o muchas especies de animales, ocurre de modo constante o periódico (Collantes and Alfaro, 1852).

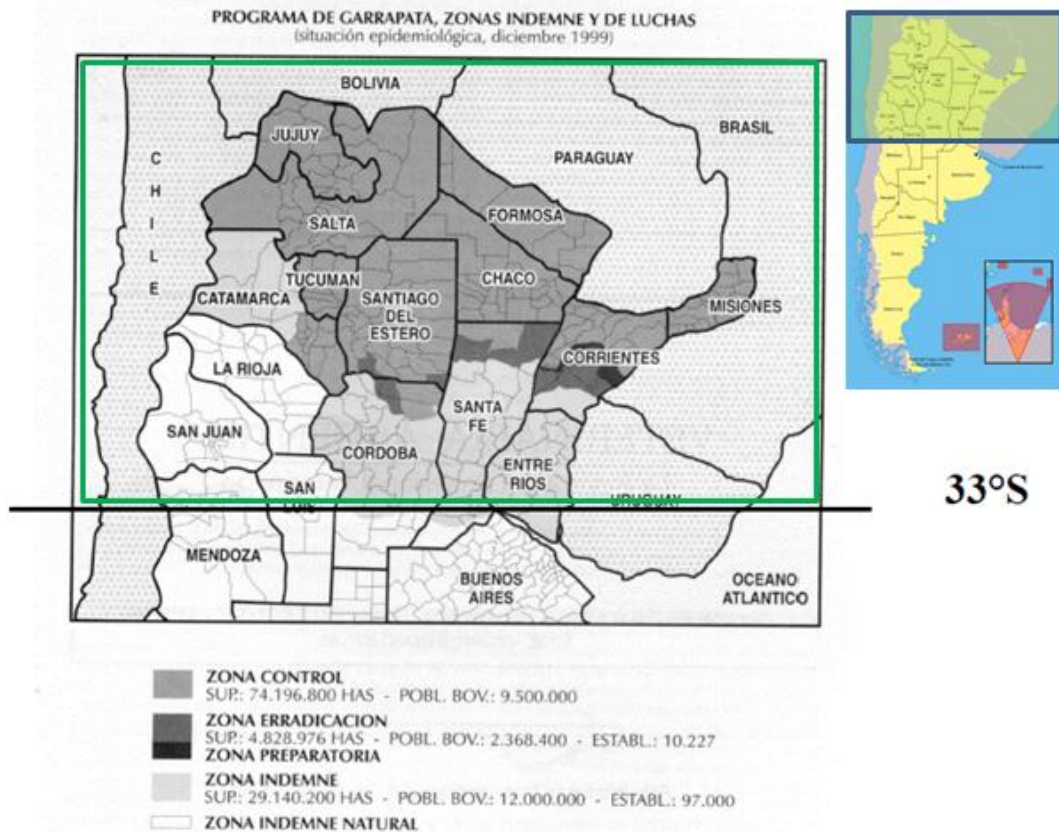


Figura 13. Zonas definidas para el control de *R. microplus* según la Ley N° 12566 (Plan de lucha contra la garrapata). En distintos tonos de gris se marcan las zonas en relación a su condición en el plan, actualizadas por SENASA (1999). El paralelo 33° S marca la división entre la región endémica y la región libre de la enfermedad.

La anaplasmosis se distribuye mundialmente en regiones con clima tropical y subtropical. En Argentina, el área enzoótica para esta enfermedad se extiende desde el límite norte del país hasta más allá del paralelo 33° S (Anziani, 1979). La extensión mayor de la zona enzoótica para la anaplasmosis en relación a la babesiosis es debida a que *A. marginale* es transmitida al ganado bovino no solo por medio de la garrapata vector (transmisión biológica), sino también en forma mecánica por medio de la utilización de fómites contaminados con sangre infectada como material quirúrgico, agujas hipodérmicas y otros instrumentos de trabajo. Esta particularidad ha dado lugar a brotes de anaplasmosis en zonas donde la garrapata no se halla presente tales como la región de la pampa húmeda (Datos no publicados). También los tábanos u otros insectos hematófagos podrían actuar como transmisores mecánicos de esta enfermedad (Kocan et al., 2003).

1.2. Concepto de estabilidad enzoótica

Por otra parte, se define como estabilidad enzoótica al escenario epidemiológico en el cual la relación hospedero, agente patógeno, vector y medio ambiente es tal, que la enfermedad ocurre esporádicamente o casi no ocurre (Perry, 1996).

La inmunidad pasiva frente a la babesiosis y a la anaplasmosis que otorgan los anticuerpos calostrales se prolonga por aproximadamente dos meses, y es seguida por una inmunidad innata desarrollada durante los 3 a los 9 meses de edad del bovino (Mahoney and Mirre, 1974). Los terneros expuestos a la infección durante los primeros 6 a 9 meses de vida, muy raramente manifiestan signos clínicos y suelen desarrollar una inmunidad efectiva a largo plazo (Dalgiesht, 1993).

Bajo condiciones de inestabilidad enzoótica (durante períodos prolongados de sequía, bajas temperaturas o uso irregular de garrapaticidas) la población de terneros dentro de un rodeo no lograría tener contacto con garrapatas y por ende no serían infectados durante un período de tiempo considerable luego de nacidos. En consecuencia, frente a un contacto posterior con el patógeno desarrollarían una enfermedad severa que puede llegar a comprometer la vida de los animales (Callow, 1984).

En zonas enzoóticas, los terneros reciben la primera infestación entre los 20 y los 45 días. Los adultos, pueden contraer clínicamente la enfermedad, aunque se encuentren en la zona endémica de garrapatas, principalmente si la zona se encuentra en condiciones de inestabilidad enzoótica. Tanto en la anaplasmosis como en la babesiosis, la gravedad de la enfermedad aumenta con la edad y las hembras preñadas abortan frecuentemente (Sarmiento, 2013).

1.3. Vacunas disponibles

Para prevenir estas enfermedades, existen vacunas que producen actualmente las Estaciones Experimentales Agropecuarias (EEA) del INTA en Mercedes (Corrientes) y de Rafaela (Santa Fe). También se produce una vacuna ultracongelada en el Laboratorio Litoral Biológicos (Puerto Tirol, Chaco).

Las hemovacunas que se utilizan contra estos hemoparásitos utilizan microorganismos vivos atenuados. Para *A. marginale*, la única vacuna comercialmente disponible contiene *A. centrale*. Esta especie es menos virulenta cuando se inocula en animales susceptibles y confiere inmunidad cruzada protectora contra la anaplasmosis.

Para la babesiosis, las vacunas disponibles en nuestro país se producen por inoculación de terneros esplenectomizados con eritrocitos infectados con cepas atenuadas de *B.*

bovis y *B. bigemina*. Estas vacunas pueden prepararse en formas congeladas o refrigeradas dependiendo de la demanda, las redes de transporte y la disponibilidad de nitrógeno líquido o de suministros de hielo seco. Las vacunas refrigeradas (4 ° C) tienen una vida útil limitada (4 a 7 días) y la seguridad y eficacia solo se pueden analizar retrospectivamente. Las vacunas congeladas permiten el almacenamiento a largo plazo y cada lote puede pasar por las pruebas de postproducción. Sin embargo, son susceptibles de daños después de la descongelación, son más costosos de producir y más difíciles de transportar (Marcelino et al., 2018).

En general, se aconseja vacunar a los animales de regiones enzoóticas ya que, al ser las enfermedades del complejo las principales en afectar a los bovinos en el NEA, se pueden evitar muertes de animales durante la reinfestación de establecimientos que habían erradicado a la garrapata, brindar estabilidad inmunológica a los rodeos limitando el impacto de los brotes y otorgar protección a bovinos sin contacto previo con los agentes patógenos y por lo tanto susceptibles, que van a ser trasladados a zonas donde la enfermedad es enzoótica. Se recomienda el uso de la vacuna en áreas de inestabilidad enzoótica, con el fin de inmunizar tempranamente a los terneros de entre 4 y 10 meses de edad, y no se recomienda la vacunación de animales mayores a esa edad ya que pueden producirse reacciones post vacunales severas e incluso muertes (Sarmiento, 2013).

1.4. Diagnóstico

Para el diagnóstico de los agentes implicados en el complejo Tristeza bovina se aplican métodos directos, es decir en busca de los agentes *A. marginale*, *B. bovis* y *B. bigemina*. También existen metodologías de diagnóstico indirecto para los tres hemoparásitos, en los que se busca detectar la presencia de anticuerpos frente a estos patógenos en el hospedador bovino.

1.4.1. Diagnóstico directo

En cuanto al diagnóstico directo de rutina se realizan extendidos de sangre coloreados por el método de May Grünwald-Giemsa que se observan por microscopía óptica (100X). Las bacterias y los parásitos intraeritrocitarios son observados y evaluados por su morfología y tamaño. Este método es sencillo, pero además de requerir un operador entrenado en la observación de los extendidos, solo permite detectar a los parásitos en etapas agudas de la infección, no siendo sensible para el diagnóstico de infecciones crónicas o subclínicas. El diagnóstico por microscopía óptica en animales

persistentemente infectados o con cuadros subclínicos resulta más dificultoso y muchas veces errático, debido a la baja tasa de eritrocitos infectados en sangre periférica (Figueroa et al., 1992). Por tal motivo se han desarrollado distintas estrategias basadas en la amplificación de un fragmento génico por medio de PCR para ambas especies de Babesia y para *A. marginale*.

1.4.1.1. Diagnóstico directo de *B. bovis* y *B. bigemina*

La PCR diagnóstica de *B. bovis* se puso a punto en el laboratorio de hemoparásitos de Instituto de Biotecnología del CICVyA-INTA, a partir de los cebadores diseñados por Bilgiç y colaboradores (Bilgiç et al., 2013), los cuales debieron ser modificados ya que amplificaban fragmentos inespecíficos en cepas locales de *B. bovis*. Los cebadores para la detección de *B. bigemina* fueron diseñados *de novo*, y fueron evaluados respecto a su sensibilidad y especificidad (ANEXO I). Para aumentar la sensibilidad de la técnica, los cebadores tanto de *B. bigemina* como de *B. bovis* se diseñaron para amplificar una región conservada de los genes que codifican para la proteína VESA1, que comprenden una familia multigénica de más de 100 genes polimórficos *ves1a* y *ves1β* (Brayton et al., 2007). Esta proteína es un heterodímero formado por las subunidades 1a y 1b y se cree que participa en el fenómeno de citoadherencia que sufren los eritrocitos infectados con *B. bovis* (O'Connor and Allred, 2000). También se ha demostrado que los genes *ves-1* están presentes en el genoma de *B. bigemina* y sus productos, como en el caso de *B. bovis*, están probablemente implicados en la variación antigénica (Florin-Christensen et al., 2014).

1.4.1.2. Diagnóstico directo de *A. marginale*

Entre los protocolos de PCR descrito para el diagnóstico molecular de *A. marginale* se encuentran las reportadas por Bilgiç y colaboradores (Bilgiç et al., 2013) y Torioni de Echaide y colaboradores (Torioni de Echaide et al., 1998). La primera fue diseñada para amplificar una región del gen *mSP1b* que codifica para una proteína de superficie MSP1 (del inglés, *Major Surface Protein 1*), la cual está codificada por una familia multigénica que comprende dos marcos de lectura abiertos de par en par y tres marcos de lectura parciales (Brayton et al., 2005). Dos de los tres marcos de lectura parciales comparten 100% de identidad a nivel nucleotídico, por lo que los cebadores utilizados fueron diseñados para amplificar un fragmento de 265 pares de bases de esta secuencia (Bilgiç et al., 2013). La segunda, se basa en la amplificación del gen *mSP5* que codifica para la proteína mayor de superficie MSP5, la cual se encuentra muy conservada en diferentes aislamientos en varios países (Vidotto et al., 2006).

1.4.2. Diagnóstico indirecto

Respecto al diagnóstico indirecto, existen desarrolladas pruebas de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) para la detección de los anticuerpos de estos microorganismos. Las técnicas más utilizadas en el ámbito de diagnóstico veterinario consisten en dos ELISA indirecto con antígenos provenientes de un lisado de merozoítos para *B. bovis* (Echaide et al., 1995) y *B. bigemina* (Thompson et al., 2006) y un ELISA de competición basado en una proteína recombinante para la detección de anticuerpos de *A. marginale* (Torioni de Echaide et al., 1998).

1.4.2.1. Diagnostico indirecto de *B. bovis* y *B. bigemina*

Para llevar a cabo los ELISA de *B. bovis* y *B. bigemina* se utilizan antígenos crudos que se obtienen de cultivos *in vitro* de alta parasitemia de cepas atenuadas y se purifican parcialmente por centrifugación diferencial. Para lisar los merozoítos purificados se realizan ciclos de congelado y descongelado en nitrógeno líquido para, luego de centrifugar, obtener un sobrenadante con antígeno crudo, el cual se cuantifica y se utiliza para adherir a la placa (sensibilización). Luego se incuba el suero incógnita y posteriormente el anticuerpo secundario conjugado.

1.4.2.2. Diagnóstico indirecto de *A. marginale*

El ELISA de competición para *A. marginale* permite detectar con alto grado de especificidad los anticuerpos contra el patógeno. Para ello, se utiliza un anticuerpo monoclonal conjugado a la enzima *HRP* (del inglés, *HorseRadish Peroxidase*) que reconoce un epítoto específico de la proteína de superficie MSP5 de *A. marginale* (Ndung'u et al., 1995). De esta manera, el suero incógnita se incuba en placas de poliestireno sensibilizadas previamente con la versión recombinante de MSP5 (rMSP5) y luego con el anticuerpo monoclonal conjugado. Finalmente se revela con el sustrato de la enzima *HRP* (Knowles et al., 1996).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Área de muestreo

Se realizaron muestreos de sangre y suero bovinos en distintos establecimientos ganaderos en tres provincias pertenecientes al NEA: Corrientes, Misiones y Formosa (Figura 14).

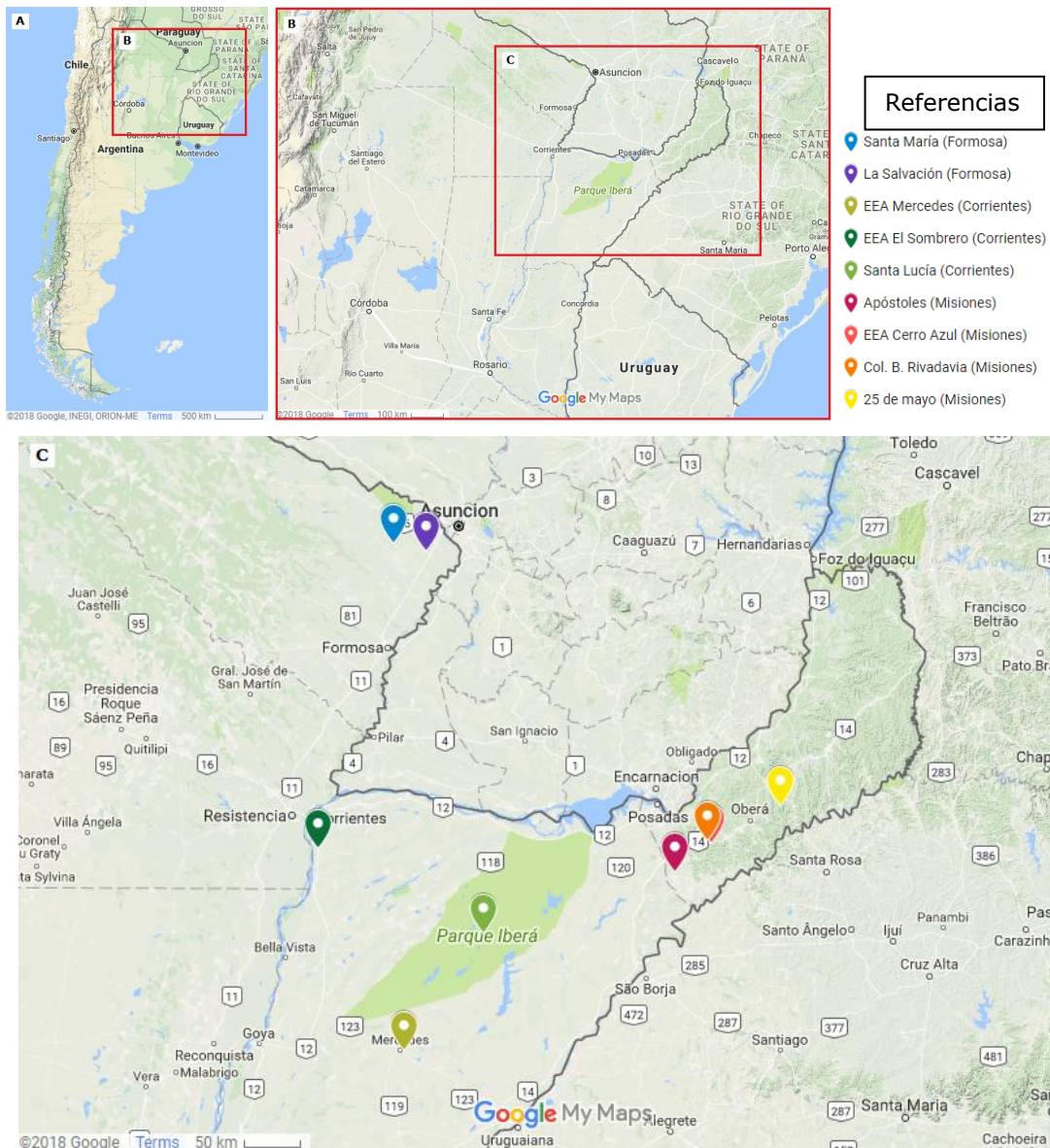


Figura 14. Área de estudio. A) Mapa de Argentina donde se detalla en B) una subregión del NEA que contiene la zona de muestreo. C) Zona de muestreo. En distintos colores se destacan los establecimientos muestreados. Dos establecimientos de la provincia de Misiones (EEA Cerro Azul y Col. B. Rivadavia) se encuentran próximos y por tal motivo las marcaciones de coordenadas se muestran superpuestas.

En cada establecimiento muestreado se realizó una encuesta a fin de coleccionar datos respecto de las coordenadas geográficas, tipo de ganado, uso de acaricidas, etc. que permitan establecer criterios de interés para definir las distintas condiciones agroepidemiológicas (ANEXO II). Los datos obtenidos se detallan en la tabla 1.

Una de las características de interés que se incluyó en este trabajo está asociada a la presencia y/o abundancia de la garrapata común del bovino *R. microplus* en el área de estudio. La variable principal a tener en cuenta respecto a esta característica es el uso de acaricidas: periódico y obligatorio (cada 21 días), optativo (no obligatorio) o no uso de acaricidas.

El primer caso es el de la EEA-Mercedes, Corrientes. Allí, someten periódicamente al ganado a baños acaricidas, por lo que se considerará una zona de control de garrapatas. Los rodeos que optativamente realizan controles ocasionales con acaricidas son aquellos muestreados en la provincia de Misiones, donde además se alternan distintos sistemas (por aspersión, inyectables, etc.). Los rodeos que no realizan control con acaricidas se encuentran en la provincia de Corrientes (EEA El Sombrero y Santa Lucía) y en la provincia de Formosa (Santa María y La Salvación).

Se estableció la edad del ganado como otra característica de interés, debido a la resistencia natural a la enfermedad en animales menores a nueve meses, según lo detallado previamente.

Respecto a la cantidad de animales muestreados, los números difieren entre los rodeos debido a que en la provincia de Misiones los establecimientos pertenecen a productores ganaderos con explotaciones de menos de 60 hectáreas. Este tipo de explotaciones se caracteriza por ser un tipo de actividad extensiva, de poco manejo de animales, sin apotreramientos y, en la mayoría de los casos, con las diferentes categorías de animales juntas en un mismo sector.

Por último, se consideraron algunas variables climáticas de zonas en particular, que permitieran definir ambientes más o menos propicios para el desarrollo de la garrapata. Para tal fin, se obtuvieron datos meteorológicos diarios de temperatura máxima, temperatura mínima, temperatura media y precipitaciones de 6 estaciones meteorológicas cercanas a los puntos de muestreo: Ciudad de Corrientes, Mercedes e Ituzaingó en la provincia de Corrientes, Oberá y Cerro Azul en la provincia de Misiones y Ciudad de Formosa.

Los mismos fueron cedidos por la red de datos centralizada en el Instituto de Clima y Agua, del Centro Nacional Investigaciones Agropecuarias del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria y por el Servicio Meteorológico Nacional.

Por otra parte, en el proceso de planificación de los muestreos se presentaron algunas dificultades relacionadas a condiciones climáticas adversas, anegamiento de caminos y disponibilidad de los productores que imposibilitaron realizar los muestreos en la misma época del año.

Depto./Rodeo	Provincia	Coordenadas	Fecha	N° animales ²	Categoría	Otros
Ituzaingó/ Santa Lucía	Corrientes	28° 19' 57" 57° 22' 20"	Diciembre 2013	78	> 9 meses	Ausencia de uso de acaricidas
El sombrero	Corrientes	27° 42' 12" S 58° 46' 11"	Enero 2014	102	> 9 meses	Ausencia de uso de acaricidas
EEA-Mercedes	Corrientes	29°11'46.5"S 58°02'35.4"W	Febrero 2014	111	<9 meses	Uso periódico de acaricidas cada 21 días por baño de inmersión
Pilcomayo/ Santa María	Formosa	25°24'23.0"S 58°07'02.5"W	Octubre 2014	54	<9 meses	No usan acaricidas No hay recuperación de pasturas naturales
Pilcomayo/ La Salvación	Formosa	25°27'62.3"S 57°51'17.3"W	Octubre 2014	38	<9 meses	No usan acaricidas No hay recuperación de pasturas naturales
Apóstoles	Misiones	27° 52' 35" S 55° 45' 18" W	Julio 2015	12	<9 meses	Uso de acaricidas por aspersión, pour-on e inyectable
Cerro Azul	Misiones	27° 39' 56" S 55° 26' 34" W	Julio 2015	15	<9 meses	Uso de acaricidas por aspersión, pour-on e inyectable
Cerro Azul/ Colonia B. Rivadavia	Misiones	27° 38' 24" S 55° 28' 48" W	Julio 2015	19	> 9 meses	Uso de acaricidas por aspersión, pour-on e inyectable
25 de mayo	Misiones	27° 22' 54' S 54° 52' 07" W	Octubre 2015	22	> 9 meses	Uso de acaricidas por aspersión, pour-on e inyectable

Tabla 1. Características de los rodeos muestreados en cada provincia. Se especifican las coordenadas geográficas, la fecha de muestreo, el número de animales muestreados, la categoría de los mismos (como animales menores o mayores a 9 meses), la raza y otras características consideradas de potencial interés para definir la situación agroepidemiológica.

² En todos los establecimientos se muestreó la totalidad de los animales.

2.2. Obtención de muestras

2.2.1. Sangre y suero

En cada establecimiento seleccionado, se colectaron muestras de la totalidad de los animales del rodeo. El muestreo en la provincia de Corrientes fue realizado por el Dr. Néstor Sarmiento de la EEA-Mercedes, Corrientes; en la provincia de Misiones por el Dr. Miguel Da Luz de la EEA-Cerro Azul y en la provincia de Formosa por el Dr. Carlos Luciani de la EEA-Colonia Benitez, Chaco.

Se extrajeron 10 ml de sangre de la vena yugular, de los cuales 5 ml fueron conservados en citrato de sodio 3.8%, y los restantes 5 ml se colocaron en tubos de las mismas características sin anticoagulante para la obtención de suero. Las muestras fueron refrigeradas para su envío al Instituto de Biotecnología del CICVyA-INTA, donde fueron recibidas y procesadas para su análisis como se detalla a continuación.

2.3. Extracción de ADN a partir de sangre entera

El protocolo de extracción de ADN genómico se aplicó de igual modo para todas las muestras de sangre recibidas. Para ello se utilizó un kit comercial de extracción (ADN PuriPrep-S kit, INBIO-HIGHWAY), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

La elución del ADN se realizó a través de las columnas provistas por el kit utilizando 70 µl de buffer de elución.

2.4. Diagnóstico molecular por PCR

Se utilizaron las PCRs diagnósticas basadas en los genes *vesa1* para *B. bovis* y *B. bigemina* y para *A. marginale* se realizó el diagnóstico por medio de la amplificación del gen *msp1b*.

Los cebadores que se utilizaron para la identificación de cada patógeno se detallan a continuación en la tabla 2:

Organismo	Gen	Secuencia de cebadores	Número de copias	Tamaño del amplicón	Referencia
<i>A. marginale</i>	<i>msp1β</i>	MAR1bB2 F: GCT CTA GCA GGT TAT GCG TC MAR1bB2 R: CTG CTT GGG AGA ATG CAC CT	2	265 pb	(Bilgiç et al., 2013)
<i>B. bovis</i>	<i>ves1a</i>	V1a_Bo F: CCA ACT GTA TTT CCT TAG GAA GC V1a_Bo R: TCA CAC CCC AGG CAC ATC CAG CT	14	125 pb	Diseño propio
<i>B. bigemina</i>	<i>ves1a</i>	V1a_Bbi F: CCC ACA CCT ACC TCA GCT GG V1a_Bbi R: GAG TAA GGC CTT GAC GTC GAT	17	436 pb	Diseño propio

Tabla 2. Secuencia de cebadores Fw y Rv utilizados para la identificación de cada patógeno

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ l, conteniendo 0,4 μ M de cada cebador, 0,2 mM de cada deoxinucleósido trifosfato (DNTPs) (INBIO Highway, Argentina), 0,5 U de GoTaq polimerasa (Promega, USA), Buffer de reacción 1X y aproximadamente 100 ng de ADN genómico.

Para cada reacción, se utilizó como control positivo ADN de una cepa de referencia del hemoparásito de interés y como control negativo se utilizó agua ultra-pura.

Los controles positivos utilizados se detallan a continuación:

A. marginale Mercedes: aislamiento obtenido en la EEA-Mercedes

B. bovis R1A: cepa cultivada in vitro

B. bigemina S2P: cepa cultivada in vitro

El proceso de amplificación por PCR se llevó a cabo en un termociclador (Bio-Rad MyCycler Thermal Cycler) aplicando el programa que se detalla en la Tabla 3.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	3 min	1 ciclo
95°C	30 seg.	35 ciclos
59°C	30 seg.	
72°C	30 seg.	
72°C	10 min	1 ciclo

Tabla 3. Programa de ciclos para la reacción de PCR.

Los productos obtenidos a partir de las reacciones de PCR fueron visualizados mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa. Se sembraron 20 μ l del producto obtenido por PCR en geles de agarosa en una solución buffer TAE 1X (Tris base 0.04 M, Ácido acético glacial 0.04 M, EDTA 0.001 M), conteniendo Bromuro de Etidio a una concentración final de 0.5 μ g/ml a fin de identificar las moléculas de ADN. Se utilizó el marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Los geles fueron observados en un transiluminador con luz ultravioleta (3UV Transilluminator UVP o Gel Doc XP BIO-RAD).

2.5. Evaluación de los sueros mediante la técnica de ELISA

Las reacciones de ELISA se llevaron a cabo en el laboratorio de inmunología de la EEA-Rafaela (Dra. Susana Torioni de Echaide). Las mismas consistieron en un ELISA de competición basado en una proteína recombinante para la detección de anticuerpos de *A. marginale* y un ELISA indirecto con antígenos provenientes de un lisado de merozoítos para *B. bovis* y *B. bigemina* como se describió previamente.

Los resultados de estas pruebas se presentan como positivos a la presencia de anticuerpos, si el valor de absorbancia supera el valor de *cut-off* establecido para cada prueba, o negativos. Por encima del valor de *cut-off* no se discrimina según el valor del título.

2.6. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados de prevalencia obtenidos tanto de la amplificación por PCR como del análisis serológico fueron evaluados estadísticamente mediante el software GraphPad Prism versión 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA. Se aplicó un test de Chi-cuadrado para testear la hipótesis nula de la homogeneidad en la distribución de los tipos de infecciones, se utilizó un intervalo de confianza (IC) del 95% y se aceptó como estadísticamente significativo un valor de $P < 0.05$. El código de significación utilizado se detalla a continuación: asterisco simple (*) para $P < 0.05$, doble asterisco (**) para $P < 0.01$, o tripe asterisco (***) para $P < 0.001$. No se utilizan asteriscos cuando las diferencias son no significativas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Diagnóstico molecular

Se realizó el diagnóstico molecular por PCR de los tres hemoparásitos en estudio y se calcularon las frecuencias de los mismos por establecimiento. Los resultados se presentan en tablas según provincia: Corrientes (Tabla 4), Misiones (Tabla 5) y Formosa (Tabla 6). En todas ellas se detalla el conteo de animales positivos según el tipo de infección y se definen tres tipos de infecciones simples con *B. bovis* (Bbo), *B. bigemina* (Bbi) o *A. marginale* y cuatro tipos de coinfecciones (combinaciones de las anteriores): co-ocurrencia de *B. bovis* junto a *B. bigemina* (Bbo-Bbi), *B. bovis* junto a *A. marginale* (Bbo-Am), *B. bigemina* junto a *A. marginale* (Bbi-Am) y los tres patógenos coinfectando la misma muestra (Bbo-Bbi-Am).

3.2. Frecuencias de hemoparásitos por provincias

CORRIENTES	EEA-Mercedes	Sta. Lucía	El Sombrero
Bbo	37	1	0
Bbi	3	1	0
Am	15	7	5
Bbo-Bbi	4	1	0
Bbo-Am	27	12	7
Bbi-Am	1	15	24
Bbo-Bbi-Am	2	37	62
NEG	21	1	0
TOTAL	110	75	98

Tabla 4: Valores absolutos correspondientes a diagnósticos positivos por PCR de tiempo final para los distintos tipos de infección en las muestras correspondientes a los tres establecimientos evaluados en la provincia de Corrientes. (Bbo: *Babesia bovis*, Bbi: *Babesia bigemina*, Am: *Anaplasma marginale*)

MISIONES	Apóstoles	EEA Cerro Azul	Col. B. Rivadavia	25 de mayo
Bbo	0	0	0	0
Bbi	0	0	0	0
Am	1	1	4	1
Bbo-Bbi	0	0	0	0
Bbo-Am	1	1	6	1
Bbi-Am	4	1	2	4
Bbo-Bbi-Am	6	12	7	16
NEG	0	0	0	0
TOTAL	12	15	19	22

Tabla 5: Valores absolutos correspondientes a diagnósticos positivos por PCR de tiempo final para los distintos tipos de infección en las muestras correspondientes a los cuatro establecimientos evaluados en la provincia de Misiones. (Bbo: *Babesia bovis*, Bbi: *Babesia bigemina*, Am: *Anaplasma marginale*).

FORMOSA	Santa María	La Salvación
Bbo	2	2
Bbi	3	3
Am	13	4
Bbo-Bbi	2	1
Bbo-Am	3	3
Bbi-Am	8	9
Bbo-Bbi-Am	0	7
NEG	13	5
TOTAL	44	34

Tabla 6: Valores absolutos correspondientes a diagnósticos positivos por PCR de tiempo final para los distintos tipos de infección en las muestras correspondientes a los dos establecimientos evaluados en la provincia de Formosa. (Bbo: *Babesia bovis*, Bbi: *Babesia bigemina*, Am: *Anaplasma marginale*).

3.3. Prevalencias de hemoparásitos por provincias

A partir de los valores absolutos (Tablas 4, 5 y 6), se calcularon las prevalencias (animales positivos respecto al total del rodeo) para cada parásito en cada establecimiento (Figuras 15, 16, 17).

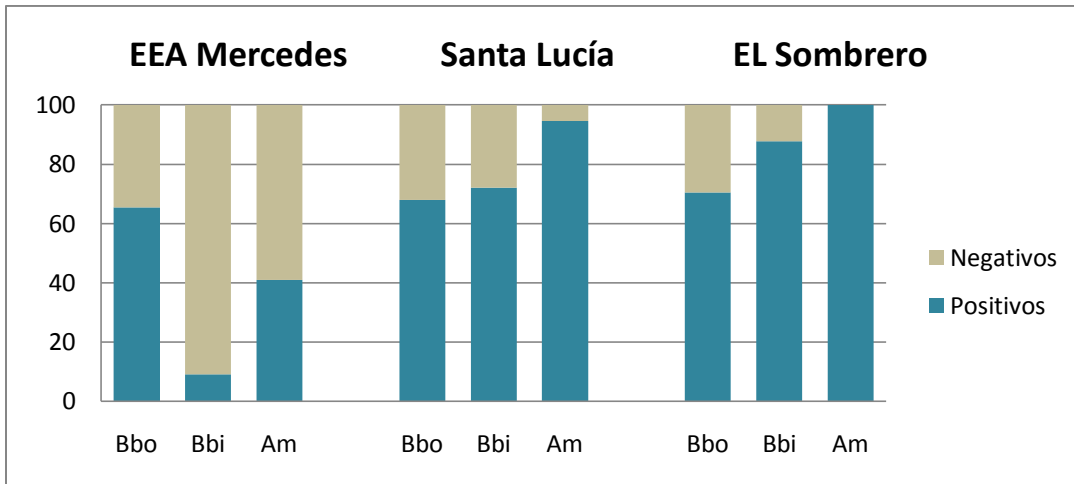


Figura 15. Prevalencias de *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* en los tres establecimientos muestreados en la provincia de Corrientes.

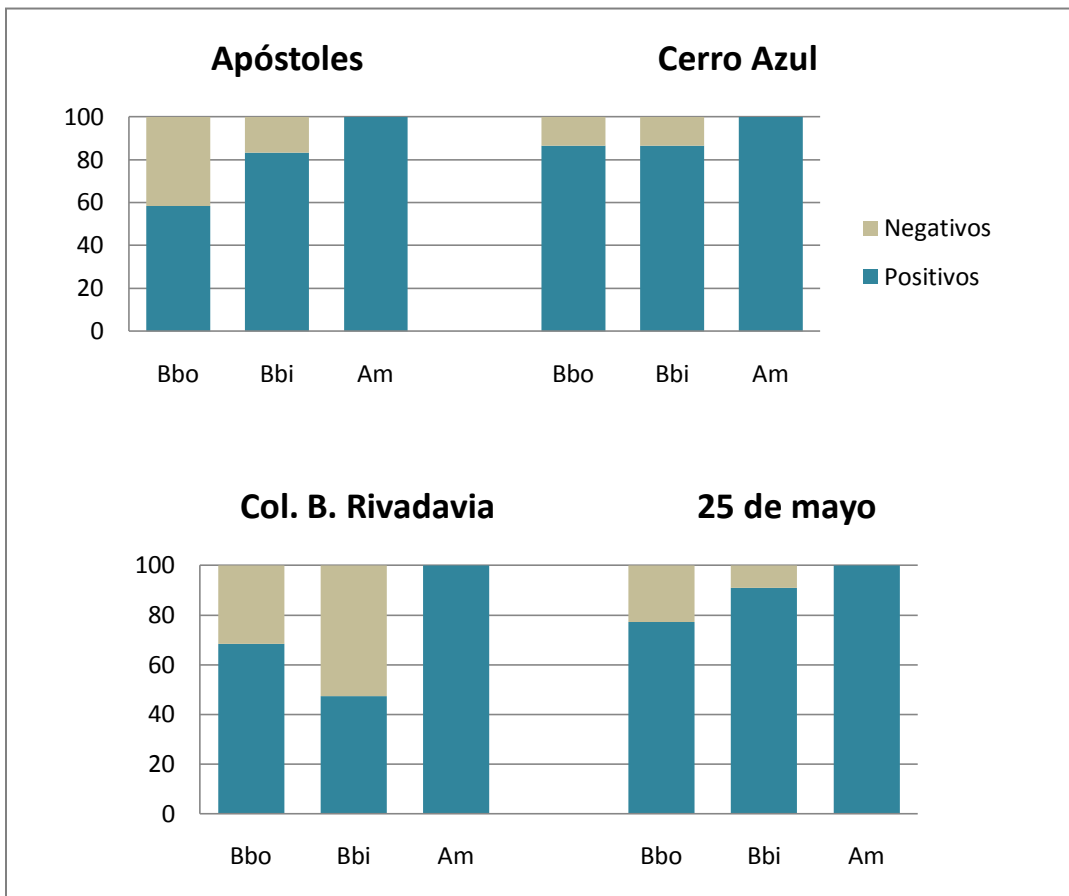


Figura 16. Prevalencias de *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* en los cuatro establecimientos muestreados en la provincia de Misiones.

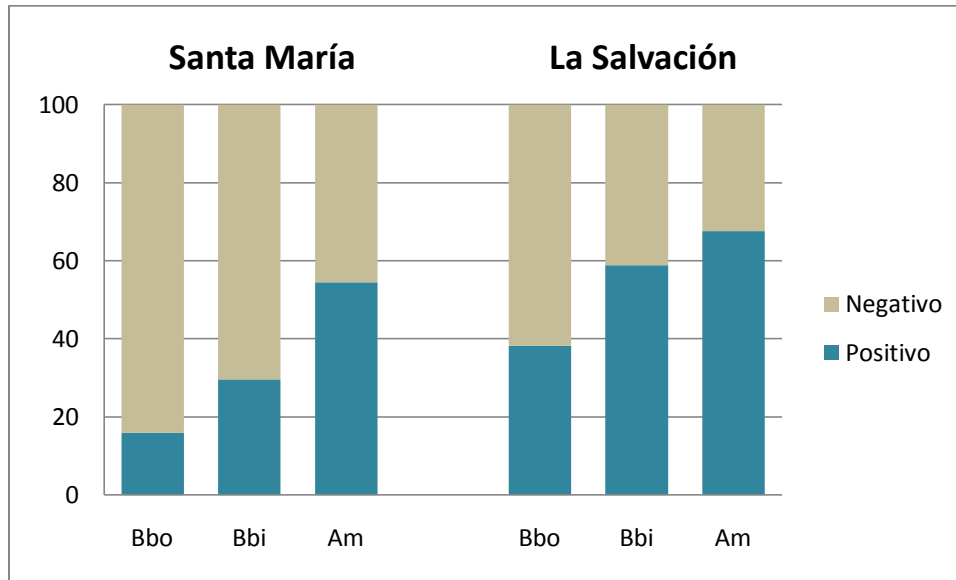


Figura 17. Prevalencias de *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* en los dos establecimientos muestreados en la provincia de Formosa.

En las figuras 15, 16 y 17 se observa que en todos los rodeos de las provincias de Corrientes, Misiones y Formosa, a excepción de la EEA-Mercedes, la infección más prevalente fue la de *A. marginale*. Respecto a las babesias, la más prevalente fue *B. bigemina* en todos los establecimientos excepto en la EEA-Mercedes y en Col. B. Rivadavia (Misiones).

En general, las prevalencias de hemoparásitos halladas son altas (mayores al 89%) en aquellos establecimientos en los que no se realiza control obligatorio del vector con acaricidas, a excepción de los establecimientos de la provincia de Formosa donde las prevalencias máximas (*A. marginale*) no superan el 68% (Figura 17). A pesar de ello, en todos estos establecimientos prevalece *A. marginale* respecto a *B. bovis* y *B. bigemina*. Este fenómeno tiene su fundamento en que *A. marginale*, además de ser transmitida por *R. microplus* es sensible a la transmisión mecánica por tábanos, agujas, etc. (Lorusso et al., 2016).

Luego de *A. marginale*, el parásito de mayor prevalencia es *B. bigemina*, excepto en Col. B. Rivadavia, Misiones donde prevalece *B. bovis*. Este patrón puede deberse a que las tasas de infección de *R. microplus* con *B. bigemina* son mayores (0.23%) que con *B. bovis* (0.04%), lo que conlleva a una tasa de transmisión más lenta de esta última al ganado (Mahoney and Mirre, 1971).

En el caso de Col. B. Rivadavia (Figura 16), el uso ocasional de acaricidas puede ser el factor que altere el patrón de la mayor prevalencia de *B. bovis* por sobre *B. bigemina*, debido a que los acaricidas en estos rodeos se aplican sobre el ganado, eliminando las formas que viven sobre el mismo, pero quedando las larvas, transmisoras de *B. bovis*, en el ambiente y por consiguiente disponibles para infestar ganado susceptible.

3.4. Prevalencias de infecciones simples o por más de un parásito

A partir de los resultados de prevalencias de hemoparásitos se calcularon los porcentajes correspondientes a la cantidad de infecciones simples o por más de un parásito, comparativamente según el rodeo en cada provincia. Los resultados se muestran en la figura 18.

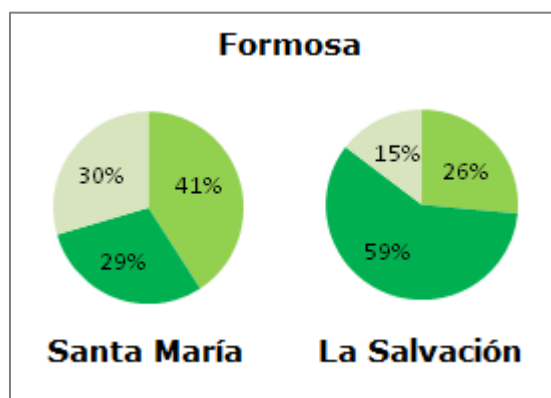
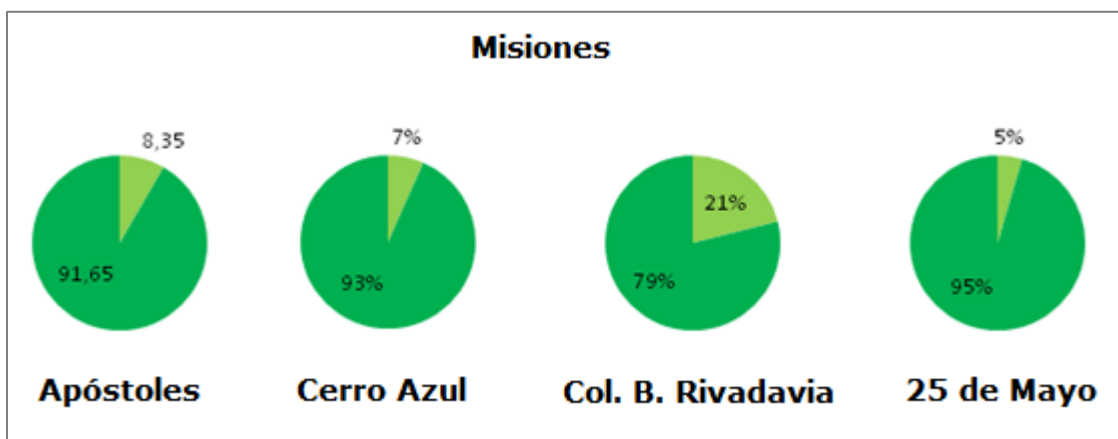
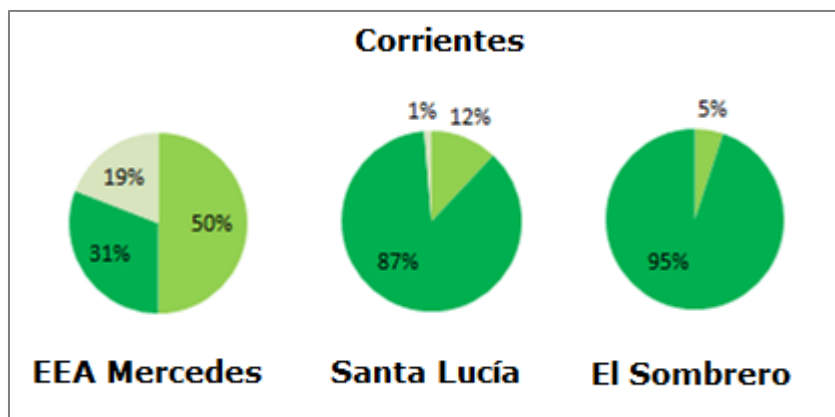


Figura 18: Porcentajes de infecciones simples (ocasionadas por un solo parásito) e infecciones múltiples (por más de una especie de parásito) según el rodeo en las tres provincias.

Referencias: ■ Infecciones simples ■ Co infecciones ■ Negativos

Siete de los nueve rodeos analizados tienen más del 50% de los animales co-infectados con 2 o tres parásitos, en cualquiera de las cuatro combinaciones posibles, y de estos siete, cinco no poseen animales negativos a algún parásito.

En la EEA-Mercedes, donde es obligatorio el uso de acaricidas, el 50% del ganado muestreado se encuentra infectado con un solo parásito, mientras que del 50% restante el 31% se encuentra coinfectado y el resto sin infección.

En el caso de los establecimientos de la provincia de Formosa (Santa María y La Salvación), se observa en ambos un alto porcentaje de animales negativos (30 y 15% respectivamente) y diferencias entre ambos establecimientos respecto al porcentaje de infecciones y coinfecciones. En estos dos rodeos no se realiza control con acaricidas, por lo que podrían existir otros factores que modifican estas proporciones, como son la edad del ganado o las condiciones climáticas que afectarían la abundancia de garrapatas.

3.5. Prevalencias según el tipo de infección por establecimientos

A partir de los datos de valores absolutos de los parásitos en cada establecimiento (Tablas 4, 5 y 6), se calcularon las prevalencias de cada tipo de infección en los distintos rodeos. Los resultados se presentan por provincias y las diferencias en las distribuciones de las prevalencias según el tipo de infección se evaluaron estadísticamente mediante un test de Chi-cuadrado. Los resultados se muestran en las figuras 19, 20 y 21 para Corrientes, Misiones y Formosa respectivamente.

3.5.1. Provincia de Corrientes

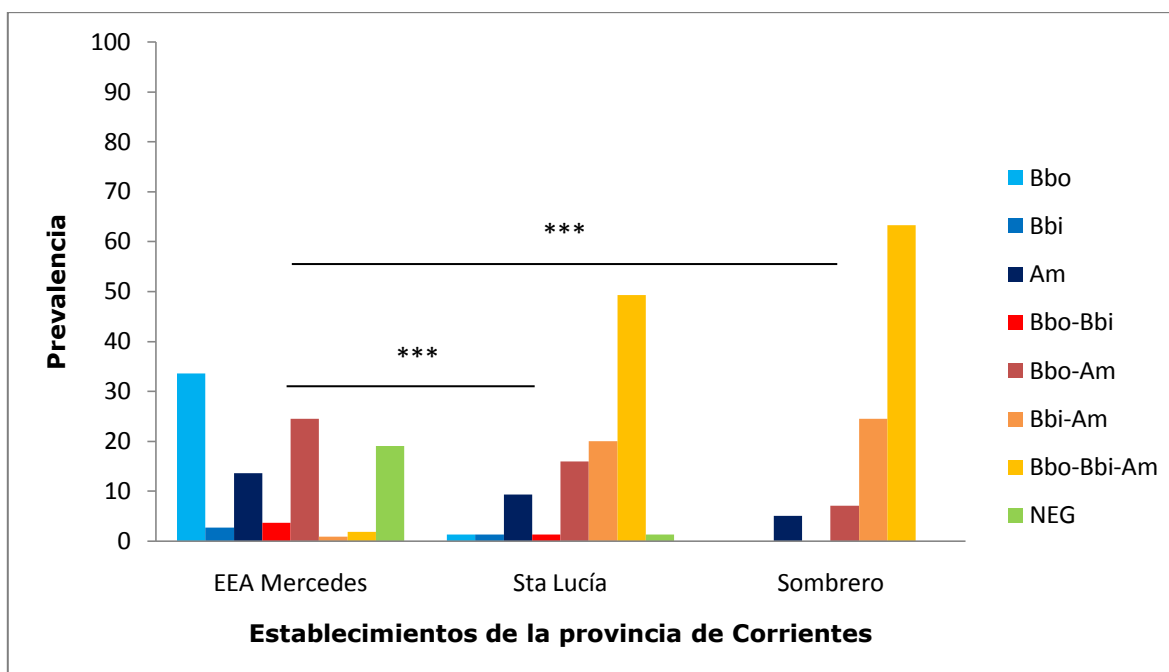


Figura 19. Prevalencia de los distintos tipos de infección para los tres rodeos muestreados en la provincia de Corrientes. (Test chi-cuadrado, IC 95%, $p < 0.05$)

En las prevalencias de los distintos tipos de infección calculadas en los rodeos de la provincia de Corrientes (Figura 19), se observan diferencias significativas entre la EEA-Mercedes y Santa Lucía y entre la primera y El Sombrero, no así entre los dos establecimientos sin control de garrapatas.

La infección simple más prevalente en la EEA-Mercedes corresponde a la ocasionada por *B. bovis* (33.64%), seguida por la de *A. marginale* (13.64%) y *B. bigemina* (2.73%). Esto podría llegar a ser un patrón ocasional dado por circunstancias que circundaron el muestreo y que escapan a este trabajo, ya que lo que se esperaría es una mayor prevalencia de *A. marginale* debido a su posibilidad de ser transmitida por otros vectores. Las coinfecciones en este establecimiento son, en su mayoría, por la coexistencia de *B. bovis* y *A. marginale*, en cambio, la prevalencia de infecciones por los tres parásitos en simultáneo es menor al 5%. Además, se encuentra que es más prevalente la ausencia de infección (19.09%) que la infección simple por *A. marginale* (13.64%). En este caso, podría considerarse que el resultado de prevalencias para este

rodeo está influido por la edad del ganado (menor a nueve meses) y las condiciones estrictas en la periodicidad del control de la garrapata.

Por el contrario, tanto en Santa Lucía como en El Sombrero, más del 50% de las coinfecciones son triples, mientras que las infecciones dobles son mayormente ocasionadas por la coinfección de *B. bigemina* y *A. marginale*. Entre las infecciones simples, son mayoría en ambos casos las debidas a *A. marginale*.

3.5.2. Provincia de Misiones

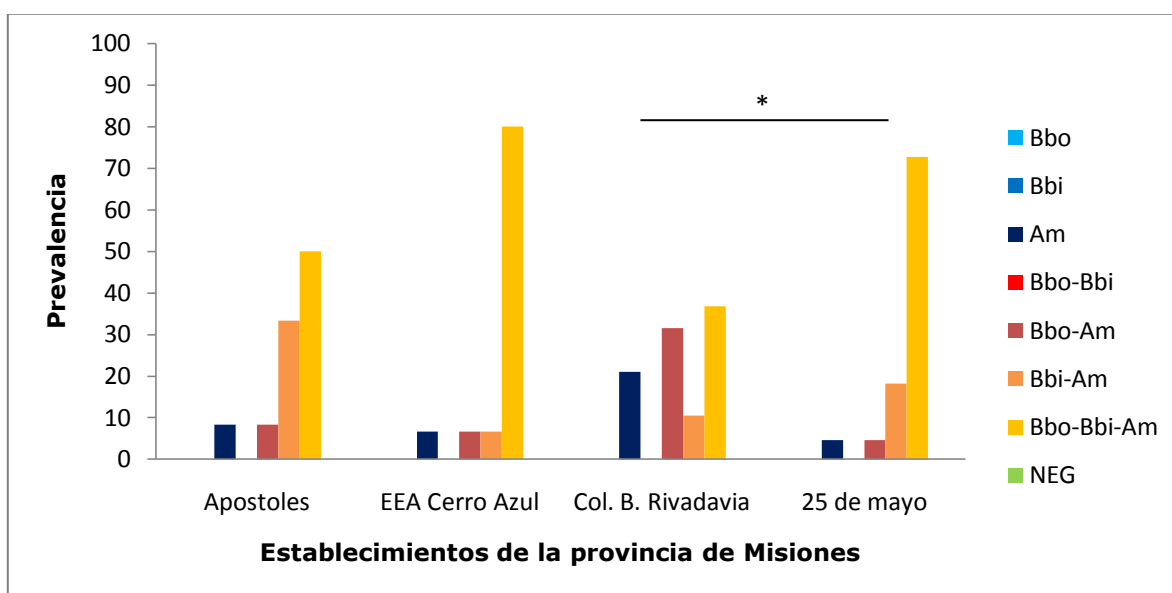


Figura 20. Prevalencia de los distintos tipos de infección para los cuatro rodeos muestreados en la provincia de Misiones. (Test chi-cuadrado, IC 95%, $p < 0.05$).

En los establecimientos de la provincia de Misiones se observan diferencias significativas entre los establecimientos Col. B. Rivadavia y 25 de mayo (Figura 20). El resto de las prevalencias de los distintos tipos de infección entre establecimientos no presenta diferencias significativas. En todos los casos prevalecen las infecciones triples por sobre las infecciones dobles excepto en Col. B. Rivadavia donde la suma de las prevalencias de *B. bovis-A. marginale* (31.58%) y *B. bigemina-A. marginale* (10.53%) superan la prevalencia de las infecciones triples (36.84%). En los cuatro establecimientos, la única infección simple que se observa está dada por *A. marginale*.

De los cuatro rodeos muestreados en esta provincia, dos poseen ganado menor a 9 meses (Apóstoles y Cerro Azul) y dos mayor a esa edad (Col. B. Rivadavia y 25 de

mayo). Con los resultados obtenidos, podría deducirse que el factor edad, en este caso, no afecta a las prevalencias obtenidas ya que no se ven diferencias significativas entre los rodeos.

3.5.3. Provincia de Formosa

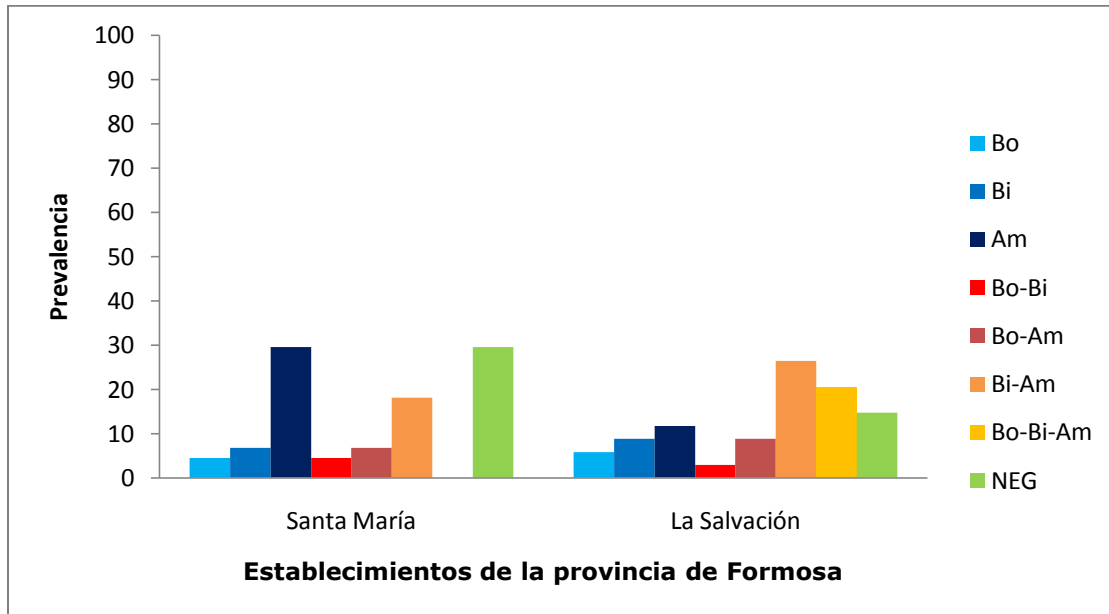


Figura 21. Prevalencia de los distintos tipos de infección para los dos rodeos muestreados en la provincia de Formosa. (Test chi-cuadrado, IC 95%, $p < 0.05$)

Las prevalencias según el tipo de infección en los establecimientos de la provincia de Formosa presentan otra distribución, no significativamente diferente entre los dos rodeos (Figura 21). En el caso de Santa María, no se observan coinfecciones por los tres parásitos simultáneamente. Sí se observan en La Salvación (20.59%), aunque este tipo de infección fue menos prevalente que las infecciones dobles. En ambos establecimientos prevalecen las infecciones simples por *A. marginale* por sobre las ocasionadas por las babesias. Como ya se observó previamente (Figura 18, Formosa), los animales no infectados están en mayor proporción en Santa María (30%) respecto a La Salvación (15%).

En relación con las condiciones agroepidemiológicas de cada rodeo, se ven diferencias en los resultados presentados hasta el momento en relación al uso de acaricidas. En la EEA-Mercedes, donde es obligatorio el uso de acaricidas, se observa una menor

prevalencia de hemoparásitos (Figura 15) y un mayor número de animales negativos (Figura 18, Corrientes). Respecto a las infecciones simples, se esperaba una menor prevalencia de *B. bovis* respecto a *A. marginale*, ya que esta última tiene otros mecanismos de transmisión, además de *R. microplus*.

En el resto de los establecimientos de la provincia de Corrientes, se ve una alta prevalencia de hemoparásitos (Figura 15), resultado esperado dadas las condiciones de no control de la garrapata.

En la provincia de Misiones, a pesar de utilizarse ocasionalmente acaricidas, no se observan bajas prevalencias de hemoparásitos (Figura 18), tampoco animales negativos a las infecciones (Figura 20).

En la provincia de Formosa, las prevalencias son muy distintas respecto a otros rodeos con las mismas condiciones de control de *R. microplus*, como son Santa Lucía y El Sombrero (Corrientes). Se observa mayor prevalencia de *A. marginale* como infección simple en ambos rodeos, y en uno de ellos (Santa María) no se observan infecciones triples (Figura 21).

La diferencia principal de los rodeos de Formosa respecto a los de Corrientes es la categoría de animales: tanto en Santa María como en La Salvación, el ganado muestreado era menor a 9 meses, mientras que en Corrientes era mayor. En ninguno de estos cuatro rodeos se realiza control con acaricida, por lo que este último factor no sería determinante en las diferencias observadas.

Para estudiar si la edad del ganado (mayor o menor a nueve meses) tiene influencia en los resultados obtenidos, se estudió si existían diferencias significativas entre los rodeos con ganado menor a 9 meses. Para ello, se compararon las prevalencias de los distintos tipos de infección entre los dos establecimientos de Formosa con los dos establecimientos de la provincia de Misiones que poseen ganado menor a nueve meses (Apóstoles y Cerro Azul). El análisis de Chi-cuadrado arrojó diferencias significativas entre los dos grupos analizados. También se compararon los rodeos de Formosa con el ganado muestreado en la EEA-Mercedes (Corrientes), también menor a 9 meses y se obtuvieron resultados significativos. Por lo tanto, se sugiere que el factor "edad del ganado" no sería el único determinante de las diferencias significativas en los patrones de prevalencias observadas.

Puede ocurrir que existan otras condiciones que ocasionen que en la región estudiada en Formosa, el ganado joven menor a nueve meses tarde más en alcanzar el estatus de infección que el mismo tipo de ganado en otra región. Posiblemente exista un conjunto de variables que operan en conjunto, como las condiciones climáticas, el

estado de las pasturas y, tal vez, diferencias en la susceptibilidad de cepas de *R. microplus*, que resultan en prevalencias de infección variables. El hecho de que sea ganado menor a nueve meses, implicaría un menor tiempo de contacto con el vector y una menor carga de garrapatas respecto al ganado juvenil y adulto (Hodgson, 1992).

3.6. Prevalencias del tipo de infección por provincias

Por último, se compararon las prevalencias del tipo de infección por provincias, incluyendo en cada una a todos los establecimientos que no realizan control periódico de acaricidas, por lo que no se tuvo en cuenta la EEA-Mercedes (Corrientes) ya que es el único que realiza este tipo de control. El resultado se muestra en la figura 22.

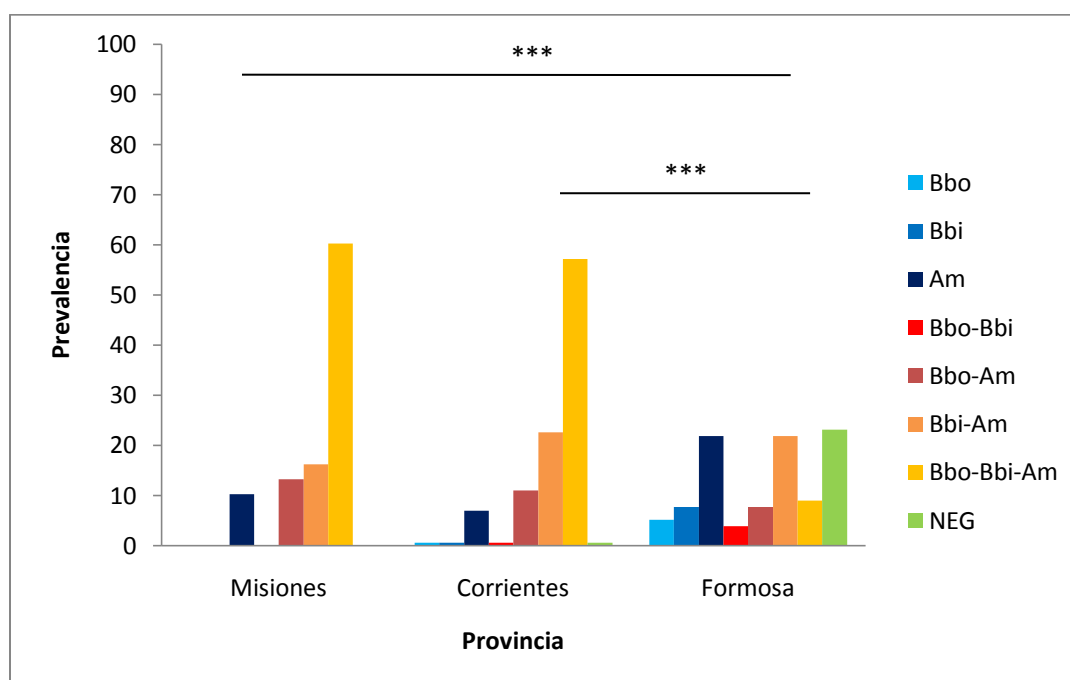


Figura 22. Prevalencia de los distintos tipos de infección según la provincia de origen. Para la provincia de Corrientes se excluyó el rodeo EEA-Mercedes (Test chi-cuadrado, IC 95%, $p < 0.05$).

Al comparar las prevalencias de los distintos tipos de infección por provincias (Figura 22), se observan diferencias significativas entre Formosa y Corrientes y entre Formosa y Misiones, no así entre Corrientes y Misiones.

Las posibles diferencias en las prevalencias de los distintos tipos de infección no estarían determinadas por las edades del ganado exclusivamente, ya que hay establecimientos con bovinos menores a nueve meses en la provincia de Misiones y sin embargo no hay diferencias significativas de prevalencias dentro de esta provincia y tampoco respecto de la provincia de Corrientes (Figuras 20 y 22).

Por otra parte, el uso o no de acaricidas ocasionales tampoco sería determinante por sí solo ya que los establecimientos de Misiones y los de Corrientes difieren en ese aspecto, sin embargo no presentan diferencias significativas en las prevalencias para cada tipo de infección.

3.7. Diagnóstico serológico

3.8. Prevalencias por diagnóstico serológico

Por último, se compararon las prevalencias de animales positivos mediante la detección de anticuerpos específicos utilizando los ensayos de ELISA previamente descritos. A continuación se presentan los resultados para todos los rodeos muestreados en las provincias de Corrientes (Figura 23), Misiones (Figura 24) y Formosa (Figura 25)

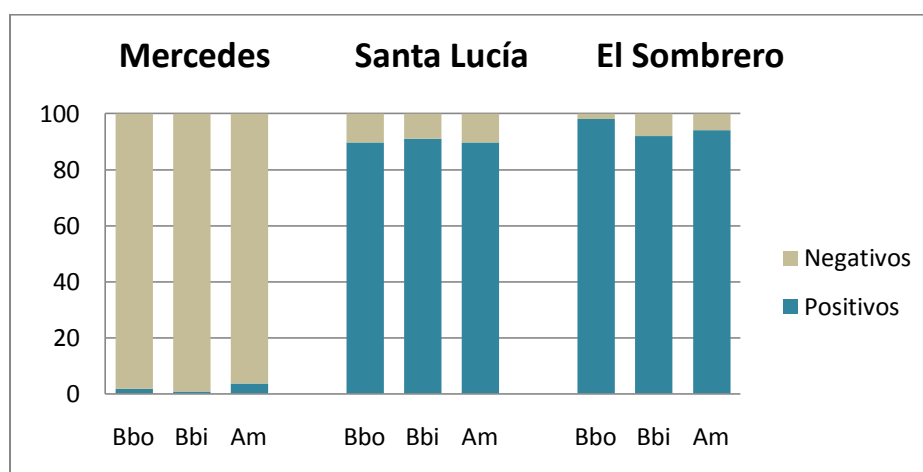


Figura 23. Prevalencias de animales positivos mediante la detección de anticuerpos específicos contra *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* utilizando la técnica de ELISA en los tres establecimientos muestreados en la provincia de Corrientes.

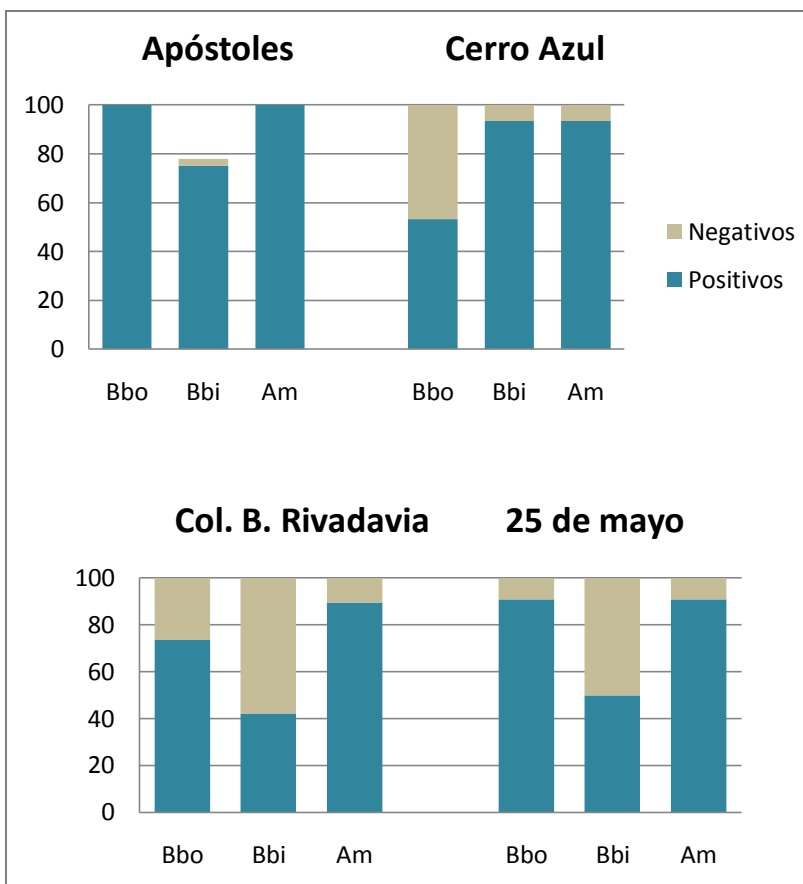


Figura 24. Prevalencias de animales positivos mediante la detección de anticuerpos específicos contra *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* utilizando la técnica de ELISA en los cuatro establecimientos muestreados en la provincia de Misiones.

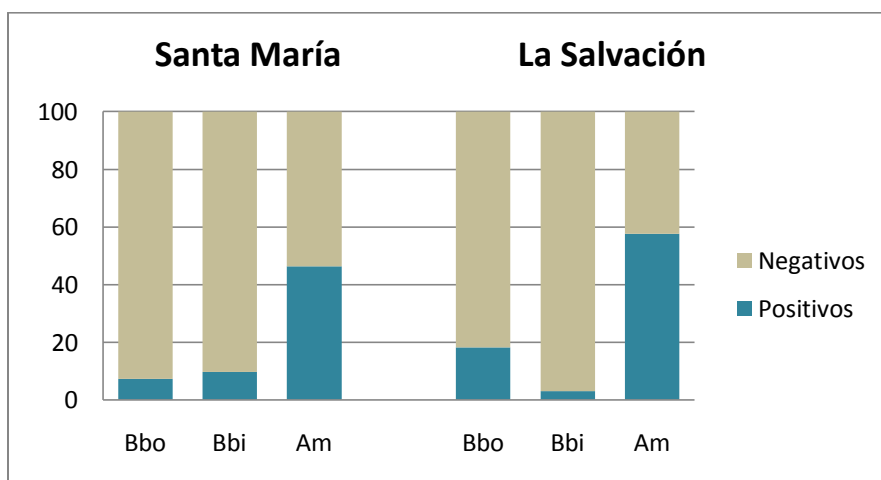


Figura 23. Prevalencias de animales positivos mediante la detección de anticuerpos específicos contra *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* utilizando la técnica de ELISA en los dos establecimientos muestreados en la provincia de Formosa.

A fin de facilitar el análisis y la discusión de los resultados obtenidos, se presentan a continuación en las tablas 7 y 8 con los datos de prevalencias por diagnóstico directo y los de prevalencia por diagnóstico serológico respectivamente.

Provincia/Establecimiento		<i>B. bovis</i> (%)	<i>B. bigemina</i> (%)	<i>A. marginale</i> (%)
Corrientes	EEA-Mercedes	65.45	9.09	40.91
	Santa Lucía	68	72	94.67
	El Sombrero	70.41	87.76	100
Misiones	Apóstoles	58.33	83.33	100
	Cerro Azul	86.67	86.7	100
	Col. B. Rivadavia	68.42	47.37	100
	25 de mayo	77.27	90.91	100
Formosa	Santa María	15.91	29.55	54.55
	La Salvación	38.24	58.82	67.65

Tabla 7: Valores de prevalencia por diagnóstico directo de los tres hemoparásitos en todos los establecimientos muestreados (según provincia).

Provincia/Establecimiento		<i>B. bovis</i> (%)	<i>B. bigemina</i> (%)	<i>A. marginale</i> (%)
Corrientes	EEA-Mercedes	1.8	0.9	3.6
	Santa Lucía	89.74	91.03	89.74
	El Sombrero	98.02	92.08	94.05
Misiones	Apóstoles	100	75	100
	Cerro Azul	53.33	93.33	93.33
	Col. B. Rivadavia	73.68	42.11	89.47
	25 de mayo	90.91	50	90.91
Formosa	Santa María	7.32	9.76	46.34
	La Salvación	18.18	3.03	57.58

Tabla 8: Valores de prevalencia por diagnóstico serológico de animales con anticuerpos contra los tres hemoparásitos, en todos los establecimientos muestreados (según provincia).

En los establecimientos Santa Lucía y EEA El Sombrero de la provincia de Corrientes se observan altas prevalencias (mayores al 89%) de animales positivos a la presencia de anticuerpos contra los tres hemoparásitos (Figura 23); en el caso de la EEA-Mercedes se observan prevalencias por debajo del 4%. En este último establecimiento puede observarse el efecto del uso de acaricidas debido a que, a pesar de contar con prevalencias moleculares del 65.45, 9.09 y 40.91% para *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* (Tabla 7), las prevalencias de animales con anticuerpos para los mismos no superan el 4%. Esto podría deberse a que el uso de acaricidas podría interrumpir la

infestación permanente, disminuyendo las cargas de garrapatas sobre el ganado y por lo tanto la frecuencia de inoculación de hemoparásitos con el consecuente efecto en la producción de anticuerpos.

En la provincia de Misiones (Figura 24) se observan altas prevalencias de animales positivos para los tres hemoparásitos, siendo mayor la prevalencia de animales positivos a anticuerpos contra *B. bovis* respecto a *B. bigemina* (excepto en el establecimiento Cerro Azul). Este resultado es inverso al que había sido observado en las prevalencias por diagnóstico directo (figura 18), donde se evidenciaba una mayor prevalencia de *B. bigemina* respecto a *B. bovis*.

Por otra parte, se observa que en la provincia de Formosa las prevalencias de animales positivos con anticuerpos contra los tres hemoparásitos no superan el 25% (Figura 23). En esta provincia, se observan bajas prevalencias de anticuerpos respecto a las prevalencias moleculares (Tablas 8 y 7 respectivamente). La mayor prevalencia se observa para los anticuerpos contra *A. marginale* en ambos rodeos y se observa seroprevalencias contra *Babesia spp.* inferiores al 20% (Figura 23, Tabla 8).

Tanto en Santa María como en La Salvación, los valores de prevalencias de bovinos con anticuerpos fueron inferiores a los de las prevalencias moleculares. Una posible explicación podría ser que existen eventos de infección, dado que hay parásitos en el ambiente, pero con baja frecuencia de reinoculación (dadas las condiciones climáticas adversas para las garrapatas, por ejemplo), imposibilitando infecciones a largo plazo que generen una respuesta serológica adecuada. También cabe destacar que los animales muestreados en estos establecimientos fueron terneros menores a 9 meses, por lo que la respuesta inmune podría tardar más tiempo en aparecer, resultando en bajas prevalencias de bovinos con anticuerpos.

3.9. Prevalencias de animales positivos con anticuerpos contra uno o más parásitos

A partir de los valores de prevalencias de las figuras 23 a 25, se calcularon los porcentajes de animales con anticuerpos para un parásito, para más de uno o para ninguno. Se presentan los resultados por provincia en la figura 26.

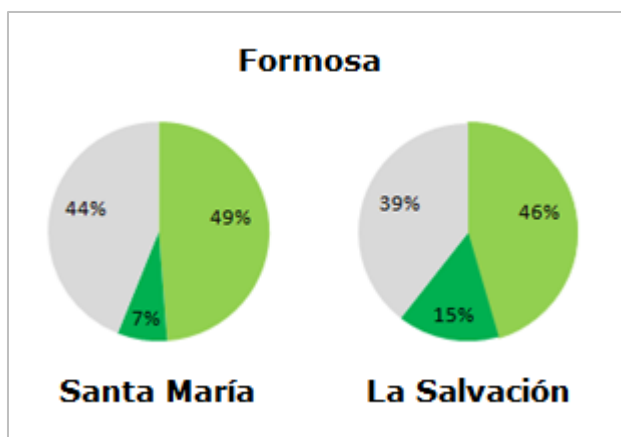
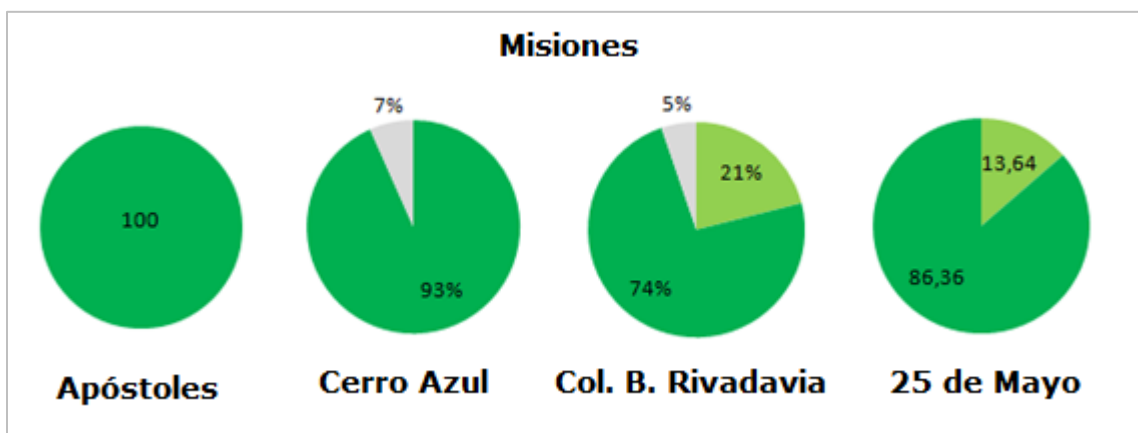
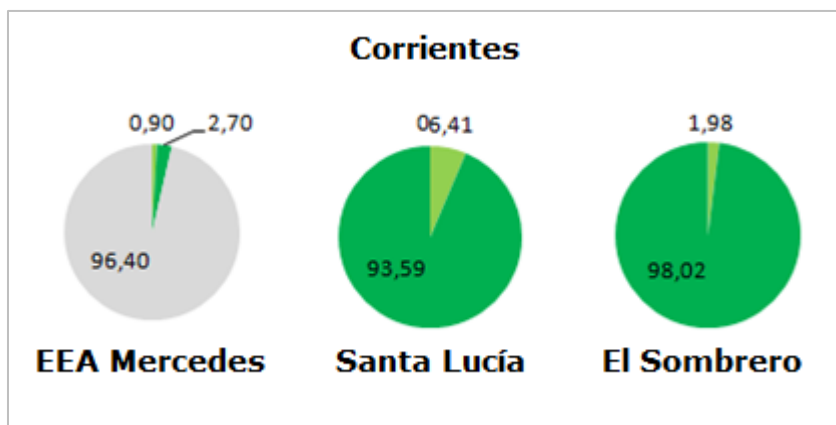


Figura 26. Porcentajes de animales positivos para anticuerpos contra un solo parásito, más de uno o para ninguno, en todos los rodeos muestreados.

Referencias: ■ Infecciones simples ■ Coinfecciones ■ Negativos

La figura 26 muestra que para los rodeos de la provincia de Misiones, y para Santa Lucía y El Sombrero (Corrientes) los porcentajes de animales con anticuerpos para más de un parásito superan el 74%. De estos establecimientos, sólo en dos de ellos en la provincia de Misiones (Cerro Azul y Col. B. Rivadavia) se ven animales con serología negativa (7 y 5% respectivamente).

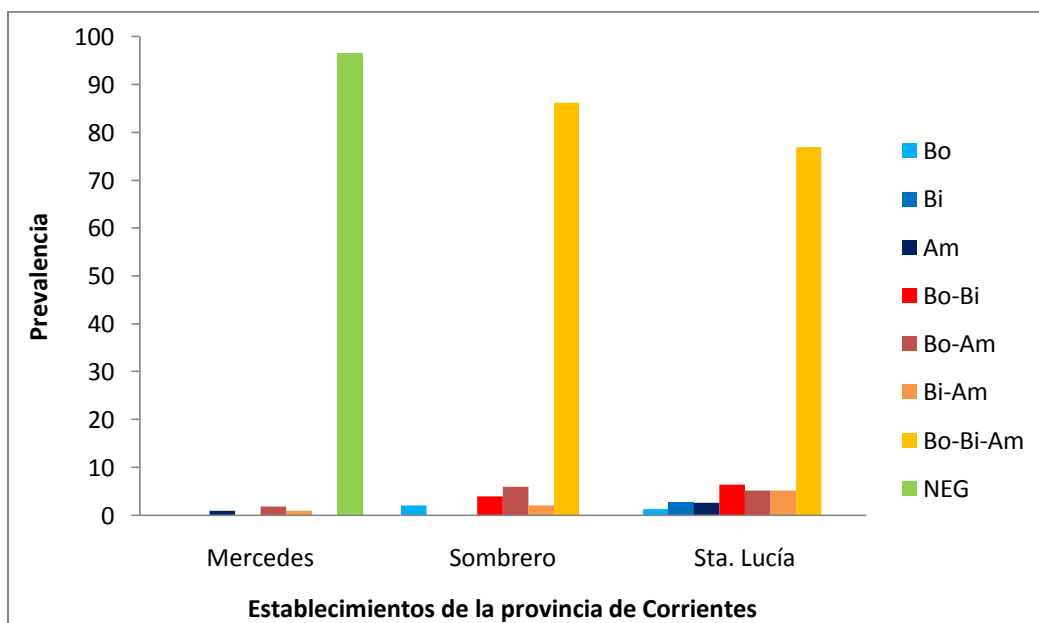
En el caso de la EEA-Mercedes, más del 98% de los animales no tienen anticuerpos para ningún parásito, sólo un 2.7% tiene serología positiva para dos o más parásitos y 0.9% para uno solo.

En Formosa, el 44% en Santa María y el 39% de los animales en La Salvación no tienen anticuerpos para ningún parásito. Sólo un 7% (Santa María) y 15% (La Salvación) tienen anticuerpos para más de un parásito, mientras que el 49 y el 46% respectivamente presenta respuesta inmune contra un solo parásito.

3.10. Prevalencias de bovinos con anticuerpos contra los hemoparásitos según los tipos de infección, por establecimientos

Se calcularon las prevalencias de animales con anticuerpos contra cada uno de los microorganismos según el tipo de ocurrencia, individual por especie o en cualquiera de las posibles combinaciones. Los resultados se muestran en las figuras 27, 28 y 29.

3.10.1. Provincia de Corrientes



Figuras 27. Prevalencia de bovinos con anticuerpos contra los diferentes microorganismos en los establecimientos muestreados de la provincia de Corrientes.

En los rodeos muestreados en la provincia de Corrientes se observa que, en aquellos donde no se realiza control con acaricidas, más del 75% de los animales muestreados poseen anticuerpos para los tres microorganismos en estudio (Figura 27). El resto de los animales tienen anticuerpos para dos o más parásitos. Menos del 6% de los animales sólo tiene anticuerpos para un solo microorganismo (para *B. bovis* en El Sombrero y para los tres hemoparásitos en Santa Lucía).

En el caso de la EEA-Mercedes se observa (Figura 27), como se había evidenciado anteriormente (Figura 26, Corrientes), que la mayoría de los animales (96.4%) presenta serología negativa para los tres microorganismos. El resto de los animales resultaron positivos a *A. marginale* solamente, o a *A. marginale* en conjunto con *B. bovis* o *B. bigemina* (Figura 27). No hay animales con anticuerpos para los tres patógenos.

Los resultados evidencian que el uso de acaricidas a la frecuencia propuesta por el plan de lucha contra la garrapata no impide la infección del ganado, sin embargo evita las reinfecciones frecuentes que darían lugar a la formación de anticuerpos a un título detectable.

3.10.2. Provincia de Misiones

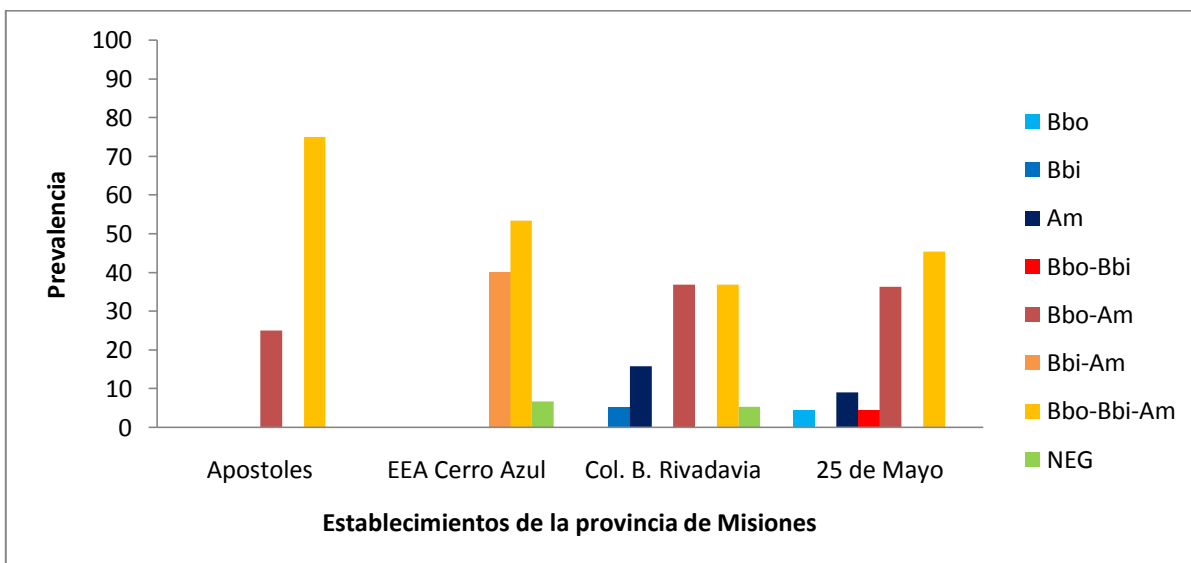


Figura 28. Prevalencia de anticuerpos para los diferentes microorganismos en los establecimientos muestreados de la provincia de Misiones.

En los establecimientos de la provincia de Misiones se observa que las prevalencias de bovinos con anticuerpos contra los tres hemoparásitos son variables según el rodeo. En dos de ellos (Cerro Azul y Col. B. Rivadavia) hay animales con serología negativa, y en Col. B. Rivadavia y 25 de Mayo se observan animales con anticuerpos para un solo parásito (Figura 28). En todos estos establecimientos se realiza control esporádico con acaricidas, por lo que esta actividad podría generar un retraso en la formación de anticuerpos dada la interrupción en la infestación producida por el tratamiento.

3.10.3. Provincia de Formosa

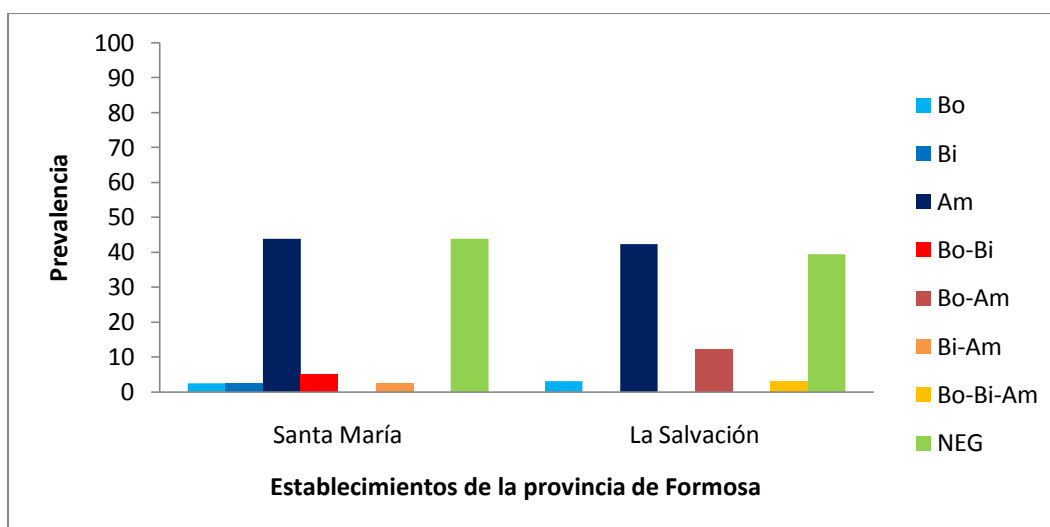


Figura 29. Prevalencia de anticuerpos para los diferentes microorganismos en los establecimientos muestreados de la provincia de Formosa.

Los rodeos de la provincia de Formosa presentan patrones similares entre sí respecto a la presencia de anticuerpos en el ganado: en ambos establecimientos, aproximadamente la mitad de los animales presenta anticuerpos contra *A. marginale* (43.9% para Santa María y 42.42% para La Salvación) mientras que la otra mitad no presenta anticuerpos para ningún microorganismo (43.9% para Santa María y 39.39% para La Salvación) (Figura 29). Los animales muestreados en ambos rodeos son menores a 9 meses, por lo que el patrón de prevalencia de anticuerpos podría ser distinto en animales adultos en la misma zona.

Estos resultados evidencian una posible falta de inóculo por parte de la garrapata, ya que solo hay presencia de anticuerpos para *A. marginale*, microorganismo que puede transmitirse en ausencia de la garrapata por medio mecánicos.

Otro factor que podría influir en las prevalencias de los hemoparásitos, garrapatas y de los anticuerpos en el ganado muestreado en las distintas regiones son las variables climáticas correspondientes. Para ello, se estudiarán las condiciones meteorológicas en los meses previos a la toma de muestras.

3.11. Análisis de las prevalencias en relación a datos meteorológicos

Se analizaron características meteorológicas de los meses previos a los muestreos a fin de evidenciar patrones que hayan podido influir en los resultados obtenidos. En particular, se analizaron los datos relacionados a los muestreos realizados en los establecimientos de la provincia de Formosa y en algunos de la provincia de Misiones (Cerro Azul y Apóstoles). El análisis se focalizó en estos establecimientos ya que ambas provincias tienen valores de prevalencias significativamente distintos a pesar de que se muestreó la misma categoría de animales (menores a 9 meses) y en ninguna de ellas se utilizan acaricidas periódicamente.

A fin de facilitar la comparación de estos datos, se analizaron climogramas (Figura 30) en los que se presentan, por regiones, los datos integrados de temperatura máxima, temperatura mínima, temperatura media y precipitaciones acumuladas, de estaciones meteorológicas en las cercanías de los rodeos muestreados. Los datos colectados provienen de las estaciones meteorológicas de la ciudad de Formosa y del municipio de Cerro Azul.

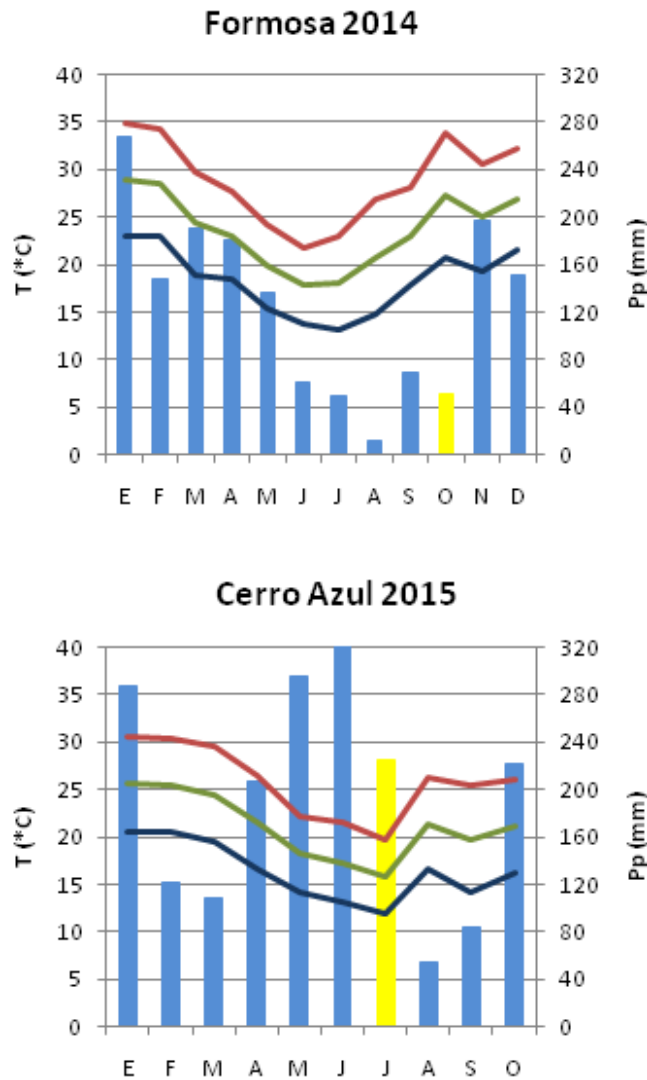


Figura 30. Climogramas correspondientes a Formosa y Cerro Azul de los meses circundantes a la fecha del muestreo. Se incluyen precipitaciones acumuladas por mes (Pp) en mm, temperatura media (T. media), temperatura máxima (T. max) y temperatura mínima (T. min) en °C. En forma de barra amarilla se identifica la precipitación acumulada del mes del muestreo.
Referencias: Pp (mm) T.media (°C) T.máx (°C) T.min (°C)

A partir del análisis de los climogramas, en la provincia de Formosa se observa que el mes de octubre (en el cual se realizó el muestreo) prosiguió a cuatro meses (junio-septiembre) de bajas precipitaciones (máximas acumuladas inferiores a 60 mm) y temperaturas medias comprendidas entre 17°C y 23°C, con un pico de temperatura

media en el mes de muestreo de 27°C. En cambio, en Cerro Azul, los meses precedentes al muestreo (marzo-junio) fueron meses de altas precipitaciones (mínimas acumuladas mayores a 110 mm) y temperaturas medias de entre 25°C y 15°C. Las condiciones climáticas de los meses previos al muestreo fueron distintas en ambas regiones. Estas condiciones podrían condicionar el desarrollo de la garrapata *R. microplus*. Los factores ambientales tienen una marcada influencia en los ciclos de vida libre de la garrapata. Lluvias copiosas, pastos altos (que proveen abundante sombra) y temperaturas elevadas acortan el período de incubación de la garrapata. En cambio, el tiempo frío junto a las escasas lluvias (que causan una disminución de la cantidad de pasto, quitando la posibilidad de sombra para las hembras ovígeras y las larvas) son factores adversos para la supervivencia de *R. microplus* (Núñez et al., 1982). Esto último junto con los resultados observados permitiría explicar la mayor prevalencia de hemoparásitos encontrada en los establecimientos de la provincia de Misiones con respecto a los de Formosa.

Los resultados obtenidos permitieron conocer la situación epidemiológica de los agentes de la tristeza bovina en establecimientos con diferencias respecto al control de la garrapata del bovino, localizados en zonas con diferencias climáticas y también el efecto que tienen estas variables en ganado de distintas edades, mayores o menores a nueve meses.

Por otra parte, los patrones de exposición al patógeno revelados con las prevalencias moleculares, no se reflejan de manera homogénea en las prevalencias serológicas, ya que en algunos rodeos se observa menor cantidad de anticuerpos respecto a la prevalencia de parásitos. Se observa que muchos animales no poseen anticuerpos para los tres microorganismos, por lo que podría ser útil la estrategia de vacunación en conjunto con la del uso de acaricidas, para evitar que las bajas prevalencias de anticuerpos y la alta carga parasitaria generen situaciones de inestabilidad enzoótica produciendo brotes.

Dado que los valores de prevalencias moleculares y seroprevalencias que se presentan en este trabajo son a partir de datos de un muestreo transversal, realizado en un momento dado en cada establecimiento, sería interesante realizar un muestreo de tipo longitudinal para evaluar la persistencia o no de los valores de prevalencia hallados. De esta forma, podrían estudiarse mejor las prevalencias en sus contextos climáticos y ver su evolución con el aumento de la edad del ganado.

En caso de que un estudio de este tipo demostrara que las prevalencias observadas en este estudio transversal no se modifican significativamente en el tiempo, sería

aconsejable que, en aquellos establecimientos donde hay efectivamente circulación de parásitos y baja prevalencia de anticuerpos, como es el caso de Santa María, La Salvación y EEA-Mercedes, vacunaran al ganado, ya que es susceptible frente al aumento repentino de las prevalencias de los microorganismos estudiados.

Para conocer el riesgo de infección de un rodeo, es aconsejable complementar los resultados serológicos con la evaluación de la prevalencia molecular de los microorganismos, aunque sea con tamaños muestrales menores a la totalidad del rodeo, a fin de verificar la presencia de parásitos circulantes, que, ante un aumento de la población de garrapatas, podrían incrementar su prevalencia poniendo en peligro al rodeo. A este factor de aumento repentino del vector, se suman las características genotípicas del mismo. Se conoce que cuando las cepas de garrapatas son de alta susceptibilidad, son suficientes bajas parasitemias en el ganado para producir la infección del 100% de las garrapatas (Hodgson, 1992). Los parásitos permanecen en el ambiente y su presencia puede ocasionar brotes de la enfermedad (Mahoney and Ross, 1972).

En relación a esto, Mastropaolo y colaboradores (Mastropaolo et al., 2009) postulan que es un error considerar que un rodeo presenta inmunidad contra los hemoparásitos sólo por pertenecer a una zona infestada con garrapatas. Además agregan que el estatus de estabilidad se debe alcanzar para cada uno de los tres microorganismos, por lo que resulta evidente que la situación puede cambiar de un año a otro e incluso ser diferente en establecimientos dentro de una misma región. En relación a este concepto, los resultados expuestos en este trabajo permiten concluir que, a pesar de que los hemoparásitos en estudio son enzoóticos en las provincias estudiadas, las prevalencias observadas no son uniformes.

Según (Brayton, 2012), las enfermedades infecciosas transmitidas por garrapatas entre las que están incluidas la anaplasmosis y la babesiosis se encuentran entre las más importantes a nivel mundial, con pérdidas económicas cercanas a los siete mil millones de dólares anuales. A pesar del impacto que generan, permanecen bajo escaso control, enfocado éste principalmente en la aplicación de acaricidas para intentar interrumpir la transmisión. En relación a esto, la aparición de garrapatas resistentes a las sustancias acaricidas representa una amenaza para esta estrategia de manejo, por lo que es importante alentar a las investigaciones tendientes a desarrollar nuevas estrategias de control.

Los resultados presentados pretenden, de forma preliminar, actualizar la información de prevalencias de los hemoparásitos en distintas zonas del NEA, a fin de re-evaluar

las estrategias de manejo y control, que tiendan a disminuir los efectos de las infecciones y a aumentar la productividad del sistema ganadero.

Por último, los resultados obtenidos permitieron evidenciar también la alta prevalencia de anaplasmosis en todos los rodeos evaluados. Sabiendo que, como se expuso previamente, la transmisión biológica de *A. marginale* está dada por los machos de *R. microplus*, que la tasa de migración de estos individuos entre bovinos es baja y que la transmisión por tábanos existe pero su eficiencia puede llegar a ser dos órdenes menor que la eficiencia por transmisión biológica (Gall et al., 2016), se propuso estudiar la existencia de transmisión vertical en hembras de *R. microplus* como mecanismo que permita explicar las altas prevalencias de *A. marginale*. Existen diversos estudios en los cuales no se ha podido evidenciar la existencia de este tipo de transmisión, sin embargo hay muchas variables en juego que podrían modificarse para estudiar este evento.

CAPÍTULO 2:
Transmisibilidad de
A. marginale

1. INTRODUCCIÓN

La anaplasmosis producida por *Anaplasma marginale*, una bacteria Gram negativa del phylum Proteobacteria, presenta una epidemiología difícil de comprender debido a que su transmisión en condiciones naturales no está bien definida (Guglielmone, 1995; Melo et al., 2001).

La transmisión mecánica puede ocurrir por malas prácticas de manejo (iatrogenia), en donde el uso compartido de material contaminado tales como agujas, instrumentos de castración, herramientas para el marcado con caravanas, elementos para tatuaje y descorne son el vehículo de la bacteria o, por artrópodos hematófagos, entre los cuales se encuentran principalmente las garrapatas, aunque también existen reportes de infecciones por tábanos (Ewing, 1981; Hornok et al., 2008). A pesar de que se conoce la importancia de la transmisión mecánica en su conjunto, no hay información que describa la relevancia, en Sudamérica, de cada uno de los mecanismos (Guglielmone, 1995). También puede ocurrir, en el hospedero bovino, transmisión transplacentaria (Swift and Palmer, 1976). Este tipo de transmisión ha sido reportada en varias oportunidades en condiciones experimentales pero con poca frecuencia en condiciones naturales. Este último caso ocurre si al momento de la infección, la madre se encuentra cursando el segundo o tercer tercio de la gestación, provocando el nacimiento de terneros con debilidad general, anemia, ictericia, o muerte a los pocos días de nacer (Calderon Goncalves et al., 2005).

La transmisión biológica, en cambio, es llevada a cabo por garrapatas, de las cuales hasta el momento se han involucrado como vectores a nivel mundial alrededor de 20 especies de la familia Ixodidae (Kocan et al., 2004).

Al igual que en otras regiones tropicales y subtropicales del mundo, en Argentina, la transmisión de *A. marginale* se encuentra principalmente vinculada a la garrapata del bovino, *Rhipicephalus microplus*, la cual se halla dispersa en zonas ganaderas de alto impacto productivo (Brayton, 2012). En Australia, se llegó a proponer que *R. microplus* cumplía un rol dominante en la transmisión, ya que la anaplasmosis ocurría sólo en zonas infestadas con esta garrapata (Leatch, 1973; Seddon and Albiston, 1966).

El rol de *R. microplus* como vector biológico de *A. marginale* está determinado por la movilidad de los artrópodos machos (transmisión intraestadial), ya que a pesar de ser una especie de ciclo monoxénico, estos son los únicos que pueden ocasionalmente cambiar de hospedero con el fin de aumentar la posibilidad de apareamiento, permaneciendo entre los hospederos por 70 días copulando y alimentándose. Aguirre y colaboradores (Aguirre et al., 1994), observaron que la tasa de migración del macho

adulto de *R. microplus* entre bovinos en condiciones naturales es aproximadamente 0.01%.

Las hembras, en cambio, después de la cópula y una vez ingurgitadas, se desprenden del hospedero para depositar los huevos en el ambiente (Guglielmone et al., 2006).

La transmisión transestadial de *A. marginale*, en la que la garrapata se infecta y transmite el patógeno durante estadios sucesivos (de larva a ninfa y de ninfa a adulto) (Connell and Hall, 1972; Eriks et al., 1993; Thompson and Roa, 1978) junto con la transmisión intraestadial de los machos, son frecuentes sólo en los sistemas ganaderos de explotación intensiva, donde el contacto físico cercano entre los animales favorece la transferencia de garrapatas (Melo et al., 2001).

A pesar de la asociación entre *A. marginale* y *R. microplus* y de considerarse a este vector como un factor importante en la propagación de la enfermedad, no se ha podido demostrar hasta la fecha la existencia de transmisión vertical de la bacteria en la garrapata, por lo que se cree que este mecanismo no ocurre en condiciones naturales (Connell and Hall, 1972; Leatch, 1973; Ribeiro and Lima, 1996). Si bien Dumler y colaboradores (Dumler et al., 2001) propusieron que la transmisión transovárica de las especies de la familia Anaplasmataceae no ocurre en ninguna de las garrapatas donde se ha investigado, entre ellas *R. microplus*, este mecanismo de transmisión ha sido reportado previamente en la familia Rickettsiaceae la cual pertenece al mismo orden (Rickettsiales) (Azad and Beard, 1998). Según estos autores, la alta prevalencia de las infecciones causadas por estas rickettsias, en Estados Unidos, no puede ser explicada sin el gran aporte que hace la transmisión transovárica en garrapatas.

Por otra parte, diversos estudios concluyen que distintos aislamientos de *A. marginale* difieren en su morfología (Kocan et al., 1984), virulencia (Kreier and Ristic, 1963; Kuttler and Winward, 1984) infectividad a garrapatas (Smith et al., 1986; Wickwire et al., 1987) y antigenicidad. En relación a esto, se sabe que algunos aislamientos son infectivos y transmisibles por garrapatas, mientras que otros no, y que esta capacidad de infectar al vector estaría relacionada con las propiedades de las adhesinas de superficie de *A. marginale* (de la Fuente et al., 2003; de La Fuente et al., 2001).

El ciclo biológico de *A. marginale* dentro de la garrapata es complejo; comienza con la infección de las células intestinales a partir de la ingestión de los eritrocitos infectados como se describió previamente en la introducción. Dentro de las células epiteliales intestinales, *A. marginale* replica y pasa a la hemolinfa para posteriormente invadir las células epiteliales de las glándulas salivales (Brayton, 2012; Kocan et al., 1992a, 1992b, 1984; Löhr et al., 2002; Potgieter, 1979; Ribeiro and Lima, 1996). Este

proceso está mediado por receptores celulares donde participan las proteínas mayores de superficie (MSPs: Major Surface Proteins) del parásito.

El genoma de *A. marginale* es pequeño (1.2 - 1.6 Mb) y circular (Meeus and Barbet, 2001) y codifica para un amplio repertorio de antígenos de superficie de gran variabilidad, entre las que se encuentran las MSPs. Estas proteínas principales de membrana están formadas por una familia de cinco proteínas que se encuentran ubicadas en la membrana celular (Tebele et al., 1991) son responsables de generar una respuesta por parte del sistema inmune de los hospedadores y a su vez resultan útiles para el diagnóstico y para el estudio de la anaplasmosis bovina (Barbet et al., 1999). Existen identificadas 6 proteínas mayores de superficie en *Anaplasma marginale*: tres de ellas, MSP1a, MSP4 y MSP5 están codificadas por genes de copia única y no varían dentro de los aislamientos, mientras que las tres restantes, MSP1b, MSP2 y MSP3 están codificadas por familias multigénicas y varían antigénicamente en ganado persistentemente infectado (Kocan et al., 2000). MSP5 corresponde a una proteína altamente conservada, inmunodominante y que ha sido identificada en *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis* y *A. phagocytophilum* (de la Fuente et al., 2005). Esta proteína es utilizada para estrategias de diagnóstico indirecto y para la detección molecular del parásito (Torioni de Echaide et al., 1998). Los genes que codifican para las proteínas MSP4 y MSP1a han sido utilizados como marcadores moleculares en estudios filogenéticos y de diversidad genética en aislamientos a escala global (Almazán et al., 2008; de la Fuente et al., 2007; De La Fuente et al., 2002; Palmer et al., 2001; Ruybal et al., 2009; Vidotto et al., 2006). Las proteínas MSP2 y MSP3 intervienen en la inducción de una respuesta inmune protectora contra *A. marginale* en el bovino (Kocan et al., 2003).

En particular, MSP1 es un heterodímero, compuesto por dos polipéptidos no relacionados estructuralmente: MSP1a, codificado por un gen de copia única y MSP1b, codificado por al menos dos genes, *msp1beta1* y *msp1beta2* (Barbet et al., 1987; Camacho-Nuez et al., 2000; Viseshakul et al., 2000). MSP1b es una adhesina para eritrocitos bovinos, sin actividad adherente para células de garrapatas en cultivo (Kocan et al., 2004), en cambio, MSP1a está descrita como una adhesina para eritrocitos bovinos y células de garrapata (de la Fuente et al., 2001; Kocan et al., 2004). Su peso molecular es distinto entre aislamientos debido a que su estructura comprende un número variable de repeticiones de 28-29 aminoácidos dispuestos en tándem en la porción amino terminal (Allred et al., 1990; de la Fuente et al., 2001; de la Fuente et al., 2002).

De la Fuente y colaboradores (de la Fuente et al., 2003) revelaron, mediante el análisis de diversas repeticiones en tándem de MSP1a, que el aminoácido ubicado en la posición 20 de la repetición era esencial para la adhesión de *A. marginale* a células de garrapatas. Según su estudio, una mutación que produjera la sustitución de los aminoácidos Ácido aspártico (D) o Ácido glutámico (E) por una Glicina (G), anularía la capacidad de adhesión del péptido a las células de garrapata. El rol de otros aminoácidos respecto a esta propiedad no ha sido estudiado, y no se observó correlación entre la organización de las repeticiones dentro de un aislamiento y su capacidad de ser transmitido. En la figura 31, se representa la estructura de la región codificante de *msp1a*, y en la figura 32 se muestra el resultado de la traducción de un fragmento secuenciado de *msp1a*, en el que se destacan dos repeticiones en tándem y sus respectivos aminoácidos ubicados en la posición 20.

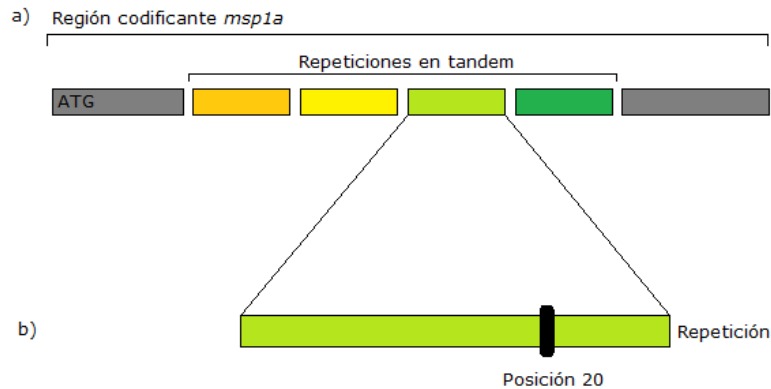


Figura 31. Representación gráfica de la región codificante de MSP1a. a) En color gris se esquematizan las regiones pre y post repeticiones, y en colores se representan distintas repeticiones en tándem. b) Esquema de la localización del aminoácido en la posición 20 (involucrado en la adhesión a la célula de garrapata) dentro de la repetición. (Figura adaptada de (Cabezas-Cruz and de la Fuente, 2015)

```

5' Frame 3
XGDXLXXXXXXGXVXVPVXXX Stop NDXQ Stop IVIRLTIGRIGXDVACSRPPWRPREFDTSE Stop STFVGLHIG Stop PATV Stop YHALIR
A MetVPALQRNA Stop V MetFTAVVLCWOTEPVTVQYCCAPQIKESIHIDHVPVVTIGIPVW Stop PABACCVWLEPDDVCSSEVLDITS
YAVPLAV Stop GLFVCVCV MetSEFSLQP TDSSASGQQQESSVLSQSDDASTSSQLG ADSSASGQQQESSVLSQSDDASTSSQLG
DWRQE MetRSKVASVEYILAARGLISVGYYAAUGETAKSLGYAPLRVAEVEEIVRUSLVRSHFHUSGLSLGSIKLVY Met QITSEFAAAG
RSTIWESSQRVGCIA Stop VFYSVT Stop IAWRNHGHSCFLCEIVIRSQFHTTYEPGSIKCKA
  
```

Figura 32. Esquema Los círculos blancos indican el aminoácido en posición 20, los recuadros amarillos encierran una repetición.

Dadas las características de este gen y debido a la variación en la porción de repeticiones es que, tal como se mencionó anteriormente, *mSP1a* se utiliza como marcador genético estable para la identificación de aislamientos de *A. marginale*, ya que la función de MSP1a puede haber sido el resultado de distintas presiones evolutivas, específicamente de aquellas ejercidas por las interacciones ligando-receptor y hospedero-patógeno (Kocan et al., 2004).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En febrero de 2017 se visitó un rodeo de la localidad de Virasoro, Corrientes. En el mismo, se tomaron muestras de sangre y suero de 26 toros de aproximadamente 3 años, de razas Brangus y Braford. Los mismos habían sido adquiridos en una cabaña de zona endémica, y a la fecha de muestreo se encontraban altamente infestados con garrapatas, moscas de los cuernos (*Haematobia irritans*) y ura (*Dermatobia hominis*). Sobre los mismos se colectaron hembras de *R. microplus* en estadio teleoginas.

2.1. Obtención de muestras

2.1.1. Sangre y suero bovinos

Se extrajeron 10 ml de sangre de la vena yugular, de los cuales 5 ml fueron conservados en citrato de sodio 3.8% y los restantes 5 ml se colocaron en tubos de las mismas características sin anticoagulante para la obtención de suero. Las muestras fueron refrigeradas para su traslado al Instituto de Biotecnología del CICVyA-INTA, donde fueron procesadas como se detallará a continuación.

2.1.2. Garrapatas

Se colectaron 10 teleoginas ingurgitadas de *R. microplus* por bovino. Las mismas se retiraron manualmente de las ingles, lomo, cuello y rostro según su ocurrencia en cada animal y se colocaron individualmente en tubos plásticos de 5 ml tapados con algodón a fin de permitir el intercambio de gases con el medio.

2.1.3. Hemolinfa de *R. microplus*

Luego de 10 días de incubar las teleoginas en estufa con humedad y a 28°C, se colectaron muestras de hemolinfa por medio del corte de una de las patas. Previamente a la colecta, y a fin de evitar que el ADN de otros organismos contaminantes presentes en la superficie de la garrapata interfiera con el diagnóstico, se limpió la pata a seccionar con alcohol 70% y se enjuagó con agua ultrapura (Sparagano et al., 1999). Posteriormente, se tomó cada teleogina con una pinza y con una pequeña tijera se seccionó un artejo de una pata. Inmediatamente, se colocó la gota de hemolinfa sobre un portaobjeto para realizar una futura tinción diferencial. Luego, se seccionó otro artejo utilizando el mismo procedimiento (Figura 33), se colectó la hemolinfa con un tip de pipeta automática y se depositó en un tubo de 0,2 ml conteniendo buffer de lisis celular para luego almacenarlo a -20°C hasta su uso. La

hemolinfa en buffer se utilizó directamente, sin extracción previa de ADN, en las reacciones de PCR.



Figura 33. Teleogina ingurgitada a la cual se le seccionó un artejo de la pata 2 para obtención de hemolinfa (detalle círculo verde). (Imagen propia).

2.1.3.1. Tinción diferencial

Los extendidos de sangre y hemolinfa se tiñeron con un kit de tinción diferencial "TINCION 15" (BIOPUR S.R.L., Rosario, Argentina). El mismo consta de una solución fijadora y dos soluciones de tinción, que permiten discriminar estructuras celulares por medio del tipo de coloración que adquieren. Se siguió el protocolo del fabricante tanto para los frotis como para los extendidos de hemolinfa, los cuales fueron observados al microscopio óptico (Olympus CX-31) utilizando un objetivo 100X con inmersión.

2.1.4. Larvas de *R. microplus*

Para obtener larvas de *R. microplus*, se colocaron los tubos conteniendo teleoginas individuales en una estufa, a 26°C y con humedad. Aproximadamente cuatro días después de la colección, las teleoginas comenzaron a desovar en los tubos. Treinta y tres días después del comienzo del desove, los huevos comenzaron a eclosionar,

liberándose las larvas. Del total de larvas obtenidas de cada teleogina, una fracción o *pool* de aproximadamente 200 ejemplares se utilizó para extracción de ADN y posterior diagnóstico molecular. La fracción restante se utilizó para la infestación del bovino susceptible en el ensayo de transmisibilidad.

2.1.5. Órganos de *R. microplus*

Seis de las teleoginas colectadas se utilizaron para disección de órganos, por lo que se las procesó antes del comienzo del desove. Para ello, se lavaron en alcohol 70%, se enjuagaron con agua ultrapura y se individualizaron en placas de Petri conteniendo 3 ml de PBS 1X. Se les realizó una incisión en la parte anterior del cuerpo liberando la cabeza y utilizando pinzas y agujas se extrajeron los órganos (Edwards et al., 2009; Patton et al., 2012). Se identificaron y extrajeron los ovarios, el intestino y las glándulas salivales, se lavaron con alcohol etílico al 70%, se enjuagaron en PBS 1X y se colocaron individualmente en tubos de 0,2 ml conteniendo 10 ul de PBS 1X.

2.2. Extracción de ADN

2.2.1. A partir de sangre entera utilizando kit de extracción

Para la extracción de sangre bovina se utilizó un kit comercial de extracción (ADN PuriPrep-S kit, INBIO-HIGHWAY), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. La elución del ADN se realizó a través de las columnas provistas por el kit utilizando 70 µl de buffer de elución.

2.2.2. A partir de sangre entera por el método Fenol-cloroformo

Este protocolo se utilizó para la extracción de sangre para los casos en los que se necesitó aumentar la concentración de la muestra, ya que el método permite procesar gran volumen de sangre.

A partir de 5 ml de sangre:

1. Se resuspendieron los 5 ml de sangre (un volumen) con solución buffer Tris-HCl 100mM pH 7.5/SDS 1%/NaCl 300 mM/EDTA 25 mM (1:1 sangre-buffer)
2. Se incubó la suspensión 1 hora a 37°C
3. Luego, se agregó proteinasa K hasta concentración final de 200 µg/ml y se incubó 18 horas a 56°C
4. Se colocó igual volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) al volumen de suspensión de glóbulos rojos, y se formó la emulsión invirtiendo el tubo 5 veces.

5. Se centrifugó la emulsión a 13000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Luego se retiró la fase acuosa (fase superior) y se colocó en un nuevo tubo. Se repitió el paso 4 utilizando cloroformo (1:1) para sacar el fenol residual.
7. Se centrifugó a 13000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Se dejaron evaporar los solventes 30 minutos a 65°C en campana.
9. Para precipitar el ADN, se agregó un volumen de Acetato de amonio 7,5M y dos volúmenes de etanol absoluto. Los mismos se agregaron lentamente, dejándolos caer por las paredes del tubo.
10. Se agitó levemente el tubo, y se pescó el ADN con pipeta Pasteur de vidrio, sellada y curvada en la punta.
11. Luego se cortaron las puntas de pipeta conteniendo ADN y se colocaron en un nuevo tubo.
12. Se lavó el ADN con etanol 70% y se dejó evaporar.
13. Se resuspendió el ADN en 50 ul de buffer Tris-HCl 10 mM pH 8 y se dejó 1 hora a 65°C. Luego, se congeló a -20°C hasta su uso.

2.2.3. A partir de teleoginas de *R. microplus*

Las teleoginas, previamente congeladas, se lavaron en alcohol etílico al 70% y se enjuagaron en agua bidestilada. Luego, se sumergió a cada una en un mortero con aproximadamente 3 ml de nitrógeno líquido. Una vez evaporado el nitrógeno, se comprimió mecánicamente la teleogina con el pilón hasta homogeneizar los tejidos. Luego se llevó a cabo el siguiente protocolo para extracción de ADN, modificado de (Halos et al., 2004):

1. Se dejó que levante levemente la temperatura del homogenato y se agregó 1ml de buffer de lisis de Halos (Halos et al., 2004).
2. Se agregó proteinasa K a una concentración final de 100 µg/ml y se incubó ON a 56°C.
3. Luego, se dividió el homogenato en dos tubos de 1.5 ml y se agregó a cada uno un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1)
4. Se formó una emulsión con las fases orgánica y acuosa por inversión del tubo
5. Se centrifugó dos minutos a 13000 rpm y se pasó la fase acuosa a un nuevo tubo. En caso de no obtener una interfase limpia, se repitió el procedimiento de extracción con la fase orgánica.

6. A la interfase limpia se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto (tomando como 1 el volumen inicial de la fase acuosa)
7. Se centrifugó 30 minutos a 12000 rpm y 4°C
8. Se descartó el etanol y se dejó secar el pellet de ADN a temperatura ambiente.
9. Luego, se resuspendió el ADN en 50 µl de buffer Tris-HCl 10 mM pH=8 y se dejó 10 minutos a 65°C
10. Luego, se guardó a -20°C hasta su uso.

2.2.4. A partir de larvas de *R. microplus*

En un tubo tipo eppendorf de 1,5ml se colocó una fracción de larvas de *R. microplus* (aproximadamente 200 ejemplares) previamente lavadas en alcohol etílico al 70% y enjuagadas en agua ultrapura. Se agregó 1ml de nitrógeno líquido y se procesaron mecánicamente por compresión manual con un pilón plástico para tubos pequeños. Luego, se siguió el protocolo de extracción de Halos et al. (Halos et al., 2004) descrito previamente para la extracción de ADN de garrapatas (Sección 2.2.3, capítulo 2)

2.2.5. A partir de órganos de *R. microplus*

Para la extracción de ADN de órganos de teleogina, se colocó el órgano en un tubo tipo eppendorf de 1,5 ml junto con 1 ml de nitrógeno líquido y se siguió luego el mismo protocolo descrito para la extracción de ADN de garrapatas (Sección 2.2.3, capítulo 2)

2.3. Diagnóstico por PCR en sangre bovina, teleoginas y larvas

2.3.1. Diagnóstico de *B. bovis* y *B. bigemina*

El diagnóstico por PCR de *B. bovis* y *B. bigemina* se realizó según se describió previamente en la sección 2.4 del capítulo 1, mediante la amplificación de los genes *vesa1*.

2.3.2. Diagnóstico de *A. marginale*

2.3.2.1. Por amplificación del gen *msp1b*

Para diagnosticar *A. marginale* a través de la amplificación del gen *msp1b* se utilizó el protocolo descrito en la sección 2.4 del capítulo 1.

En algunos casos en los que se necesitó aumentar la sensibilidad de la técnica, se realizó una adaptación de una "booster PCR" (Ruano et al., 1989), la cual consistió en la amplificación en una segunda reacción, idéntica a la primera, de una alícuota (2 µl) del producto de la reacción original.

2.3.2.2. Por amplificación del gen *msp5*

La proteína mayor de superficie 5 (MSP5) está altamente conservada entre distintas cepas de *A. marginale*, por lo que el gen que la codifica se utiliza con fines diagnósticos. Para amplificar un fragmento del gen, de copia única, se utilizó la reacción semianidada descrita por (Torioni de Echaide et al., 1998).

La PCR anidada es una estrategia que permite incrementar la sensibilidad mediante la utilización de dos pasos consecutivos de amplificación de modo que, el amplicón obtenido luego de la primera reacción, constituya el ADN molde para la segunda. Para ello, es necesario utilizar en la segunda etapa un par de cebadores, también denominados cebadores internos, con capacidad de hibridar hacia el interior de la secuencia previamente amplificada. El resultado es la amplificación de un segmento con menor número de bases que el amplicón original. Cuando uno de los cebadores internos coincide con alguno de los usados en la primera etapa se trata, entonces, de una PCR semianidada.

Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl, conteniendo 0,4 µM de cada cebador, 0,2 mM de cada deoxinucleósido trifosfato (DNTPs) (INBIO Highway, Argentina), 0,5 U de GoTaq polimerasa (Promega, USA) y buffer de reacción 1X. Para la primera reacción se utilizaron como templado aproximadamente 100 ng de ADN genómico y para la segunda reacción 2 µl del producto de amplificación de la primera reacción.

El proceso de amplificación por PCR se llevó a cabo en un termociclador (Bio-Rad MyCycler Thermal Cycler).

En la primer reacción de amplificación se utilizó un cebador *Forward* externo y un cebador *Reverse* interno, y en la segunda reacción se utilizó este último cebador *reverse* en combinación con un cebador *Forward* interno. Los cebadores utilizados en el primer y segundo paso se detallan en las tablas 9 y 10 respectivamente.

<i>Forward</i> externo: 5'- GCATAGCCTCCCCCTCTTC -3'
Reverse: 5'- TCCTCGCCTTGCCCCTCAGA -3'

Tabla 9. Cebadores utilizados en el primer paso de la reacción semianidada para la amplificación del gen *msp5*, la cual amplifica un fragmento de 458 pares de bases.

Forward interno : 5'- TACACGTGCCCTACCGACTTA -3'
Reverse: 5'- TCCTCGCCTTGCCCCTCAGA -3'

Tabla 10. Cebadores utilizados en el segundo paso de la reacción semianidada para la amplificación del gen *msp5*, la cual amplifica un fragmento de 345 pares de bases.

Las características del ciclado para ambos pasos se detallan a continuación (Tabla 11).

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	3 min	1 ciclo
94°C	40 seg.	35 ciclos
58°C	40 seg	
72°C	40 min	
72°C	10 min	1 ciclo

Tabla 11. Programa de ciclos para los dos pasos de amplificación del gen *msp5*

2.4. Infestación de bovino susceptible

Dado que se obtuvieron cuatro *pooles* de larvas de *R. microplus* (L1, L2, L3, L4) positivas para *A. marginale* (aproximadamente 320 mg de larvas infectadas) de cuatro teleoginas también positivas (T1, T2, T3, T4), se decidió realizar un experimento de transmisibilidad infestando un bovino sano. Dado que la infestación se realizaría con algunos *pooles* de larvas positivos para *B. bovis* y *B. bigemina*, se decidió vacunar para ambos patógenos al bovino a infestar, a fin de protegerlo contra la infección de los mismos.

Este ensayo se llevó a cabo siguiendo el esquema que se propone en la figura 34.

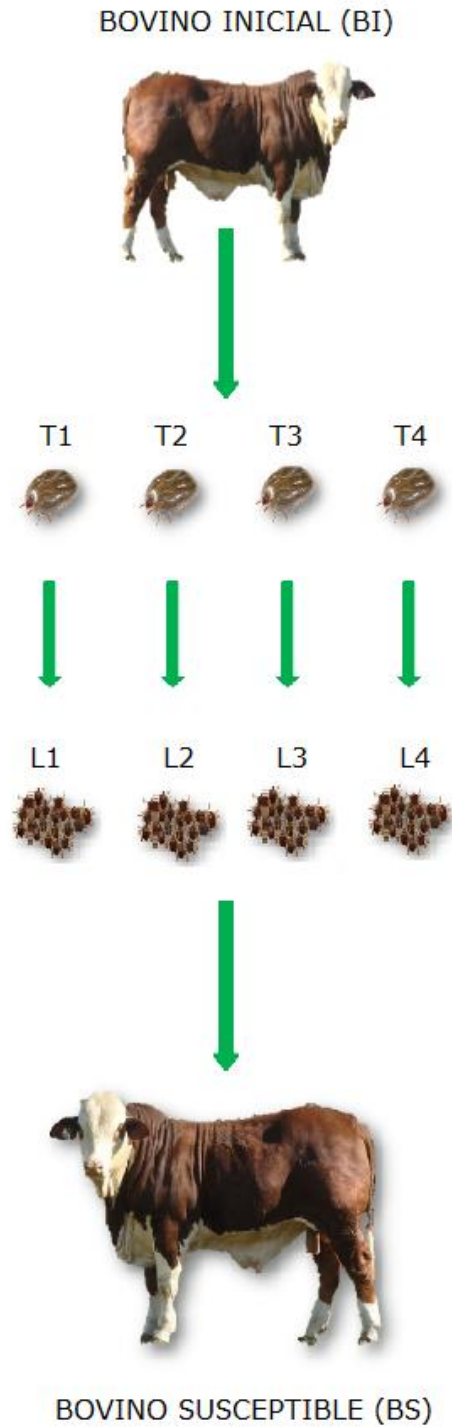


Figura 34. Esquema propuesto para realizar el experimento de transmisibilidad de *A. marginale* utilizando larvas de *R. microplus* infectadas. BI: bovino inicial del cual se obtuvieron las teleoginas infectadas. T1 a T4: teleoginas infectadas de las cuales se obtuvieron larvas positivas a *A. marginale*. L1 a L4: *pooles* de larvas infectados con *A. marginale* utilizados para infestar el bovino susceptible. BS: bovino susceptible.

Para tal fin se utilizó un ternero de raza Hereford, esplenectomizado el cual fue vacunado contra *B. bovis* y *B. bigemina*, 5 y 2 meses antes de la infestación experimental respectivamente.

El proceso de infestación se llevó a cabo en una manga de manejo de bovinos que conecta con un corral especialmente acondicionado para el experimento. El mismo, consistió en un recinto rectangular de dos metros de ancho por cuatro metros de largo y dos metros de altura, con piso de cemento, canaletas para permitir la evacuación de líquidos, dos mangas de manejo, amarras en las paredes y techo y paredes de malla metálica para evitar el ingreso de posibles vectores y roedores (Figura 35). Una vez en la manga, se procedió a rasurar 4 circunferencias de aproximadamente 12 cm de diámetro en el lomo del bovino, dos a cada lado de la columna vertebral, (Figura 36). Luego, se colocó en cada circunferencia un tubo de tela que se adhirió en un extremo a la piel del bovino utilizando un adhesivo instantáneo (Figura 36a). Se utilizaron larvas provenientes de cuatro teleoginas a fin de tener un volumen final de larvas que cuyo inóculo resultara suficiente para reproducir la infección en el bovino susceptible (Figura 34).

Empleando un pincel, se retiraron las larvas (L1 -L4) del tubo donde fueron incubadas y se colocaron sobre la piel del bovino, dentro de la circunferencia delimitada por la manga de tela (Figura 36b-c). Cada *pool* de larvas se colocó dentro de una manga distinta. Luego, se cerró el tubo en el extremo libre con un nudo de cinta de tela, a fin de evitar la salida de larvas no adheridas al bovino y poder controlar diariamente el estado de desarrollo de las mismas.

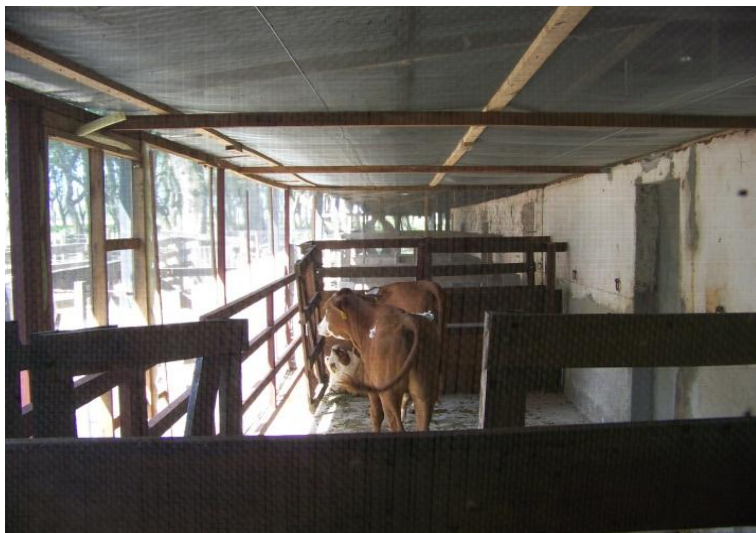


Figura 35. Recinto acondicionado para el experimento de infestación.

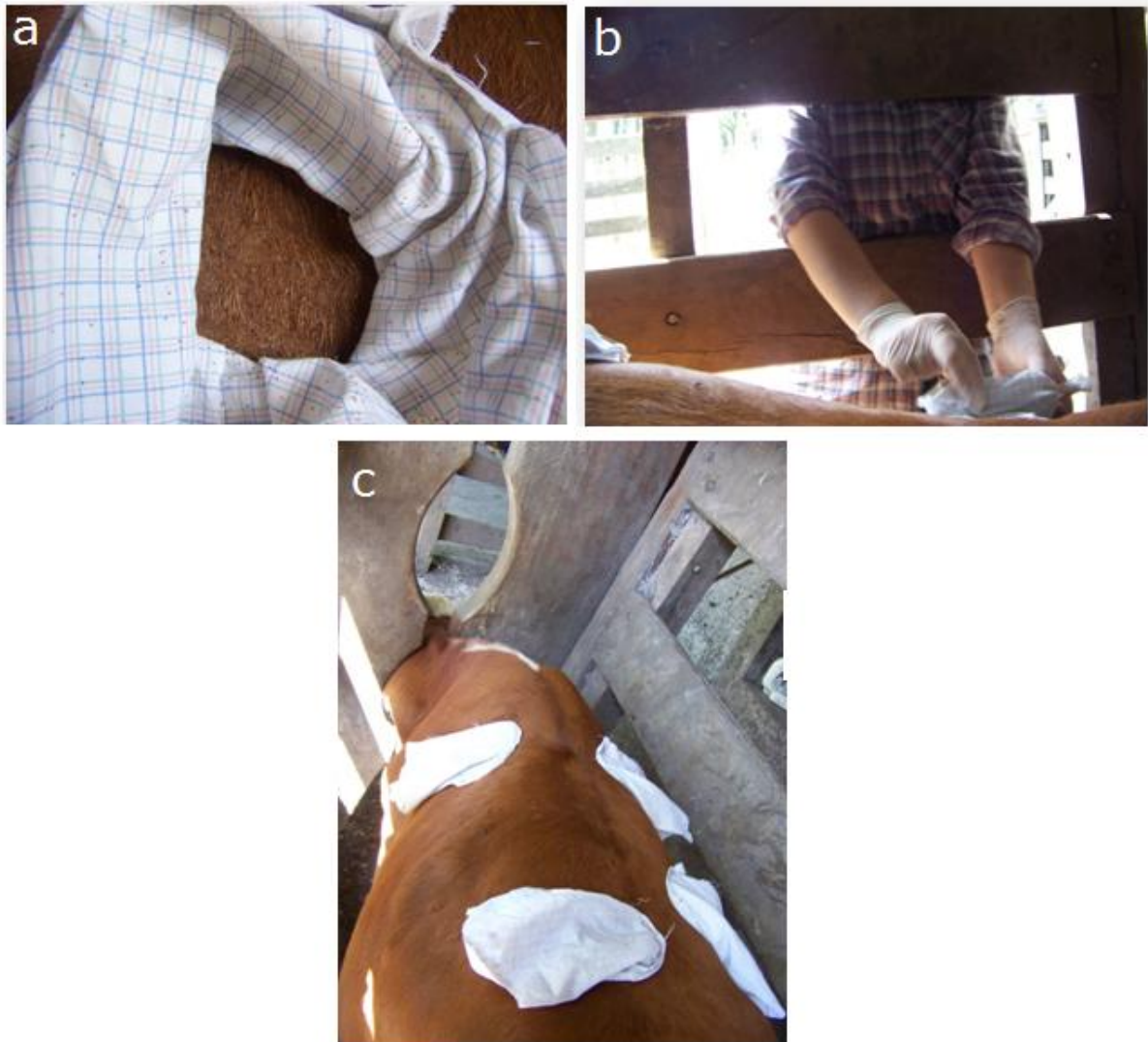


Figura 36. Proceso de infestación de bovino.

El ternero infestado fue monitoreado semanalmente mediante la medición de temperatura rectal, hematocrito y extendido sanguíneo durante un período de 35 días. Además se extrajo sangre para análisis molecular y serológico en cada instancia de monitoreo, a fin de determinar la existencia y eventual desarrollo de la infección con *A. marginale*.

Las muestras de sangre fueron procesadas tal como se describe en la sección 2.2.2. del capítulo 2.

2.5. Caracterización molecular de las cepas de *A. marginale* en todas las instancias del ensayo de transmisibilidad

2.5.1. PCR para genotipificación de *A. marginale*

Para genotipificar los distintos aislamientos de *A. marginale*, se amplificó una región del gen que codifica para la proteína mayor de membrana MSP1a.

Como se mencionó anteriormente, MSP1a está codificada por un gen de copia única, y su peso molecular es inconstante entre aislamientos debido a que su estructura comprende un número variable de repeticiones de 28-29 aminoácidos en tándem en la porción amino terminal.

El gen *msp1a* se amplificó por PCR utilizando los cebadores que se detallan en la tabla 12:

Forward: 5'- GCATTACAACGCAACGCTTGAG-3'
Reverse: 5'- GCTTTACGCCGCCGCTGCGCC -3'

Tabla 12. Cebadores utilizados para amplificar el gen marcador de genotipo *msp1a*

La reacción se realizó en un volumen de 50 µl que contenía 0,4 µmol de cada cebador, 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (INBIO), 1,25 U de ADN polimerasa GoTaq (Promega), 10 µl de Buffer de PCR 5X y aproximadamente 200 ng de ADN genómico. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Bio-Rad MyCycler Thermal Cycler) con el siguiente programa (Tabla 13):

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	3 min	1
95°C	30 s	35
60°C	45 s	
72°C	1 min	
72°C	10 min	1

Tabla 13. Programa de ciclos para los dos pasos de amplificación del gen *msp1a*

Algunas de las muestras presentaron dificultad para ser amplificadas utilizando los cebadores antes mencionados, por lo cual se realizó un nuevo diseño de cebadores, con el fin de amplificar un fragmento más pequeño conteniendo las repeticiones en tándem de MSP1a.

Los cebadores diseñados se presentan en la tabla 14 y el programa de ciclado fue el mismo que se utilizó en el diseño anterior (Tabla 13).

Forward: 5'- TGCATTACAACGCAACGCTT-3'
Reverse: 5'- CTCAACTCGCAACCTTGG-3'

Tabla 14. Cebadores diseñados para amplificar un fragmento del gen marcador de genotipo *msp1a*.

Se analizaron cinco microlitros de cada producto amplificado por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se usó un marcador de tamaño molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) para determinar el tamaño del producto de PCR. Los 45 µl restantes de los productos amplificados se purificaron por precipitación con 11,25 µl de EDTA 125 mM y 135 µl de etanol absoluto, centrifugación a 10.000 g, precipitación con etanol al 70% y resuspensión en agua pura.

2.5.2. Purificación de los productos de PCR

Para aquellas reacciones en las que fue necesario purificar una banda de amplificación a partir del gel de agarosa, se seccionó el área correspondiente a la misma con un bisturí, se colocó en un tubo tipo eppendorf de 1,5 ml y se purificó siguiendo las instrucciones del kit comercial utilizado (EasyPure Quick Gel Extraction Kit, TRANS). El ADN purificado se eluyó en un volumen de 30 µl de agua libre de nucleasas y se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1.000.

2.5.3. Clonado de fragmentos génicos

Para clonar los fragmentos de interés, se utilizaron entre 1 y 3 µl del producto de PCR (según su concentración) y se ligaron con 1 µl del vector pGEM®-T Easy Vector (Promega Corporation), el cual contiene un gen de resistencia a ampicilina, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Luego, el volumen total de esta reacción (10 µl) fue utilizado en la transformación de bacterias *E. coli* competentes.

2.5.4. Transformación de bacterias *Escherichia coli* competentes

Se utilizaron bacterias competentes *E. coli* DH5 α obtenidas según el protocolo de (Sambrook et al., 1989), que se transformaron según el siguiente protocolo:

1. Se tomó una alícuota de 50 μ l de bacterias competentes y se colocaron en un tubo tipo *eppendorf* en hielo. Luego, se agregaron los 10 μ l provenientes de la ligación y se dejó reposar en hielo durante 1 hora.
2. Transcurrido ese tiempo, se llevó la suspensión de bacterias y ADN a 42°C durante 90 segundos.
3. Luego, se colocó el tubo nuevamente en hielo durante 5 minutos.
4. Se agregó a la suspensión 200 μ l de medio Luria Bertani (LB) sin antibiótico y se llevó a 37°C, a agitación a 450 rpm durante 1 hora.
5. Luego, se sembró la suspensión en una placa de Petri conteniendo LB sólido con Ampicilina (250 μ g/ml) en la que previamente se habían colocado 50 μ l de X-Gal³ 50 mg/ml (Promega), dispersado con rastrillo de vidrio.
6. Finalmente, se colocó la placa a 37°C durante 18 horas.

Fue posible identificar las colonias transformadas debido a que el sitio de inserción del fragmento de ADN foráneo interrumpe el marco de lectura de la secuencia que codifica la enzima β -Galactosidasa. Si el vector no incorporó la secuencia foránea, el gen *LacZ α* se expresa y la enzima β -Galactosidasa es sintetizada. En presencia de X-Gal, la escisión de este sustrato por parte de la enzima produce un producto insoluble color azul, de manera que las colonias conformadas por estas bacterias se visualizan de este mismo color. En cambio, los vectores que incorporaron el ADN foráneo sufren un cambio en el marco de lectura del gen *LacZ α* , por lo que la enzima β -Galactosidasa no se sintetiza y las colonias resultantes de estas bacterias se presentan incoloras o blancas (Watson y col, 1992).

³ X-Gal es el sustrato de la enzima β -Galactosidasa codificada por el gen *LacZ α* presente en el vector pGEM®-T Easy Vector y se utiliza como indicador de las colonias que incorporaron el fragmento de ADN foráneo al plásmido vector.

2.5.5. Purificación de ADN plasmídico y análisis por restricción

Se procedió a la extracción del ADN plasmídico a partir de un pellet obtenido por centrifugación de 5 ml del cultivo líquido bacteriano. Luego, se utilizó el kit comercial Wizard *Plus* SV Minipreps (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido purificado se eluyó en 40 µl de agua libre de nucleasas.

Se verificó la presencia del inserto en el plásmido mediante digestión enzimática con la enzima de restricción EcoRI (Promega), ya que el vector pGEM®-T Easy Vector posee 2 sitios de restricción para esta enzima flanqueantes al sitio de inserción del fragmento a clonar. El protocolo de restricción se realizó según las indicaciones del fabricante en un volumen final de 20 µl. La digestión se incubó a 37°C en un termobloque durante 2 horas, luego de las cuales el volumen total de la digestión se sembró en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio junto con el marcador de peso molecular 1Kb Plus. El gel se observó en el transiluminador y se verificó la presencia del fragmento clonado y digerido al hallarse una banda del tamaño del producto de PCR. Se secuenciaron todos los clones positivos a la digestión.

2.5.6. Secuenciación y análisis de las secuencias

Los clones positivos fueron enviados a la Unidad de Genómica/Nodo Plataforma de Genómica CATG del Instituto de Biotecnología del CICVyA-INTA, el cual cuenta con un secuenciador 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). El protocolo de secuenciación se basa en la reacción de Sanger y aprovecha la capacidad de la ADN polimerasa de incorporar análogos de las bases nucleotídicas. El equipo BigDye® Terminator provee ddNTPs marcados con cuatro colorantes fluorescentes diferentes, los cuales se agregan secuencialmente a los cebadores durante el ciclo de la reacción de secuenciación. Los fragmentos de ADN fueron secuenciados utilizando los cebadores universales T7 y SP6. Se solicitó la secuenciación de ambas hebras complementarias del producto de amplificación para la posterior obtención de una secuencia consenso a fin de lograr una mayor confiabilidad de la secuencia de la región estudiada.

Para el ensamblado manual de las secuencias complementarias de cada fragmento se utilizó el programa Vector NTI® versión 10.3.0. Se construyeron los contigs, se verificó manualmente la calidad del electroferograma y se visualizaron los picos para corroborar la correcta asignación de bases en las posiciones dudosas. Finalmente el archivo con el contig se convirtió a un archivo de texto con formato FASTA para su posterior análisis.

Las secuencias de nucleótidos fueron traducidas a aminoácidos mediante la herramienta de traducción del portal ExPASy del *Swiss Institute of Bioinformatics* (<https://web.expasy.org/translate/>). Las secuencias aminoacídicas obtenidas se procesaron a fin de hallar la región de repeticiones en tándem presentes en la secuencia de MSP1a. Para ello, se recopiló de la bibliografía las repeticiones reportadas (de la Fuente et al., 2007; Ruybal et al., 2009), con las que se armó una base de datos en Excel, a fin de facilitar la identificación de las repeticiones en las secuencias. Estas repeticiones se nombran, según su secuencia aminoacídica, con letras del alfabeto castellano, griego y con números. Los genotipos hallados que no se encontraban descritos en la literatura consultada, fueron nombrados con una letra x (equis) seguida de un número que permitiera identificarla.

3. RESULTADOS

3.1. Detección de hemoparásitos en bovinos

El diagnóstico por PCR de los hemoparásitos *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* fue positivo para los 26 bovinos de zona endémica analizados en este experimento. Asimismo, la detección de los anticuerpos específicos por ELISA resultó positiva para todos los bovinos.

3.2. Detección de *A. marginale* por PCR en larvas de *R. microplus*

Dado que el objetivo de este trabajo fue obtener larvas positivas para *A. marginale*, se procedió en primer lugar a realizar *pooles* de aproximadamente 200 larvas desovadas por la misma teleogina, a fin de verificar la existencia de infección. El primer diagnóstico se realizó sobre doce *pooles* (L1-L12) pertenecientes a doce teleoginas distintas (T1-T12).

En una primera reacción de PCR para amplificación del gen *msp1b*, no se observaron resultados positivos, por lo que se procedió a realizar una adaptación de una *booster* PCR. A partir de esta última reacción, se obtuvieron resultados positivos para todas las larvas analizadas. Este diagnóstico se confirmó mediante la reacción de amplificación del gen *msp5*, la cual también resultó positiva para todos los ejemplares.

3.3. Observación microscópica de hemolinfa de *R. microplus*

La observación por microscopía óptica de la hemolinfa de estas teleoginas, arrojó resultados negativos tanto para bacterias como para otros hemoparásitos.

3.4. Detección de *A. marginale* por PCR en teleoginas de *R. microplus*

Una vez terminado el proceso de desove, se procesaron las garrapatas T1 a T4 (provenientes del mismo bovino inicial, BI) (Figura 34) y se diagnosticaron para *A. marginale* mediante la amplificación de los dos genes mencionados. Los cuatro ejemplares fueron positivos para *A. marginale* mediante las dos técnicas.

Además, estos cuatro ejemplares fueron positivos para el diagnóstico por PCR de *B. bovis* y *B. bigemina* mediante la amplificación de los respectivos genes *vesa1*, por lo que se analizaron los *pooles* de larvas obtenidos de estas teleoginas, de los cuales dos de cuatro fueron positivos para *B. bovis* (L1 y L2) y uno de ellos positivo para *B. bigemina* (L4).

3.5. Detección de *A. marginale* en el bovino infestado

Al cabo de 22 días (semana 3) post infestación, durante el análisis semanal de rutina, se detectó *A. marginale* en un frotis realizado con de sangre extraída de la vena yugular (Figura 37). El valor del hematocrito evaluado ese día fue de 27%, y la temperatura rectal de 39°C. En la tabla 14 se muestran los valores evaluados a lo largo del experimento.

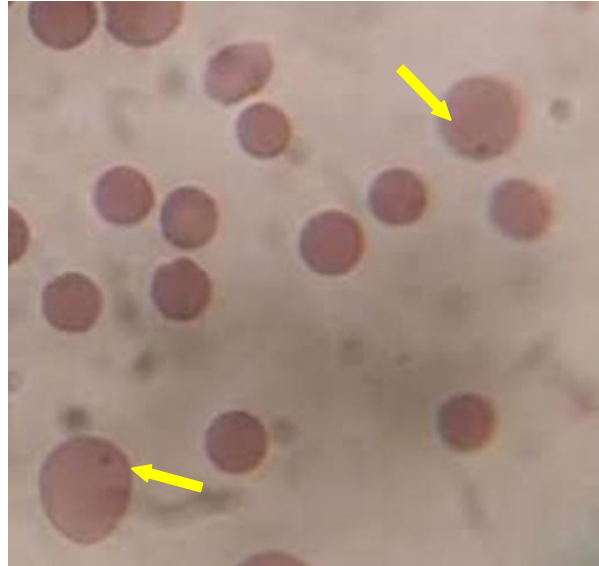


Figura 37. Extendido sanguíneo del bovino infestado en el que se observan eritrocitos conteniendo corpúsculos compatibles con *A. marginale* (flechas amarillas)

Semana	Temperatura rectal	Hematocrito
0	38.5	28
1	38.7	32
2	39.1	30
3	39	27
4	38.5	24
5	38.9	21

Tabla 14. Se muestran los valores de temperatura rectal y hematocrito evaluados en el bovino infestado. En gris, se resaltan los valores detectados el día 22 post infestación.

A partir de este resultado, se realizó diagnóstico de *A. marginale* por PCR de los dos genes descritos, cuyos resultados confirmaron la infección por *A. marginale* (Figuras 38 y 39).

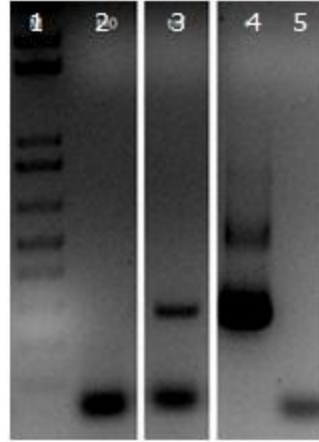


Figura 38. Corrida electroforética de la reacción de amplificación del gen *msp1b* de *A. marginale* en el bovino infestado con larvas de *R. microplus*. Calle 1: marcador de tamaño molecular. Calle 2: infección a tiempo inicial. Calle 3: infección al día 22. Calles 4 y 5: controles positivo y negativo respectivamente.

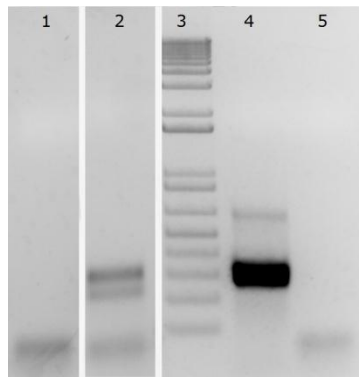


Figura 39. Corrida electroforética de la reacción de amplificación del gen *msp5* de *A. marginale* en el bovino infestado con larvas de *R. microplus*. Calle 1: infección a tiempo inicial. Calle 2: infección al día 22. Calle 3: marcador de tamaño molecular. Calles 4 y 5: controles positivo y negativo respectivamente.

Luego de la semana 5 de control de la infección, se recuperaron aproximadamente 200 teleoginas desarrolladas a partir de las larvas usadas para infestar el bovino susceptible.

3.5.1. Genotipos de *A. marginale* en los distintos estadios involucrados en el proceso de infección

A partir de la amplificación del gen *msp1a* en todos los estadios involucrados (bovino inicial BI, teleoginas T1-T4, larvas L1-L4 y bovino susceptible BS) se obtuvieron las secuencias de los genotipos de MSP1a. Este proceso presentó dificultades a la hora de amplificar determinadas muestras, dada la labilidad del material genético de teleoginas y larvas.

A partir de las secuencias de los productos de amplificación del gen *msp1a*, se obtuvieron los genotipos de cada muestra. A continuación (Tabla 15) se detallan los genotipos encontrados en todas las muestras involucradas en el proceso de transmisión de *A. marginale* al bovino susceptible según lo descrito en la figura 34.

BI							*
45	18	18	13	18			
10	10						
10	X2	12					
Γ	X5	10					
τ	X2	12					x5
τ	10	11					
τ	X7	β	X1				
τ	11	10	15				
α							
α	β	F					
α	β	β					
α	β	β	X1				x5
α	β	β	X6				
α	β	β	Γ				x2
α	β	X4	Γ				
α	X3	10	15				
α	β	β	β	Γ			
α	β	β	β	X10			
α	β	X9	β	F			
α	β	β	β	F			
α	β	β	β	β	Γ		x2
α	β	β	X11	X11	3	Γ	
T1							
τ	11	10	15				
α	β	β	X8				
α	β	β	10				
α	β	β	Γ				x2
T2							
13	27						
τ	10	10					
τ	X2	12					
13	18	18	13	18			
α	β	β	β	Γ			
α	β	β	β	β	X9		
F	M	M					
T3							
13	27						
α	β	β	X6				
T4							
L1							
13	27						
L2							
13	27						x5
L3							
τ	10	10					
L4							
13	27						
BS							
10	11						
τ	X2	12					x2
α	β	β	Γ				x2

Tabla 15. Genotipos encontrados en todas las muestras involucradas en el proceso de transmisión de *A. marginale* al bovino susceptible. (*) indica la cantidad de secuencias idénticas obtenidas para cada muestra. En amarillo y naranja se destacan los genotipos hallados tanto en el bovino inicial como en teleoginas y en el bovino susceptible. En tonos de verde se destacan los genotipos hallados en teleoginas y larvas.

Como se observa en la tabla 15, los genotipos τ -X2-12 y α - β - β - Γ se encuentran en el bovino inicial, en las teleoginas colectadas sobre el mismo y en el bovino susceptible y no en las larvas. Los genotipos 13-27 y τ -10-10 se encuentran en teleoginas y larvas, y no en el bovino inicial ni en el bovino susceptible.

Se observa también una gran diversidad de genotipos en el bovino inicial (22 en total), conformados por 22 repeticiones distintas. Estos genotipos están conformados por un número variable de repeticiones, con un mínimo de una (α) y un máximo de 7 (α - β - β -X11-X11-3- Γ). Por otra parte, en las teleoginas se observa una menor cantidad de genotipos distintos (12) y de repeticiones involucradas (16). Se observa también que algunos genotipos hallados en las teleoginas, no fueron hallados en el bovino inicial, como por ejemplo α - β - β -X8, α - β - β -10, 13-18-18-13-18, α - β - β - β -X9 y F-M-M.

Por último, en las larvas se hallaron hasta el momento dos genotipos distintos, 13-27 y τ -10-10, los cuales fueron hallados también en teleoginas.

3.6. Detección de *A. marginale* en hemolinfa de *R. microplus*

El análisis de hemolinfa de teleoginas de *R. microplus* a partir de la amplificación del gen *msp1b* fue positivo para una muestra (Figura 40). La presencia de la bacteria en la hemolinfa de la hembra de *R. microplus* es condición necesaria para infectar otros órganos, tales como los ovarios.

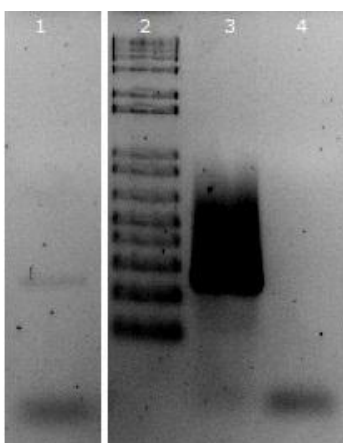


Figura 40. Corrida electroforética de la reacción de amplificación del gen *msp1b* de *A. marginale* en la hemolinfa de teleoginas de *R. microplus*. Calle 1: muestra de hemolinfa positiva a *A. marginale*. Calle 2: marcador de tamaño molecular. Calles 3 y 4: controles positivo y negativo respectivamente.

3.7. Detección de *A. marginale* en órganos de *R. microplus*

El diagnóstico de *A. marginale* por PCR del gen *msp1b* fue positivo en glándulas salivales e intestinos de teleoginas de *R. microplus*. En la figura 41 se observa la corrida electroforética en donde identifican bandas positivas para *A. marginale* en 2 glándulas salivales (GS1 y GS3) y en dos ovarios (OV3 y OV6) pertenecientes a tres teleoginas distintas (Te1, Te3, Te6).

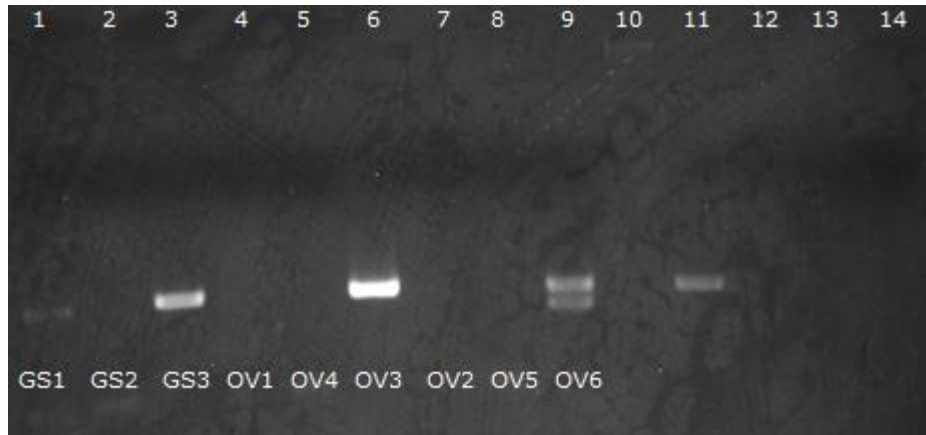


Figura 41. Corrida electroforética en gel de agarosa 2%, donde se observan bandas producto de la amplificación del gen *msp1b* de *A. marginale*. Calles 1 a 3: glándulas salivales de teleoginas de *R. microplus*. Calles 4 a 9: ovarios de teleoginas de *R. microplus*. Calle 10: marcador de tamaño molecular. Calles 11 y 14: controles positivo y negativo respectivamente.

Este hallazgo es de relevancia ya que, a pesar de que en machos había sido descrita la presencia de *A. marginale* en glándulas salivales, no estaba reportada la presencia de la bacteria en el ovario de la teleogina. Se destaca la importancia de este evento, dado que la presencia de la bacteria en este órgano es condición previa necesaria para la infección del mismo y, en consecuencia, la transmisión a la descendencia.

4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este capítulo revelan aspectos importantes de la epidemiología de *A. marginale*. Por medio de los ensayos realizados, se comprobó la ocurrencia de la transmisión transovárica en teleoginas de *R. microplus*, destacando la relevancia de esta especie de garrapatas en el ciclo biológico de *A. marginale*.

Se logró, a partir de un bovino naturalmente infectado con *A. marginale*, obtener teleoginas de *R. microplus* positivas por PCR para esta bacteria, a partir de las cuales se obtuvieron, *in vitro*, larvas infectadas que fueron capaces de transmitir *A. marginale* a un bovino susceptible. Si bien anteriormente Shimada y colaboradores (Shimada et al., 2004) lograron obtener larvas de *R. microplus* infectadas con *A. marginale*, tanto en condiciones naturales (colectadas de pasturas) como *in vitro* (incubadas a 18°C), no lograron reproducir la infección en un bovino sano.

Luego de la semana 5 de control de la infección, se recuperaron aproximadamente 200 teleoginas desarrolladas a partir de las larvas usadas para infestar el bovino susceptible. Este resultado refleja el número aproximado de larvas de *R. microplus* que lograron alimentarse y culminar su ciclo en el bovino.

Además, a fin de estudiar la distribución de la bacteria en la garrapata, se analizaron distintos órganos de teleoginas, lo que permitió identificar ADN de *A. marginale* en glándulas salivales y ovarios. La presencia de la bacteria en este último órgano es la condición previa necesaria para la transmisión a la descendencia. Estos resultados refuerzan lo postulado por Brayton (Brayton, 2012), quien propuso que la transmisión de *A. marginale* requiere invasión y replicación eficiente en los tejidos de la garrapata. Por otra parte, se detectó la presencia de *A. marginale* en muestras de hemolinfa obtenidas de teleoginas infectadas, lo cual explica el acceso de la bacteria al resto de los órganos.

En conjunto, estos resultados explicarían el por qué un garrapata de ciclo monoxénico puede ser responsable de la gran distribución de la anaplasmosis. Si bien se propuso que en la epidemiología de *A. marginale*, la transmisión mecánica por tábanos era responsable de la amplia distribución de la anaplasmosis, la información disponible es poco concluyente. A pesar de que Hornok y colaboradores (Hornok et al., 2008) detectaron ADN de *A. marginale* en las piezas bucales de 4 ejemplares hembras de *Tabanus bovinus*, un trabajo reciente de Gall y colaboradores (Gall et al., 2016), en el que se lleva a cabo un experimento de transmisibilidad de *A. marginale* por diversos vectores, concluyen que la transmisión biológica por garrapatas es al menos dos órdenes de magnitud más eficiente que la transmisión mecánica por tábanos. Sumado a esto, se conoce que la dinámica de alimentación de las hembras de tábanos ocurre

cada tres a cuatro días, período muy largo para la supervivencia de cualquier agente infeccioso transmitido mecánicamente (Hawkins 1982). Sin embargo, el evento de alimentación del tábano es tan doloroso que es usualmente interrumpido por el hospedero, lo que generaría el movimiento del tábano hacia un nuevo individuo favoreciendo la transmisión de patógenos (Hornok et al., 2008).

Los trabajos previos que intentaron evaluar la transmisión transovárica de *A. marginale* en garrapatas monoxénicas, concluyeron que este fenómeno no ocurría en las condiciones en las que fueron evaluadas (Connell and Hall, 1972; Gonçalves Ruiz et al., 2005). Dado que en este tipo de transmisión intervienen muchos factores, es posible que los escenarios evaluados no hayan sido los óptimos. Un aspecto a ser considerado es la cepa de *A. marginale* utilizada, ya que se conoce que no todas son transmisibles por garrapatas con la misma eficiencia (De la Fuente et al., 2003). Otro aspecto está asociado a las condiciones ambientales para el desove de las teleoginas, ya que no todas las temperaturas de incubación son propicias para el desarrollo de la bacteria en la descendencia. Shimada y colaboradores (Shimada et al., 2004) incubaron teleoginas a 18°C y a 28°C, y no obtuvieron larvas infectadas a esta última temperatura. Otro aspecto que podría impedir el avance de la infección de la progenie es el fenómeno de interferencia, en el cual la presencia de un microorganismo evita la transmisión vertical de otro cuando se encuentran coinfectando un mismo hospedero. Por ejemplo, (Azad and Beard, 1998) observaron que garrapatas del género *Dermacentor* infectadas por *Rickettsia peacockii*, no fueron capaces de transmitir transovaricamente *Rickettsia rickettsii* a su progenie. Este fenómeno también fue observado por Macaluso y colaboradores para las especies *Rickettsia montana* y *R. rhipicephali* (Macaluso et al., 2002) y por Rudakov y colaboradores (Rudakov et al., 2003) quienes concluyeron que la interferencia resultaría más habitual entre endosimbiontes con nichos similares. En este trabajo de tesis, algunas larvas utilizadas para propagar la infección en el bovino susceptible estaban coinfectadas con parásitos del género *Babesia*, por lo que una hipótesis a evaluar a futuro sería el efecto de la coinfección con otros organismos, ya que los mismos impactan diferencialmente en el sistema inmunológico de la garrapata (Rosa et al., 2016).

Otro punto relevante de este trabajo, es el estudio de los genotipos de *A. marginale* involucrados a lo largo del proceso de infección. Este tipo de análisis, no ha sido realizado hasta el momento y aporta información clave acerca de la dinámica de la transmisión.

Uno de los principales hallazgos fue la presencia de una gran diversidad de genotipos coinfectando al bovino de zona endémica. Si bien se han reportado coinfecciones con distintas variantes de *A. marginale* (Vallejo Esquerro et al., 2014), a la fecha ningún trabajo evidenció una diversidad tan alta generada por más de 20 genotipos. Además, se observó que el análisis de nuevos clones implicó la detección de nuevas variantes por lo que se concluye que no se llegó a saturar el hallazgo de nuevos genotipos.

Algunas de estas variantes encontradas en el bovino, se hallaron también en las cuatro teleoginas colectadas sobre el mismo, siendo menor la cantidad de genotipos en estas últimas. A pesar de haberse diseñado nuevos cebadores, no fue posible identificar el o los genotipos presentes en una de las teleoginas. En el caso de las larvas, los cuatro *pooles* analizados fueron positivos para, al menos, un genotipo (Tabla 15).

De todos los genotipos identificados, uno (13-27) se halló en dos teleoginas (T2 Y T3) y en tres grupos de larvas (L1, L2 Y L4) (Tabla 15 y Figura 34). Este genotipo no fue encontrado hasta el momento ni en el bovino naturalmente infectado de zona endémica ni en el bovino esplenectomizado e infestado en este experimento. Otros dos genotipos (τ -X2-12 y α - β - β - Γ) se hallaron en el bovino naturalmente infectado, en una teleogina (cada uno en una distinta) y en el bovino susceptible infestado.

La identificación del mismo genotipo (13-27) en teleoginas y larvas, permitió corroborar la transmisión transovárica de *A. marginale* en *R. microplus*. Este resultado demuestra inequívocamente que *A. marginale* es capaz de alcanzar los ovarios de la teleogina, infectarlos y pasar a la descendencia, generando larvas infectadas con la bacteria.

Por otra parte, el hallazgo de los genotipos τ -X2-12 y α - β - β - Γ en el bovino infectado naturalmente, en una teleogina y en el bovino susceptible permitió describir el ciclo completo de la bacteria, incluyendo a los estadios larvales de la garrapata *R. microplus* como vector competente.

A pesar de no haberse encontrado hasta el momento estos últimos genotipos en las larvas, el hallazgo de los mismos en el bovino esplenectomizado, solo se explicaría a través de la transmisión transovárica en la garrapata.

De la Fuente y colaboradores (De la Fuente et al., 2003), luego de analizar proteínas recombinantes de MSP1a en cultivos de células de garrapatas, propusieron que el aminoácido ubicado en la posición 20 de la repetición, era determinante para la unión del péptido a la célula. Según sus resultados, los péptidos que contienen los aminoácidos ácido aspártico y ácido glutámico en la posición 20 se adhieren al extracto

de células de garrapata, en cambio los péptidos conteniendo glicina en dicha posición, no serían capaces de adherirse. Sin embargo, los resultados en esta tesis muestran el hallazgo de genotipos de MSP1a que contienen glicina en la posición 20 (τ -10-10) tanto en larvas como en teleoginas, de manera que este no sería el único determinante en la adhesión de *A. marginale* a la célula de garrapata. Según Noh y colaboradores (Noh et al., 2016), la interacción entre *A. marginale* y la garrapata es compleja, y la infección de la bacteria a la garrapata depende de muchos factores, tales como el tiempo de adquisición entre una cepa y otra y el estado inmunitario del vector. Inclusive, se han documentado diferencias significativas entre las estructuras de cepas de *A. marginale* de zonas templadas y zonas tropicales (Castañeda-Ortiz et al., 2015; Vallejo Esquerria et al., 2014).

En el contexto del experimento de transmisibilidad de *A. marginale* por garrapatas *R. microplus*, se analizó la hemolinfa de las teleoginas colectadas con el fin de evaluar la presencia de las bacterias, ya que este fluido es el medio por el cual los microorganismos acceden a las glándulas salivales de las garrapatas.

El resultado de una primera observación microscópica reveló la presencia de hemoparásitos no reportados en la zona, cuya morfología se correspondía con tripanosomátidos. Los mismos, luego del diagnóstico inicial, se caracterizaron molecularmente. A continuación, se presenta el trabajo realizado.

Capítulo 3:
***Trypanosoma spp.* en**
garrapatas *R. microplus* de la
región del NEA

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Tripanosomas bovinos

Las condiciones eco-epidemiológicas que favorecen el desarrollo de las garrapatas también son propicias para la presencia de otros artrópodos vectores tales como tábanos, principales vectores de distintas especies de tripanosomas, que causan la tripanosomiasis bovina.

El género *Trypanosoma* pertenece al orden Kinetoplastida, el cual incluye especies parásitas y de vida libre (Field and Carrington, 2009). Comprende flagelados unicelulares que parasitan todo tipo de vertebrados (Thekiso et al., 2007) y que se caracterizan por tener una organela particular llamada kinetoplasto (Simpson et al., 2003) que contiene ADN mitocondrial condensado, formando una red de moléculas interconectadas de distinto tamaño (Wilkowsky, 2018).

Los tripanosomas que pertenecen a la sección Stercoraria se desarrollan en la parte posterior del tracto digestivo del insecto vector y se transmiten por la contaminación de las heces en contacto con la piel y mucosas del hospedero y, aquellos que pertenecen a la sección Salivaria, se desarrollan en la parte anterior del tracto digestivo del vector, pasan a la saliva y se inoculan al hospedero durante la alimentación (Wilkowsky, 2018). Estos últimos son usualmente transmitidos por moscas del género *Glossina*, llamadas comúnmente moscas tsé tsé (Donelson, 2003; Ravel et al., 2003; Stevens and Brisse, 2004). En Sudamérica, donde la mosca tsé tsé no está presente, los tripanosomas se adaptaron a la transmisión mecánica por otros artrópodos hematófagos de los géneros *Tabanus* y *Stomoxys* (Gardiner and Wilson, 1987; Osório et al., 2008; Otte and Abuabara, 1991; Sumba et al., 1998).

La importancia de la tripanosomiasis está en aumento en América del Sur a partir del reporte en los últimos años de varios casos en animales domésticos y salvajes, lo que implica un riesgo mayor para la producción ganadera (Dávila and Silva, 2000). En particular, en Argentina, ya han sido descritos tripanosomas en búfalos de agua (Monzón et al., 2010) y brotes de tripanosomiasis equina en la provincia de Formosa (Monzón et al., 1995). Recientemente, en la provincia de Santa Fe, fue reportada la muerte de bovinos de tambo ocasionada por *T. vivax* (Senasa Comunica, 2017. <http://www.senasa.gob.ar/senasa-comunica/repercusiones/francisco-dalessio-en-telam-radio>).

A pesar de que los tripanosomas son organismos extracelulares que se encuentran en el torrente sanguíneo, la respuesta inmune del hospedero es la responsable de los signos clínicos asociados a la infección. Las especies patógenas que más

frecuentemente infectan al ganado son *Trypanosoma vivax* y *T. evansi*; una tercera especie, *T. theileri* no es considerada patogénica a menos que se encuentre asociada a otros parásitos (Villa et al., 2008).

Trypanosoma vivax infecta un amplio rango de animales domésticos y silvestres y causa importantes pérdidas económicas en ganado de áreas tropicales de África y Centro y Sud América (Gardiner and Wilson, 1987; Osório et al., 2008). Los signos clínicos incluyen fiebre, anemia, inapetencia, reducción en la producción de leche, pérdida de peso, abortos y ocasionalmente la muerte, aunque algunos animales infectados pueden cursar como asintomáticos (Cadioli et al., 2012)

Trypanosoma evansi es, de los tripanosomas patógenos, el de mayor distribución geográfica a nivel mundial. Posee un amplio rango de hospedadores, los cuales difieren en su susceptibilidad a la infección, con signos clínicos variables según la especie y la región geográfica (Desquesnes et al., 2013) los cuales incluyen fiebre, hemorragias, anemia, pérdida de peso y altas tasas de mortalidad (Magona 2008, Dávila and Silva, 2000). En Sudamérica, *T. evansi* infecta caballos, ganado, perros, búfalos de agua y un amplio rango de mamíferos silvestres (Dávila and Silva, 2000; Desquesnes, 2004; Franke et al., 1994; Herrera et al., 2005) y puede ser transmitido de diversas formas, a través de insectos mordedores, picadores, murciélagos hematófagos; puede existir transmisión vertical e iatrogénica, entre otras (Desquesnes et al., 2013).

Por último, *Trypanosoma theileri* ha sido descrito en varios países, y es comúnmente considerado no patogénico, aunque algunos autores han asociado signos clínicos tales como diarrea y anemia en ganado infectado con este parásito (Doherty et al., 1993; Ward et al., 1984). El ciclo de vida de este tripanosoma en su hospedero mamífero no se halla bien descrito aunque se conoce, por ejemplo, que la infección de *T. theileri* en búfalos machos persiste durante muchos años sin efectos nocivos reconocidos. A pesar de ser uno de los tripanosomas de mamíferos más grandes, con un largo medio de 60-70 μm (Stevens and Brisse, 2004), la mayoría de las infecciones son subpatentes y son difíciles de detectar en frotis sanguíneos, por lo que se requiere de técnicas moleculares para su diagnóstico (Villa et al., 2008).

Si bien hasta el momento la transmisión de estos tripanosomas por moscas y tábanos de los géneros ya mencionados es la que se reconoce como preponderante, se ha reportado la presencia de tripanosomas en garrapatas de los géneros *Hyalomma* (el Kady, 1998; Morzaria et al., 1986), *Rhipicephalus* (Martins et al., 2008) e *Ixodes* (Austen et al., 2011). En el caso de *T. theileri*, también se sugirió la posible participación de garrapatas como vectores. Burgdorfer y colaboradores (Burgdorfer et

al., 1973) reportaron la presencia de este parásito en garrapatas *Rhipicephalus pulchellus* y *R. decoloratus* en Etiopía, mientras que Latif y colaboradores (Latif et al., 2004) hallaron altas tasas de infección en *Hyalomma anatolicum* en Sudán. En 1981, Shastri y Deshpande (Shastri and Deshpande, 1981) propusieron a *Hyalomma anatolicum anatolicum* como posible vector de *T. theileri* a partir del hallazgo de distintos estadios del parásito en ninfas y adultos de garrapatas colectadas sobre ganado bovino en la India. Por último, Martins y colaboradores (Martins et al., 2008) hallaron tripanosomátidos similares a *T. theileri* en garrapatas *R. microplus* en Brasil. En el año 2006, en Japón, Thekisoë y colaboradores (Thekisoë et al., 2007) caracterizaron un aislamiento de un tripanosoma hallado en garrapatas *Haemaphysalis hystricis* naturalmente infectadas y colectadas del ambiente, al que llamaron *Trypanosoma sp.* KG1. Recientemente, en Brasil, Marotta y colaboradores (Marotta et al., 2018) describieron un aislamiento (P1RJ) del género *Trypanosoma* que infecta naturalmente a garrapatas *Rhipicephalus microplus* y lo caracterizaron molecular, morfológica y biológicamente.

Por otra parte, en Argentina en el año 1989, Gaido y colaboradores (Gaido et al., 1989) describieron el hallazgo de un Trypanosomatidae en hemolinfa de garrapatas *R. microplus*, colectadas en bovinos del departamento de Gral. Güemes, en la provincia de Salta. Los ejemplares hallados fueron descritos a través de extendidos sanguíneos coloreados con Giemsa, como formas alargadas, con núcleo central y kinetoplasto en forma de bastón corto yuxtapuesto al mismo, por lo que los consideraron epimastigotes. A la fecha, este es el único hallazgo de este tipo documentado en el país.

El objetivo de este capítulo fue estudiar la presencia de tripanosomas en bovinos y garrapatas de zona endémica para hemoparásitos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención de muestras

2.1.1. Sangre bovina y garrapatas

Se analizaron las muestras de sangre bovina y algunas de las teleoginas de *R. microplus* colectadas sobre el ganado naturalmente infectado durante el muestreo realizado en el contexto del experimento de transmisibilidad de *A. marginale*, previamente descrito en la sección 2.1. del capítulo 2.

2.1.2. Hemolinfa

Luego de 10 días de incubar las teleoginas en estufa con humedad y a 28°C, se colectaron muestras de hemolinfa por medio del corte de una de las patas, tal como se explicó en la sección 2.1.3. del capítulo 2. Con una parte de la hemolinfa obtenida de cada teleogina se realizaron extendidos y el resto se colectó con un tip de pipeta automática y se depositó en un tubo de 0,2 ml conteniendo buffer de lisis celular para luego almacenarlo a -20°C hasta su uso tal cual en las reacciones de PCR.

2.1.2.1. Tinción diferencial

Los extendidos de sangre y hemolinfa se tiñeron con un kit de tinción diferencial "TINCION 15" (BIOPUR S.R.L., Rosario, Argentina), según se detalló en la sección 2.1.3.1. del capítulo 2. Los mismos fueron observados al microscopio óptico (Olympus CX-31) utilizando un objetivo 100X con inmersión.

2.2. Extracción de ADN a partir de extendidos de hemolinfa previamente teñidos

Dado que en algunas ocasiones la hemolinfa que puede obtenerse de una teleogina es escasa, y el volumen adquirido solo permite la realización de un extendido, se puso a punto un protocolo para la extracción del ADN fijado y teñido en un extendido positivo. El protocolo llevado a cabo fue el siguiente:

- Se raspó el extendido con un tip de pipeta automática utilizando 5 µl de agua ultrapura y se traspasó la suspensión a un tubo tipo eppendorf de 1,5 ml.
- A la suspensión se agregó 75 µl de resina InstaGene™ Matrix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y se incubó a 99°C, 30 minutos en agitación a 900 rpm.
- Se centrifugó 10 minutos a 13000 rpm y se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo y se guardó a -20°C hasta su utilización.

2.3. Extracción de ADN genómico a partir de garrapatas

Previo al procesamiento, se lavaron las teleoginas ya muertas en alcohol 70% y luego se enjuagaron en agua bidestilada. Luego, se realizó el protocolo de extracción descrito en la sección 2.2.3. del capítulo 2.

2.4. Diagnóstico de *Trypanosoma spp.* por hibridación reversa en línea

El método de hibridación reversa en línea, del inglés *Reverse Line Blot Hybridization* (RLBH) es una herramienta que permite realizar el diagnóstico de diferentes especies en muchas muestras (hasta 45) de manera simultánea. La técnica se basa en la hibridación de amplicones a sondas específicas de especie unidas covalentemente a una membrana de nylon (Figura 42A) (Georges et al., 2012; Jezbera et al., 2013; Soltani et al., 2012). Esto es posible ya que estas sondas específicas presentan, en su extremo 5', un grupo amino que se une covalentemente a las cargas negativas, dadas por los grupos carboxilo, que posee la membrana. Estos amplicones se originan en una reacción de PCR en la que se utiliza uno de los cebadores biotinilado, por lo cual todos los amplicones generados contienen una molécula de biotina en un extremo (Figura 42B). Esta modificación permite que el amplicón se una por medio de la biotina a una molécula con la que tiene gran afinidad, la estreptavidina. Esta molécula está, a su vez, conjugada con peroxidasa (Figura 42C), enzima sustrato de un reactivo quimioluminiscente que se utiliza para generar una reacción que emite luz, que va a ser captada por una placa fotosensible en la cual se van a imprimir, en forma de puntos, las muestras que resultaran positivas (Figura 42D).

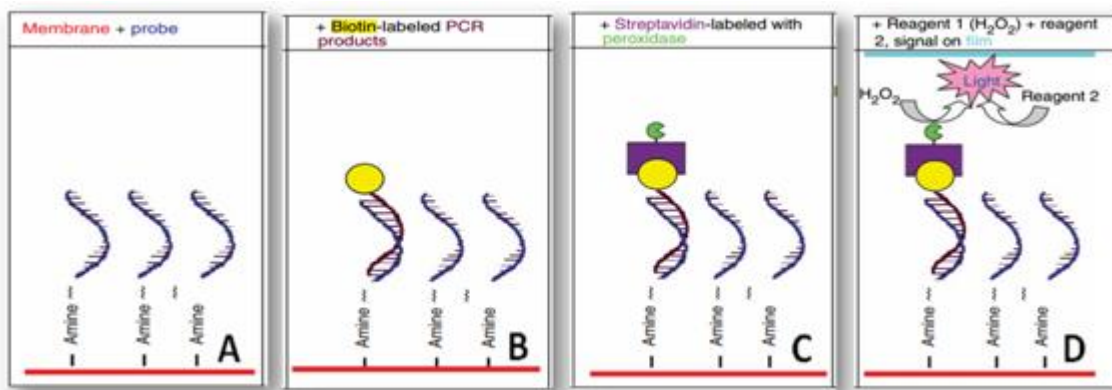


Figura 42. Fundamento químico de la hibridación reversa en línea sobre membrana de Nylon. Unión de sondas a la membrana por medio del grupo amino (A). Unión de los amplicones (hibridación) marcados con biotina (B). Unión de la estreptavidina a la biotina (C). Reacción quimioluminiscente (D). (Kong and Gilbert, 2007)

En este trabajo se realizó el diagnóstico por RLBH de *Trypanosoma spp.* en algunas de las muestras colectadas según el protocolo diseñado y puesto a punto por Paoletta y colaboradores (Paoletta et al., 2017). El mismo, se basa en la amplificación de la porción V7V8 del gen 18S rRNA común a todas las especies de tripanosomas, y la identificación de especies mediante sondas diseñadas en un fragmento variable de la porción amplificada. Las sondas utilizadas hibridan con amplicones de *T. evansi*, *T. theileri*, *T. vivax*, *T. sp. Formosa* (Paoletta et al., 2017) y el tripanosoma KG1 descrito por Thekisoie y colaboradores (Thekisoie et al., 2007).

2.5. Diagnóstico de tripanosomas por PCR semianidada seguida de secuenciación

Para la detección de *Trypanosoma spp.*, se llevó a cabo una PCR semianidada (Paoletta et al., 2017), cuyos cebadores, los utilizados en la técnica de RLBH previamente descrita, amplifican la porción V7V8 del gen 18S rRNA de todas las especies de tripanosomas. La misma consta de un cebador forward externo, y dos cebadores reverse, uno externo (primer reacción) y uno interno (segunda reacción). Dado que el fragmento obtenido en esta reacción es genérico, es necesario secuenciar los fragmentos obtenidos a fin de identificar la especie.

Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl, conteniendo 0,4 µM de cada cebador, 0,2 mM de cada deoxinucleósido trifosfato (DNTPs) (INBIO Highway, Argentina), 0,5 U de GoTaq polimerasa (Promega, USA) y buffer de reacción 1X. Para la primera reacción se utilizaron como templado aproximadamente 100 ng de ADN genómico y para la segunda reacción 2 µl del producto de amplificación de la primera reacción.

El control positivo utilizado fue ADN de una muestra de campo, positiva a *Trypanosoma spp.* por microscopía óptica y como control negativo se utilizó agua ultra-pura.

El proceso de amplificación por PCR se llevó a cabo en un termociclador (Bio-Rad MyCycler Thermal Cycler). Las características del ciclado para el primer paso se detallan a continuación (tabla 16) junto con las secuencias de cebadores utilizadas (tabla 17). Luego, en la tabla 18 se detalla el ciclado de la segunda reacción y los cebadores involucrados en ella (tabla 19)

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	3 min	1 ciclo
94°C	30 seg	20 ciclos
62°C	45 seg	
72°C	1 min	
72°C	10 min	1 ciclo

Tabla 16. Programa de ciclos para la primer reacción de PCR

Forward: 5'- GGT AAT TCC AGC TCC AAA AGC GT -3'
Reverse externo: 5'- GCA GTG TGG ACT ACA ATG GTC -3'

Tabla 17. Cebadores utilizados en el primer paso de la reacción semianidada para identificación de tripanosomas

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	3 min	1 ciclo
94°C	30 seg	35 ciclos
65°C	45 seg	
72°C	1 min	
72°C	10 min	1 ciclo

Tabla 18. Programa de ciclos para la segunda reacción de PCR

Forward: 5'- GGT AAT TCC AGC TCC AAA AGC GT -3'
Reverse interno: 5'- GCA GTG TGG ACT ACA ATG GTC -3'

Tabla 19. Cebadores utilizados en el segundo paso de la reacción semianidada para identificación de tripanosomas

Para la identificación de los productos de la reacción de amplificación de *Trypanosoma spp.* se sembró el volumen total de la reacción (50 µl) en un gel 1,5% de agarosa en buffer TAE 1X (Tris base 0.04 M, Ácido acético glacial 0.04 M, EDTA 0.001 M), conteniendo Bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml a fin de identificar las moléculas de ADN. Se utilizó el marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Los geles fueron observados en un transiluminador con luz ultravioleta (3UV Transiluminador UVP o Gel Doc XP BIO-RAD).

2.5.1. Secuenciación de los productos de PCR

Para aquellas reacciones en las que fue necesario purificar una banda de amplificación a partir del gel de agarosa, se seccionó el área correspondiente a la misma con un bisturí, se colocó en un tubo tipo eppendorf de 1,5 ml y se purificó siguiendo las instrucciones del kit comercial utilizado (EasyPure Quick Gel Extraction Kit, TRANS). El ADN purificado se eluyó en un volumen de 30 µl de agua libre de nucleasas y se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1.000.

Los productos purificados se enviaron a secuenciar a la Unidad de Genómica/Nodo Plataforma de Genómica CATG del Instituto de Biotecnología del CICVyA-INTA, según el protocolo descrito en la sección 2.5.6. del capítulo 2. Los fragmentos de ADN fueron secuenciados utilizando los mismos oligonucleótidos aplicados en las reacciones de amplificación. Se solicitó la secuenciación de ambas hebras complementarias del producto de amplificación para la posterior obtención de una secuencia consenso a fin de lograr una mayor confiabilidad en la lectura de la región estudiada.

2.5.2. Análisis de secuencias

Para el ensamblado manual de las secuencias complementarias de cada fragmento se utilizó el programa Vector NTI® versión 10.3.0. Se construyeron los contigs, se verificó manualmente la calidad del electroferograma y se visualizaron los picos para corroborar la correcta asignación de bases en las posiciones dudosas. Finalmente el archivo con el contig se convirtió a un archivo de texto con formato FASTA para su posterior análisis.

Se realizó un alineamiento local utilizando la herramienta de búsqueda BLAST a fin de identificar la identidad de las secuencias, utilizando la información disponible en la base de datos del GenBank.

3. RESULTADOS

3.1. *Trypanosoma spp.* en extendidos de hemolinfa

Se realizaron extendidos de hemolinfa de 123 individuos de *R. microplus* de los cuales, en seis, se observaron estructuras compatibles con tripanosomas (Figuras 43 y 44).

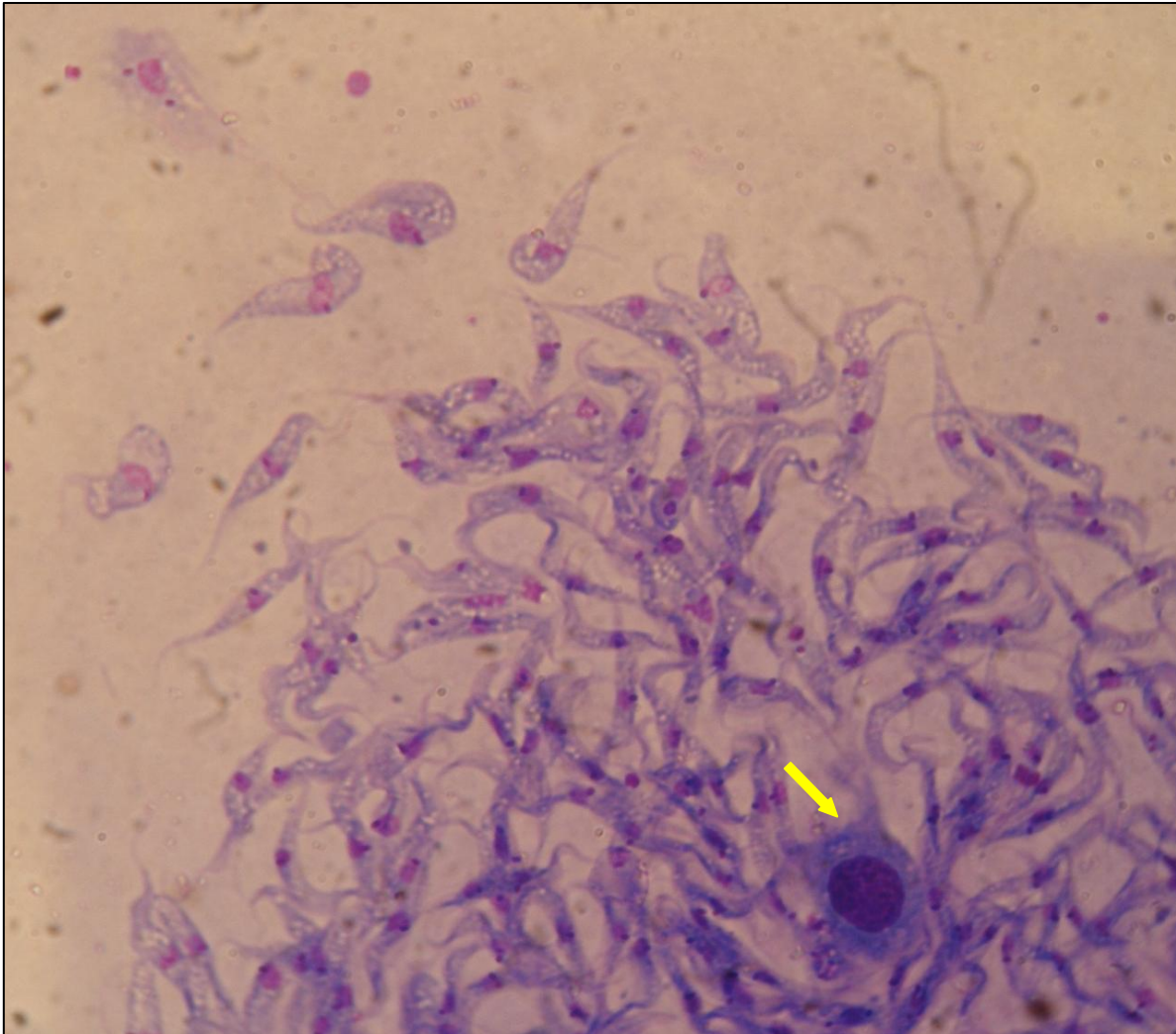


Figura 43. Tripanosomátidos rodeando una célula de la hemolinfa (flecha amarilla)(100X).

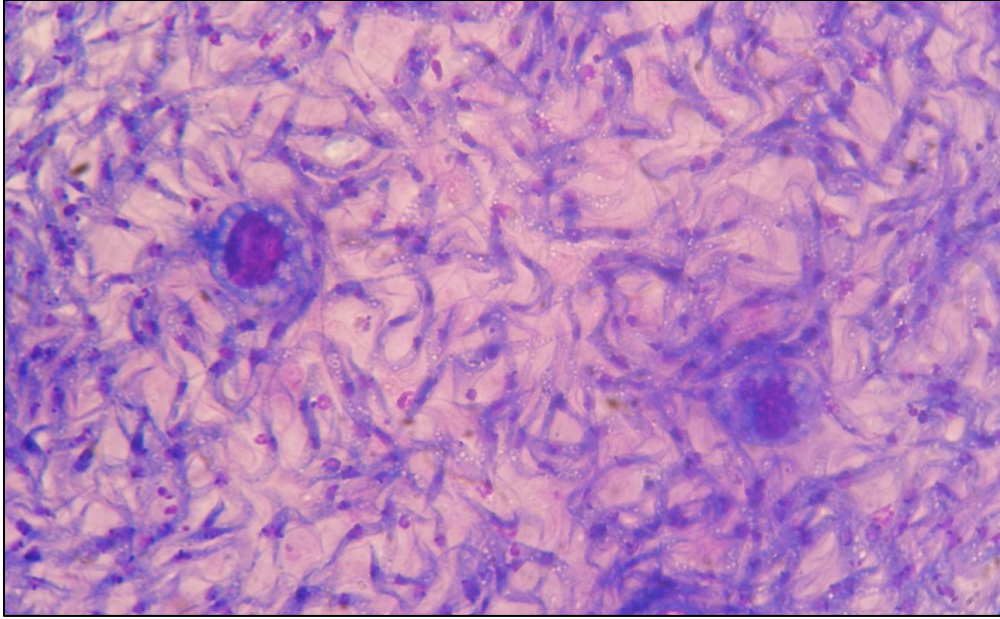


Figura 44. Tripanosomátidos rodeando dos células de la hemolinfa (100X).

En quince ejemplares se observó la presencia de kinetos de *Babesia spp.* aislados (Figura 45) y, en un ejemplar, kinetos en coinfección con los tripanosomas (Figura 46).

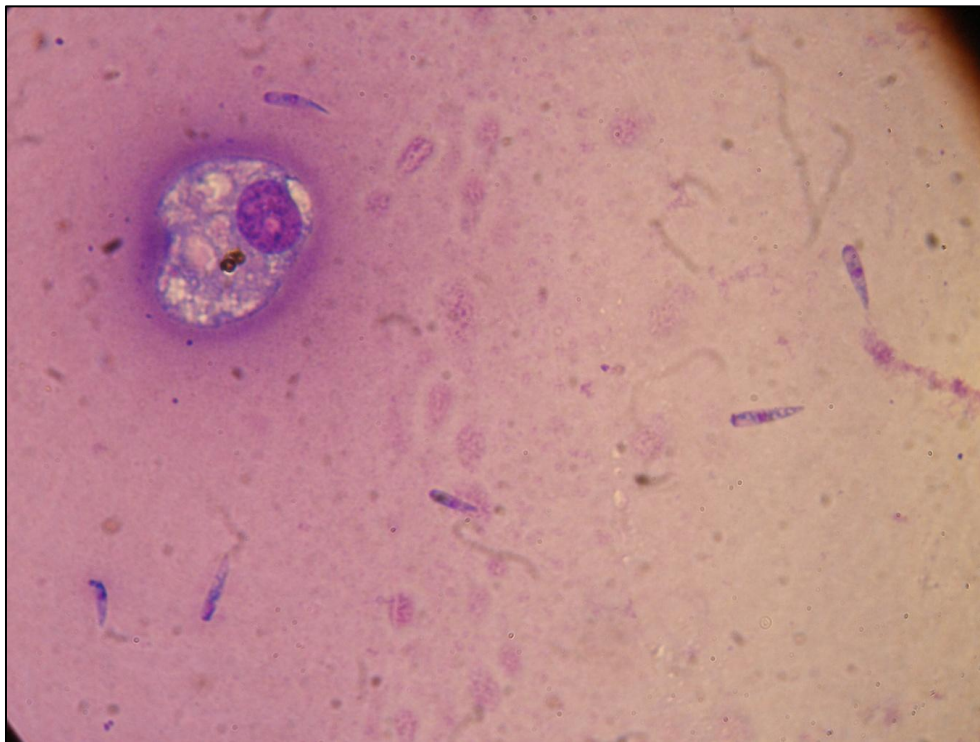


Figura 45. Kinetos de *Babesia spp.* en hemolinfa de *R. microplus* (100X). Se observa además una célula de la hemolinfa.

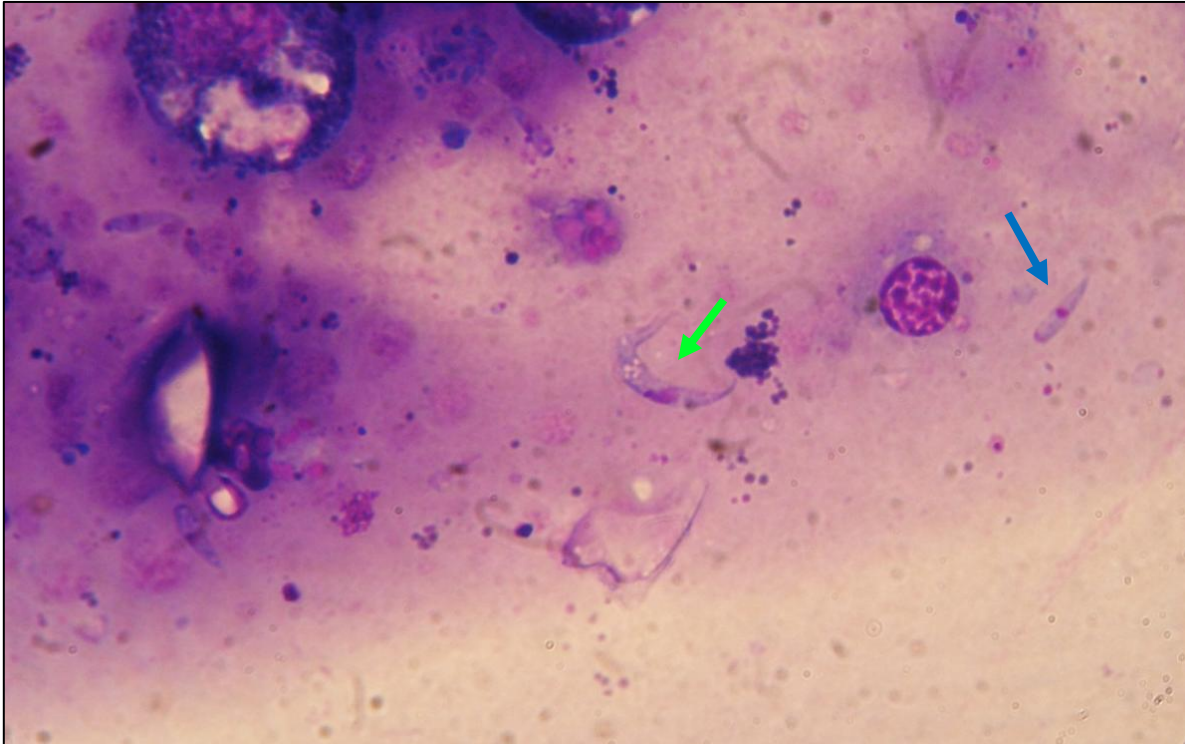


Figura 46. Kinetos (flecha azul) y tripanosomátidos (flecha verde) observados por microscopía óptica (100X) en una muestra de hemolinfa de *R. micropus*

Los extendidos presentados en la figuras 43 a 46 pertenecen a cuatro teleoginas distintas y, como se observa, difieren en la cantidad de parásitos por campo.

En todos los extendidos se observaron principalmente estadios compatibles con epimastigotes de tripanosomátidos que, según describieron Gaido y colaboradores (Gaido et al., 1989), se presentan como formas alargadas con kinetoplasto en forma de bastón corto yuxtapuesto al núcleo, este último en el centro de la célula. Las características principales observadas al microscopio óptico en los epimastigotes fueron gran vacuolización, membrana ondulante, flagelo libre y tamaño promedio de $31,7\mu\text{m}$ sin contar la porción libre de este último (Figura 47).

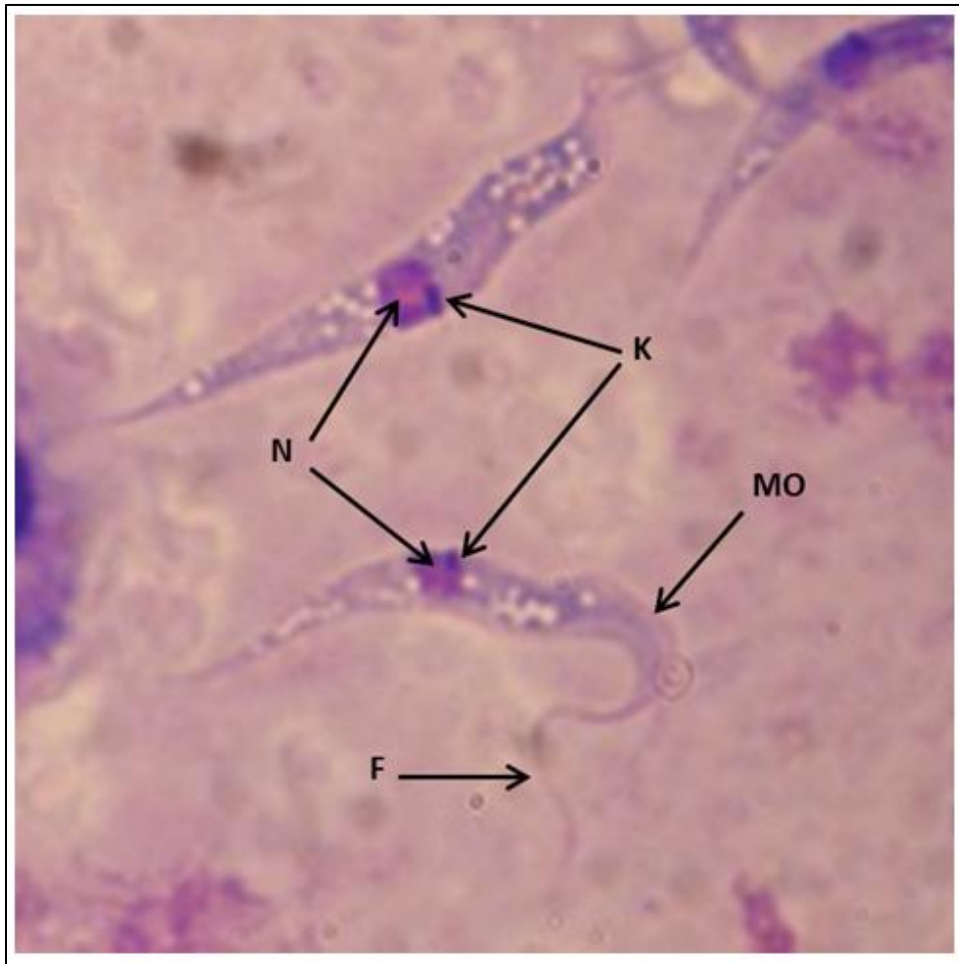


Figura 47. Ubicación de las organelas y características de los epimastigotes. N: núcleo, central. K: kinetoplasto, yuxtapuesto al núcleo. MO: membrana ondulante. F: flagelo libre. Se observa gran cantidad de vacuolas (100X)

Luego de la caracterización microscópica de los epimastigotes, se procedió a realizar un diagnóstico molecular a partir del ADN de la hemolinfa y de la garrapata entera.

3.2. Detección de tripanosomas por RLBH

Para realizar un primer diagnóstico molecular de las especies presentes en las muestras, se realizó un diagnóstico múltiple por RLBH, a partir del ADN obtenido del procesamiento de las garrapatas.

El resultado del diagnóstico de 13 teleoginas se muestra en la figura 48. En las filas se ubicaron las sondas y en las columnas las muestras y los controles. Como se observa, se evidenció la presencia de *T. theileri* (Teleoginas 1, 3 y 12), *T. vivax* (Teleoginas 3, 4, 11), una especie de tripanosoma aislado de una garrapata del género

Haemaphysalis (Thekiso et al., 2007) (Teleogina 3) y un tripanosoma (*T. sp* Formosa) cuya especie no está aún determinada (Número de acceso de GenBank KY009571) (Teleoginas 2, 3, 7) (Paoletta et al., 2017); se observó también la existencia de muestras coinfectadas (Teleoginas 3 y 4). Por otra parte, cinco muestras fueron positivas para la sonda específica de género o *catch all* (CA *Trypanosoma*) pero no hibridaron en ninguna de las sondas especie-específicas (Teleoginas 5, 6, 9, 10, 13), lo cual sugiere la presencia de especies aun no estudiadas y para las cuales no se ha incorporado una sonda específica en la membrana.

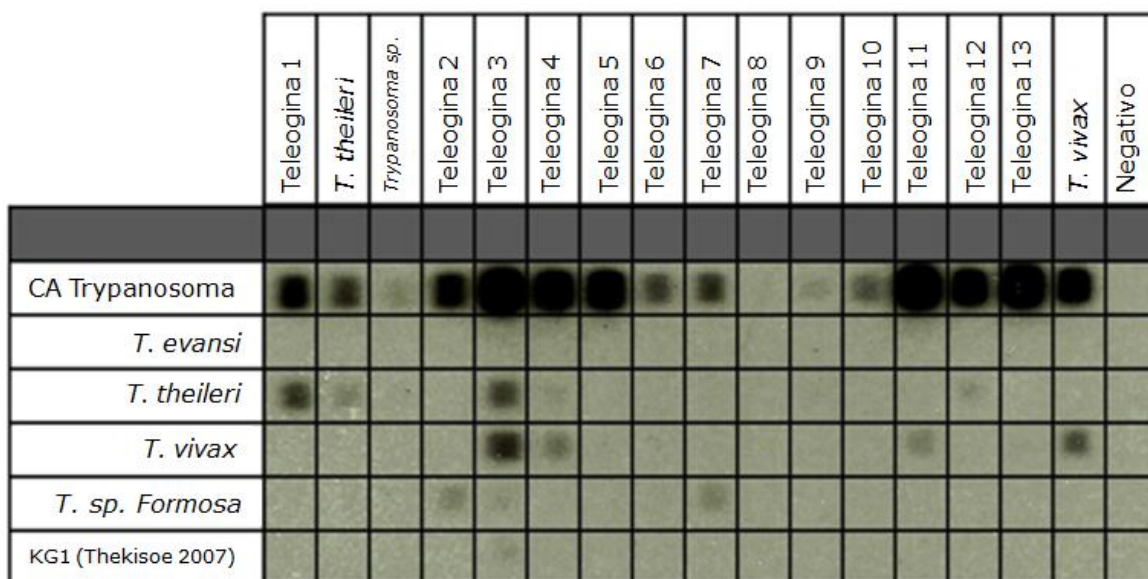


Figura 48. Diagnóstico de muestras de *R. microplus* por RLBH. Los puntos oscuros en la placa radiográfica indican reacción positiva de hibridación. CA Trypanosoma: sonda específica de género.

3.3. Detección de tripanosomas por PCR seguida de secuenciación

3.3.1. Detección de tripanosomas en teleoginas de *R. microplus*

Se realizó PCR semianidada seguida de secuenciación para identificar los tripanosomas presentes en las teleoginas. La identidad de las secuencias obtenidas se determinaron utilizando la herramienta BLAST: una secuencia mostró un 94% de identidad (e-value=0) alineando con el 100% de la secuencia del *Trypanosoma sp.* KG1, una segunda secuencia también mostró 94% de identidad (e-value=0) con el 98% de la secuencia del mismo *Trypanosoma sp.* KG1 descrito por Thekiso (Thekiso et al., 2007), y la secuencia de una tercera teleogina tuvo un 68% de identidad (e-value=0)

con el 99% de la secuencia de un ejemplar de especie no determinada *Trypanosoma spp.* (UK) (Número de acceso de GenBank LC056843.1) (Tabla 20).

Cabe destacar que estos tripanosomas fueron diagnosticados en el ADN total de garrapatas ingurgitadas, por lo que no se puede concluir acerca de cuáles son las estructuras del invertebrado que están infectadas, ni sobre la capacidad de estos kinetoplástidos de invadir las paredes del intestino e ingresar a la hemolinfa.

3.3.2. Detección de tripanosomas en hemolinfa de *R. microplus*

Por otra parte, se analizaron las muestras de hemolinfa resuspendidas en buffer de lisis. Se obtuvieron resultados positivos para cuatro muestras, en las que se identificó, en tres de ellas, un tripanosoma cuyas secuencias poseen un 94% de identidad (e-value=0) con el 100% de la secuencia depositada del *Trypanosoma sp.* KG1 descrito por (Thekiso et al., 2007). En la cuarta muestra positiva se halló un tripanosoma cuya secuencia tiene un 99% de identidad (e-value=0) con el 81% de la secuencia de un tripanosoma aislado de un bovino en la provincia de Formosa (Paoletta et al., 2017) (Tabla 20).

A diferencia de los tripanosomas detectados en las teleoginas enteras, los tripanosomas hallados en la hemolinfa fueron capaces de atravesar las paredes intestinales, alcanzar la hemolinfa y probablemente, dada la densidad de parásitos observados, reproducirse en ese medio.

3.3.3. Detección de tripanosomas a partir de un extendido de hemolinfa de *R. microplus*

Se logró aislar ADN de un extendido de hemolinfa previamente teñido con una tinción diferencial, en el cual se habían observado epimastigotes de *Trypanosoma sp.*

La secuencia obtenida para esta muestra, tiene un 98% de identidad (e-value=5e-76) con el 98% de la secuencia del *Trypanosoma sp.* KG1 descrito por Thekiso et al. y colaboradores (Thekiso et al., 2007) (Tabla 20).

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 20:

	RLBH	PCR semianidada seguida de secuenciación
Teleogina 1	<i>T. theileri</i>	ND
Teleogina 2	<i>T. sp Formosa</i>	ND
Teleogina 3	<i>T. theileri</i> - <i>T. vivax</i> - <i>T. sp Formosa</i> - <i>Trypanosoma sp. KG1</i>	ND
Teleogina 4	<i>T. vivax</i>	ND
Teleogina 5	<i>Trypanosoma sp</i> (CA)	ND
Teleogina 6	<i>Trypanosoma sp</i> (CA)	ND
Teleogina 7	<i>T. sp Formosa</i>	ND
Teleogina 8	Negativa	ND
Teleogina 9	<i>Trypanosoma sp</i> (CA)	ND
Teleogina 10	<i>Trypanosoma sp</i> (CA)	ND
Teleogina 11	<i>T. vivax</i>	ND
Teleogina 12	<i>T. theileri</i>	ND
Teleogina 13	<i>Trypanosoma sp</i> (CA)	ND
Teleogina 14	ND	<i>Trypanosoma sp. KG1</i>
Teleogina 15	ND	<i>Trypanosoma sp. KG1</i>
Teleogina 16	ND	<i>Trypanosoma spp.</i> (UK)
Hemolinfa 1	ND	<i>Trypanosoma sp. KG1</i>
Hemolinfa 2	ND	<i>Trypanosoma sp. KG1</i>
Hemolinfa 3	ND	<i>T. sp Formosa</i>
Hemolinfa 4	ND	<i>Trypanosoma sp. KG1</i>
Hemolinfa en extendido	ND	<i>Trypanosoma sp. KG1</i>

Tabla 20. Resultados del hallazgo de tripanosomas en teleoginas y hemolinfa de *R. microplus*. Se detallan las especies diagnosticadas por RLBH y por secuenciación de un fragmento del gen *18S rRNA*. CA: *catch all* ND: No determinado.

3.3.4. Detección de *T. theileri* en un bovino de zona endémica

Se observaron los frotis de los 26 bovinos de zona endémica, no obteniéndose ningún animal positivo para *Trypanosoma spp.*, *Babesia spp.* o bacterias. Sin embargo, mediante el diagnóstico molecular por PCR seguida de secuenciación, un bovino resultó

positivo para un tripanosoma cuya secuencia tuvo un 100% de identidad (e-value=0) con el 99% de una secuencia parcial del gen 18S rRNA de *Trypanosoma theileri* (Número de acceso de GenBank AB007814.1). De este bovino, se colectaron las teleoginas 14 y 15 cuyo diagnóstico se presentó en la Tabla 20.

4. DISCUSIÓN

Las infecciones causadas por los tripanosomas bovinos constituyen un problema sanitario para el desarrollo de la ganadería bovina en zonas tropicales y subtropicales; en Argentina, por ejemplo, fue reportada la presencia de *Trypanosoma vivax* y *T. theileri* en sangre de búfalos y bovinos de la provincia de Formosa (Monzón et al., 2010; Paoletta et al., 2017).

Si bien en el continente americano los tábanos de distintas especies son los transmisores principales de los tripanosomas, hay reportes que postulan a las garrapatas de los géneros *Hyalomma*, *Haemaphysalis* y *Rhipicephalus* como posibles vectores (Burgdorfer et al., 1973; Latif et al., 2004; Martins et al., 2008; Shastri and Deshpande, 1981).

Durante el análisis de las muestras de sangre bovina y garrapatas, se obtuvieron extendidos teñidos diferencialmente donde se observaron estructuras con características morfológicas tales como kinetoplasto, núcleo, flagelo, membrana ondulante que sugieren, al igual que otras publicaciones (Gaido et al., 1989; Thekiso et al., 2007), que se trataría de organismos del género *Trypanosoma*. Entre los resultados obtenidos, se halló un bovino infectado con *T. theileri* y ejemplares de garrapatas infectados con distintas especies de tripanosomas. Este hallazgo es de particular relevancia ya que hasta el momento no hay reportes de la presencia de tripanosomas bovinos ni de su ocurrencia en garrapatas en la provincia de Corrientes. El único reporte de este tipo en Argentina se limita a una observación y descripción microscópica de tripanosomátidos hallados en la misma especie de garrapata en la provincia de Salta (Gaido et al., 1989).

A pesar de la existencia de estudios previos en los que detectaron tripanosomas en la hemolinfa e intestinos de varias especies de garrapatas (el Kady, 1998; Latif et al., 2004; Shastri and Deshpande, 1981; Thekiso et al., 2007), hasta la fecha, no hay información suficiente para demostrar por completo el modo de transmisión de estos tripanosomátidos a través de estos invertebrados.

Los análisis filogenéticos del aislamiento KG1 basados en un fragmento de 2154 pares de bases del gen *18S rRNA*, indicaron que este tripanosoma pertenece a la sección Stercoraria (Thekiso et al., 2007). Dado que algunos de los tripanosomas hallados en esta tesis tienen un alto porcentaje de identidad con la secuencia del tripanosoma KG1, podría aportar información significativa el estudio de la materia fecal de las garrapatas, ya que, de pertenecer a la sección Stercoraria, sería esperable hallar

parásitos en este tipo de muestra. Además, dado que *R. microplus* también es vector de otros microorganismos y que, como se presentó en este trabajo, estos coexisten en espacio y tiempo en la hemolinfa, sería relevante estudiar el efecto de la coinfección sobre distintos parámetros como la alteración de la capacidad de desove, la transmisión vertical a las larvas, la infección de un hospedero vertebrado, entre otros.

Teniendo en cuenta el reporte de Vallejo y colaboradores (Vallejo et al., 2015), quienes describen a *T. rangeli* como un parásito infectivo para los artrópodos e infectivo y no patógeno para los vertebrados, podría ocurrir que los tripanosomas identificados en *R. microplus* presenten un comportamiento similar. Respecto a esto, se reconocen cuatro componentes en la interacción parásito-vector que son determinantes en la transmisión de los tripanosomas: la especie, la cepa y el genotipo del tripanosoma; la especie de vector; la respuesta inmune celular y humoral del vector y la microbiota intestinal del artrópodo (García et al., 2012, 2010; Schaub, 2009), por lo que también deberían estudiarse estos aspectos a fin de comprender mejor la presencia de los tripanosomas hallados en garrapatas.

Los resultados obtenidos en este capítulo ponen de relevancia la necesidad de profundizar la búsqueda de patógenos que puedan amenazar la productividad de la ganadería en regiones endémicas para las garrapatas. Ampliar la caracterización de los tripanosomas hallados utilizando herramientas de biología molecular y de cultivo celular permitiría estudiar la patogenicidad de los tripanosomátidos tanto para los hospederos vertebrados como para las garrapatas.

5. CONCLUSIONES FINALES

1. Se realizó un relevamiento epidemiológico de los hemoparásitos *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* y de los anticuerpos contra estos agentes en bovinos de diversos establecimientos ganaderos, que permitió conocer la situación epidemiológica de los agentes causales de la tristeza bovina en distintas regiones del NEA.
2. Se identificaron factores agro-epidemiológicos relacionados con el manejo de los rodeos, características de los animales y factores climáticos con influencia en las prevalencias observadas.
3. El análisis epidemiológico realizado permitió concluir que, a pesar de que los hemoparásitos en estudio son enzoóticos en las provincias estudiadas, las prevalencias observadas no son uniformes.
4. A través de un experimento de transmisibilidad, se comprobó la existencia de la transmisión transovárica de *A. marginale* en teleoginas de *R. microplus* naturalmente infectadas.
5. Se logró la infección de un bovino sano a partir de la infestación del mismo con larvas infectadas naturalmente con *A. marginale*, destacando la relevancia de esta especie de garrapatas como vector biológico de la bacteria.
6. Se detectó *A. marginale* en hemolinfa, glándulas salivales y ovarios de teleoginas de *R. microplus*. Particularmente, el hallazgo de la bacteria en los ovarios es condición previa necesaria para la transmisión a la descendencia.
7. El análisis de los genotipos de *A. marginale* permitió revelar aspectos de su epidemiología desconocidos hasta el momento. Se detectaron más de 20 genotipos distintos de la bacteria en un mismo hospedero bovino de zona endémica. Hasta la fecha, no hay reportes similares a nivel mundial.
8. La identificación del genotipo 13-27 en teleoginas y larvas, permitió corroborar la transmisión transovárica de *A. marginale* en *R. microplus*. Este resultado demuestra inequívocamente que *A. marginale* es capaz de alcanzar los ovarios

de la teleogina, infectarlos y pasar a la descendencia, generando larvas infectadas con la bacteria.

9. Por otra parte, el hallazgo de los genotipos τ -X2-12 y α - β - β - Γ en el bovino infectado naturalmente, en una teleogina y en el bovino susceptible permitió describir el ciclo completo de la bacteria, incluyendo a los estadios larvales de la garrapata *R. microplus* como vector competente.

10. Se hallaron diversos tripanosomas en teleoginas y hemolinfa de *R. microplus*, que se identificaron por distintos métodos moleculares. Este hallazgo fue de particular relevancia ya que hasta el momento no hay reportes de la presencia de tripanosomas bovinos ni de su ocurrencia en garrapatas en la provincia de Corrientes

ANEXO I

Se evaluó la especificidad y sensibilidad de las reacciones de PCR puestas a punto para amplificar los genes *ves1a* de *B. bovis* y *B. bigemina*. En las figuras A1 y A2 se muestran la especificidad de las reacciones de amplificación del gen *ves1a* de *B. bovis* y *ves1a* de *B. Bigemina* respectivamente. En el primer caso se evaluó la especificidad utilizando las cepas S2P, R1A y M1A de *B. bovis* y las cepas S1A y M1A de *B. bigemina* (Figura A1). En el caso de *B. bigemina*, se utilizaron las cepas específicas S3P, M1A y S1A, y las cepas M1A y R1A de *B. bovis* (Figura A2).

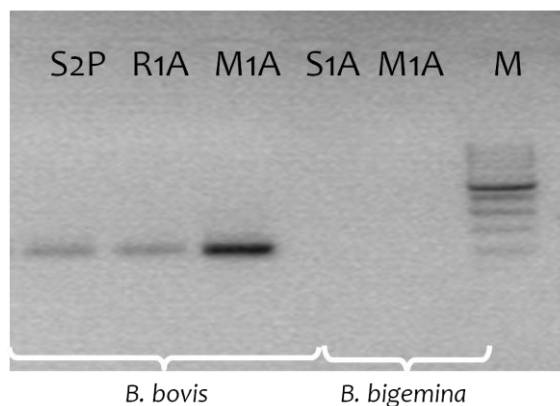


Figura A1. Producto de amplificación del gen *ves1a* de *B. bovis*. No se observa reacción inespecífica con *B. bigemina*.

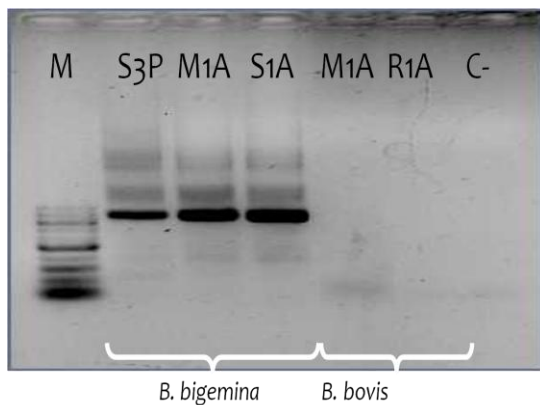


Figura A2. Producto de amplificación del gen *ves1a* de *B. bigemina*. No se observa reacción inespecífica con *B. bovis*.

Respecto a la sensibilidad, la reacción de amplificación del gen *ves1a* de *B. bovis* permite detectar 0,02 ng de ADN en 50 ul. La reacción de amplificación del gen *ves1a* de *B. bigemina* detecta hasta 0,2 ng de ADN en el mismo volumen.

ANEXO II

ENCUESTA

1. Nombre del Productor:.....
2. Departamento:.....
3. Paraje/Picada/Colonia:.....
4. Lote:.....
5. RENSPA:.....
6. Coordenadas:
Latitud:
Longitud:
- Fecha de obtención de las muestras:
7. Fecha de remisión de las muestras:
8. Número de muestras enviadas:
9. Tipo de muestra enviada (indique con una X):
 - a. Sangre entera (en tubo conteniendo anticoagulante- citrato de sodio)
 - b. Sangre en tubo sin anticoagulante (para suero)
 - c. Garrapatas
 - d. Otro.....Suero.....

10. Edad de los bovinos de los que se obtuvieron las muestras:

Categoría	Abreviaturas	Número de animales
Toro	To	
Vaca	Vc	
Buey	By	
Vaq/Novillito	Vaq/Nov	
Ternero	Te	
Total		

11. Vacunación

- a- Vacuna ultra congelada
- b- Vacuna Refrigerada

12. Observaciones:.....
.....
.....

DATOS DE LA EXPLOTACIÓN

1. Tipo de explotación (indique con una X):
 - a. Exclusivamente ganadera
 - b. Agrícola-Ganadera
2. Explotación ganadera (indique con una X):
 - a. Bovinos para carne
 - b. Bovinos para leche
 - c. Doble
3. ¿Cría otro ganado? (indique con una X):

Sí

 - a. No
4. ¿Qué ganado? (indique con una X):
 - a. Ovino
 - b. Caprino
 - c. Equino
 - d. Otro
5. ¿Qué cantidad?:

ESTRUCTURA DEL RODEO:

6. Proporción de *Bos indicus*:

Consignar de acuerdo al número de código las siguientes proporciones de *Bos indicus*:

1- Menor de 25%

2- 25 a 49%

3- 50 a 74%

4- Mayor a 75%

7. Número de toros:

8. Número de vacas:

9. Número de bueyes:

10. Número de Vaq/Novillitos:

11. Número terneros/terneras:

12. Otros bovinos:

13. Superficie dedicada a la ganadería (ha):

CONTROL DE LAS GARRAPATAS

14. ¿Usan acaricidas? (indique con una X):

- a. SI
- b. NO

15. Indique la forma de aplicación (indique con una X):

- a. Inmersión
- b. Aspersión fija
- c. Aspersión manual
- d. Derrame (pour-on)
- e. Inyectable
- f. Otros:.....

16. Indique meses de aplicación utilizando los códigos de los acaricidas:

<input type="checkbox"/>	ENERO	<input type="checkbox"/>	FEBRERO	<input type="checkbox"/>	MARZO	<input type="checkbox"/>	ABRIL	<input type="checkbox"/>	MAYO	<input type="checkbox"/>	JUNIO
<input type="checkbox"/>	JULIO	<input type="checkbox"/>	AGOSTO	<input type="checkbox"/>	SEPTIEMBRE	<input type="checkbox"/>	OCTUBRE	<input type="checkbox"/>	NOVIEMBRE	<input type="checkbox"/>	DICIEMBRE

Código de acaricidas:

- | | | | |
|--------------------|-------------------------------|------------------|--------------------------|
| Acción prolongada: | 1-Piretroides | 2-Endectocidas | 3-Fluazurón
(Akatac) |
| Acción corta: | 4-Fosforados | 5-Amitraz | 6-Fipronil
(Ectoline) |
| Mixtos: | 7-Piretroides +
Fosforados | 8-
Otro:..... | |

OCURRENCIA DE BABESIOSIS Y/O ANAPLASMOSIS DURANTE EL ÚLTIMO AÑO

17. **Babesiosis** (indique con una X):

												TOTAL		Edad (años)		
E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	Enfermos	Muertos	<2	1	>2
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
												<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

18. **Anaplasmosis** (indique con una X):

												TOTAL		Edad (años)		
E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	Enfermos	Muertos	<2	1	>2
															-	
															2	

19. **Indeterminado** (indique con una X):

												TOTAL		Edad (años)		
E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	Enfermos	Muertos	<2	1	>2
															-	
															2	

ORIGEN DE LOS ANIMALES AFECTADOS

20. ¿Nacidos en el establecimiento? (indique con una X):

- a. SI
- b. NO

21. ¿Procedentes de otro establecimiento? (indique con una X):

- a. SI
- b. NO
- c. Lugar de

procedencia:.....

Observaciones:.....

Bibliografía

- Aguirre, D.H.D., Gaido, A.B., Vinabal, A.E., De Echaide, S.T., Guglielmone, A.A.A., Echaide, S.T., Guglielmone, A.A.A., 1994. Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed a nymphs on calves with different levels of rickettsaemia. *Parasite* 1, 405–407.
<https://doi.org/10.1051/parasite/1994014405>
- Allred, D.R., McGuire, T.C., Palmer, G.H., Leib, S.R., Harkins, T.M., McElwain, T.F., Barbet, A.F., 1990. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 3220–3224. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.8.3220>
- Almazán, C., Alamzán, C., Medrano, C., Ortiz, M., de la Fuente, J., 2008. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains from an outbreak of bovine anaplasmosis in an endemic area. *Vet. Parasitol.* 158, 103–9.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.08.015>
- Anziani, O.S., 1979. Anaplasmosis en áreas libres de garrapatas, in: *Memoria de La Reunión Anual de Información Técnica*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Regional Agropecuaria Rafaela, Estación Experimental Regional Agropecuaria Rafaela, pp. 63–68.
- Aubry, P., Geale, D.W., 2011. A review of bovine anaplasmosis. *Transbound. Emerg. Dis.* 58, 1–30. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x>
- Austen, J.M., Ryan, U.M., Friend, J.A., Ditcham, W.G.F., Reid, S.A., 2011. Vector of *Trypanosoma copemani* identified as *Ixodes* sp. *Parasitology* 138, 866–872.
<https://doi.org/10.1017/S0031182011000497>
- Azad, A., Beard, C.B., 1998. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 179–186. <https://doi.org/10.3201/eid0402.980205>
- Barbet, A.F., Blentlinger, R., Yi, J., Lundgren, A.M., Blouin, E.F., Kocan, K.M., 1999. Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture, tick salivary glands, and cattle. *Infect. Immun.* 67, 102–7.
- Barbet, A.F., Palmer, G.H., Myler, P.J., McGuire, T.C., 1987. Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for polypeptide Am105L. *Infect. Immun.* 55, 2428–2435.
- Bilgiç, H.B., Karagenc, T., Simuunza, M., Shiels, B., Tait, A., Eren, H., Weir, W., 2013.

- Development of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Theileria annulata*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle. *Exp. Parasitol.* 133, 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.11.005>
- Bock, R., Jackson, L., De Vos, a., Jorgensen, W., 2004. Babesiosis of cattle. *Parasitology* 129, S247–S269. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005190>
- Brayton, K.A., 2012. Transmission of *Anaplasma marginale*. *Rev Mex Cienc Pecu* 3, 41–50.
- Brayton, K.A., Kappmeyer, L.S., Herndon, D.R., Dark, M.J., Tibbals, D.L., Palmer, G.H., McGuire, T.C., Knowles, D.P., 2005. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 844–849. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406656102>
- Brayton, K.A., Lau, A.O.T., Herndon, D.R., Hannick, L., Kappmeyer, L.S., Berens, S.J., Bidwell, S.L., Brown, W.C., Crabtree, J., Fadrosch, D., Feldblum, T., Forberger, H.A., Haas, B.J., Howell, J.M., Khouri, H., Koo, H., Mann, D.J., Norimine, J., Paulsen, I.T., Radune, D., Ren, Q., Smith Jr., R.K., Suarez, C.E., White, O., Wortman, J.R., Knowles Jr., D.P., McElwain, T.F., Nene, V.M., 2007. Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa. *PLoS Pathog.* 3, 1401–1413. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030148>
- Burgdorfer, W., Schmidt, M.L., Hoogstraal, H., 1973. Detection of *Trypanosoma theileri* in Ethiopian cattle ticks. *Acta Trop.* 30, 340–6.
- Cabezas-Cruz, A., de la Fuente, J., 2015. *Anaplasma marginale* major surface protein 1a: A marker of strain diversity with implications for control of bovine anaplasmosis. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 6, 205–10. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.03.007>
- Cadioli, F.A., de Athayde Barnabé, P., Zacarias Machado, R., Alves Teixeira, M.C., Rogério André, M., Sampaio, P.H., Fidélis Junior, O.L., Geraldine Teixeira, M.M., Marques, L.C., 2012. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21, 118–124. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000200009>
- Calderon Goncalves, R., Pessoa Gomez da Silva, D., Biagio Chiacchio, S., Secorun Borges, A., Martins Amorim, R., Pedone Bandarra, E., Kiomi Takahira, R., 2005.

- Anaplasmosis neonatal em Bezerro. *Vet. Not.* 11, 95–98.
- Callow, L., Mellors, L., McGregor, W., 1979. Reduction in virulence of *Babesia Bovis* due to rapid passage in splenectomized cattle. *Int. J. Parasitol.* 9, 333–338.
- Callow, L.L., 1984. Piroplasms, in: *Animal Health in Australia, Protozoal and Rickettsial Diseases*. Vol 5. Australian Bureau of Animal Health, AGPS., Canberra, pp. 121–160.
- Camacho-Nuez, M., Muñoz, M. de L., Suarez, C.E., McGuire, T.C., Brown, W.C., Palmer, G.H., 2000. Expression of polymorphic *msp1β* genes during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia. *Infect. Immun.* 68, 1946–1952. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.4.1946-1952.2000>
- Castañeda-Ortiz, E.J., Ueti, M.W., Camacho-Nuez, M., Mosqueda, J.J., Mousel, M.R., Johnson, W.C., Palmer, G.H., 2015. Association of *Anaplasma marginale* Strain Superinfection with Infection Prevalence within Tropical Regions. *PLoS One* 10, e0120748. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120748>
- Collantes, A.E., Alfaro, A., 1852. *Diccionario de agricultura práctica y economía rural*. Madrid.
- Connell, M., Hall, W.T.K., 1972. Transmission of *Anaplasma marginale* by the cattle tick *Boophilus microplus*. *Aust. Vet. J.* 48, 477.
- Cutullé, C., Lovis, L., D'Agostino, B.I., Balbiani, G.G., Morici, G., Citroni, D., Reggi, J., Caracostantogolo, J.L., 2013. In vitro diagnosis of the first case of amitraz resistance in *Rhipicephalus microplus* in Santo Tomé (Corrientes), Argentina. *Vet. Parasitol.* 192, 296–300. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.10.014>
- Dalgliesht, R.J., 1993. Babesiosis, in: *Immunology and Molecular Biology of Parasite Infections*. Warren S. K., Oxford, pp. 352–383.
- Dávila, A.M.R., Silva, R.A.M.S., 2000. Animal trypanosomiasis in South America. Current status, partnership, and information technology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916, 199–212. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05291.x>
- de la Fuente, J., Blouin, E.F., Kocan, K.M., 2003. Infection exclusion of the rickettsial pathogen *Anaplasma marginale* in the tick vector *Dermacentor variabilis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 10, 182–4. <https://doi.org/10.1128/CDLI.10.1.182-184.2003>
- de la Fuente, J., Estrada-Peña, A., Venzal, J., Kocan, K.M., Sonenshine, D.E., 2008. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and

- animals. *Front. Biosci.* 1, 6938–6946.
- De la Fuente, J., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., Kocan, K.M., 2003. Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells. *Vet. Microbiol.* 91, 265–283. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00309-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00309-7)
- De La Fuente, J., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., McEwen, B.R., Clawson, D., Kocan, K.M., 2001. Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of *Anaplasma marginale*. *Int. J. Parasitol.* 31, 1705–1714. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00287-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00287-9)
- De La Fuente, J., Kocan, K.M., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., Claypool, P.L., Saliki, J.T., 2002. Vaccination of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture and bovine erythrocytes followed by challenge-exposure with infected ticks. *Vet. Microbiol.* 89, 239–251. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00206-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00206-7)
- de la Fuente, J., Ruybal, P., Mtshali, M.S., Naranjo, V., Shuqing, L., Mangold, A.J., Rodríguez, S.D., Jiménez, R., Vicente, J., Moretta, R., Torina, A., Almazán, C., Mbat, P.M., de Echaide, S.T., Farber, M., Rosario-Cruz, R., Gortazar, C., Kocan, K.M., 2007. Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. *Vet. Microbiol.* 119, 382–390. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.09.015>
- de la Fuente, J., Torina, A., Naranjo, V., Caracappa, S., Di Marco, V., Alongi, A., Russo, M., Maggio, A., Kocan, K., 2005. Infection with *Anaplasma phagocytophilum* in a seronegative patient in Sicily, Italy: case report. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 4, 15. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-4-15>
- de la Fuente, J., Van Den Bussche, R.A., Kocan, K.M., 2001. Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). *Vet. Parasitol.* 97, 65–76. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00378-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00378-8)
- Desquesnes, M., 2004. Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America, Tropical Medicine. CIRAD-EMVT Publication, Paris. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.04.005>
- Desquesnes, M., Dargantes, A., Lai, D.-H., Lun, Z.-R., Holzmüller, P., Jittapalapong, S., 2013. *Trypanosoma evansi* and Surra: a review and perspectives on

- transmission, epidemiology and control, impact, and zoonotic aspects. *Biomed Res. Int.* 321–237. <https://doi.org/10.1155/2013/321237>
- Doherty, M.L., Windle, H., Voorheis, H.P., Larkin, H., Casey, M., Clery, D., Murray, M., 1993. Clinical disease associated with *Trypanosoma theileri* infection in a calf in Ireland. *Vet. Rec.* 132, 653–6.
- Donelson, J.E., 2003. Antigenic variation and the African trypanosome genome. *Acta Trop.* 85, 391–404. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(02\)00237-1](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(02)00237-1)
- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bakker, C.P., Dasch, G. a., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangwira, F.R., 2001. Reorganization of gene in families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* with *neorickettsia*, description of six new species combinations and designatio. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2145–2165. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>
- Dunning Hotopp, J.C., Lin, M., Madupu, R., Crabtree, J., Angiuoli, S. V., Eisen, J., Seshadri, R., Ren, Q., Wu, M., Utterback, T.R., Smith, S., Lewis, M., Khouri, H., Zhang, C., Niu, H., Lin, Q., Ohashi, N., Zhi, N., Nelson, W., Brinkac, L.M., Dodson, R.J., Rosovitz, M.J., Sundaram, J., Daugherty, S.C., Davidsen, T., Durkin, A.S., Gwinn, M., Haft, D.H., Selengut, J.D., Sullivan, S.A., Zafar, N., Zhou, L., Benahmed, F., Forberger, H., Halpin, R., Mulligan, S., Robinson, J., White, O., Rikihisa, Y., Tettelin, H., 2006. Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. *PLoS Genet.* 2, 208–223. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020021>
- Echaide, S., Echaide, I.E., Gaido, A.B., Mangold, A.J., Lugaresi, C.I., Guglielmone, A.A., 1995. Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay kit for the detection of *Babesia bovis* antibodies in cattle in Argentina 267–272.
- Edwards, K.T., Goddard, J., Varela-Stokes, A.S., 2009. Examination of the internal morphology of the ixodid tick, *Amblyomma maculatum* Koch, (Acari: Ixodidae); a “How-to” pictorial dissection guide. *Midsouth Entomol.* 2, 28–39.
- el Kady, G.M., 1998. Protozoal parasites in tick species infesting camels in Sinai Peninsula. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 28, 765–766.
- Eriks, I.S., Stiller, D., Palmer, G.H., 1993. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2091–2096.
- Ewing, S.A., 1981. Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods.

- Field, M.C., Carrington, M., 2009. The trypanosome flagellar pocket. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 775–86. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2221>
- Figueroa, J. V, Chieves, L.P., Johnson, G.S., Buening, G.M., 1992. Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by polymerase chain reaction amplification. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2576–82.
- Florin-Christensen, M., Suarez, C.E., Rodriguez, A.E., Flores, D.A., Schnittger, L., 2014. Vaccines against bovine babesiosis: Where we are now and possible roads ahead. *Parasitology* 141, 1563–1592. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000961>
- Franke, C.R., Greiner, M., Mehlitz, D., 1994. Investigations on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Poconé (Mato Grosso, Brazil). *Acta Trop.* 58, 159–169. [https://doi.org/10.1016/0001-706X\(94\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0001-706X(94)90055-8)
- Gachohi, J., Skilton, R., Hansen, F., Ngumi, P., Kitala, P., 2012. Epidemiology of East Coast fever (*Theileria parva* infection) in Kenya: past, present and the future. *Parasit. Vectors* 5, 194. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-194>
- Gachohi, J.M., Kitala, P.M., Ngumi, P.N., Skilton, R.A., 2011. Environment and farm factors associated with exposure to *Theileria parva* infection in cattle under traditional mixed farming system in Mbeere District, Kenya. *Trop. Anim. Health Prod.* 43, 271–277. <https://doi.org/10.1007/s11250-010-9688-x>
- Gaido, A.B., Mangold, A.J., Aguirre, D.H., Guglielmone, A.A., 1989. Hallazgo de Trypanosomatidae en la garrapata *Boophilus microplus* en la Argentina. *Rev. Med. Vet. (Bogota)*. 70.
- Gall, C.A., Reif, K.E., Scoles, G.A., Mason, K.L., Mousel, M., Noh, S.M., Brayton, K.A., 2016. The bacterial microbiome of *Dermacentor andersoni* ticks influences pathogen susceptibility. *ISME J.* 1–10. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.266>
- Garcia, E.S., Castro, D.P., Figueiredo, M.B., Azambuja, P., 2012. Parasite-mediated interactions within the insect vector: *Trypanosoma rangeli* strategies. *Parasit. Vectors* 5, 105. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-105>
- Garcia, E.S., Genta, F.A., de Azambuja, P., Schaub, G.A., 2010. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol.* 26, 499–505. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.07.003>
- Gardiner, P.R., Wilson, A.J., 1987. *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax*. *Parasitol. Today* 3,

49–52. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(87\)90213-4](https://doi.org/10.1016/0169-4758(87)90213-4)

Georges, K., Ezeokoli, C., Auguste, T., Seepersad, N., Pottinger, A., Sparagano, O., Tasker, S., 2012. A comparison of real-time PCR and reverse line blot hybridization in detecting feline haemoplasmas of domestic cats and an analysis of risk factors associated with haemoplasma infections. *BMC Vet. Res.* 8, 103. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-103>

Gohil, S., Kats, L.M., Sturm, A., Cooke, B.M., 2010. Recent insights into alteration of red blood cells by *Babesia bovis*: Moovin' forward. *Trends Parasitol.* 26, 591–599. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.06.012>

Gonçalves Ruiz, P.M., Friche Passos, L.M., Barbosa Ribeiro, M.F., 2005. Lack of infectivity of a Brazilian *Anaplasma marginale* isolate for *Boophilus microplus* ticks. *Vet. Parasitol.* 128, 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.017>

Grillo Torrado, J.M., Pérez Arrieta, A., 1977. Nuevo tipo de fosforo resistencia en la garrapata comun del ganado bovino (*Boophilus microplus*) en la Republica Argentina. *Rev. Med. Vet. (Bogota)*. 58, 101–105.

Guglielmone, A.A., 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.* 57, 109–119.

Guglielmone, A.A., Mangold, A.J., Castelli, M.E., Suarez, V.H., Aguirre, D.H., Alcaraz, E., Cafrune, M.M., Cetrá, B., Fader, O.W., Luciani, C.A., Medus, P.D., Nava, S., 2006. Toxicidad in vitro de la cipermetrina para *Rhipicephalus (boophilus) microplus* (can.) y del diazinón para *Haematobia irritans* (l.) en la Argentina. *Rev. Inv. Agropec.* 35, 31–41.

Guillemi, E.C., De La Fourniere, S., Orozco, M., Peña Martinez, J., Correa, E., Fernandez, J., Arias, L.L., Paoletta, M., Corona, B., Pinarello, V., Wilkowsky, S.E., Farber, M.D., 2016. Molecular identification of *Anaplasma marginale* in two autochthonous South American wild species revealed an identical new genotype and its phylogenetic relationship with those of bovines. *Parasite* 9, 305. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1555-9>

Halos, L., Jamal, T., Vial, L., Maillard, R., Suau, A., Le Menach, A., Boulouis, H., Vayssier-Taussat, M., 2004. Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Vet Res* 35, 709–713. <https://doi.org/10.1051/vetres>

Hein, W.R., Mackay, C.R., 1991. Prominence of Gamma-Delta T-cells in the ruminant immune system. *Immunol. Today* 12, 30–34. <https://doi.org/10.1016/0167->

5699(91)90109-7

- Herrera, H.M., Norek, A., Freitas, T.P.T., Rademaker, V., Fernandes, O., Jansen, A.M., 2005. Domestic and wild mammals infection by *Trypanosoma evansi* in a pristine area of the Brazilian pantanal region. *Parasitol. Res.* 96, 121–126.
<https://doi.org/10.1007/s00436-005-1334-6>
- Hikosaka, K., Tsuji, N., Watanabe, Y.-I., Kishine, H., Horii, T., Igarashi, I., Kita, K., Tanabe, K., 2012. Novel type of linear mitochondrial genomes with dual flip-flop inversion system in apicomplexan parasites, *Babesia microti* and *Babesia rodhaini*. *BMC Genomics* 13, 622–630. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-622>
- Hodgson, J.L., 1992. Biology and Transmission of *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus*. *Ann. New York Acad. Sci.* 42–51.
- Horak, I.G., Camicas, J.-L., Keirans, J.E., 2002. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari:Ixodida): a world list of valid tick names. *Exp. Appl. Acarol.* 28, 27–54. <https://doi.org/10.1023/A:1025381712339>
- Hornok, S., Földvári, G., Elek, V., Naranjo, V., Farkas, R., de la Fuente, J., 2008. Molecular identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial endosymbionts in blood-sucking flies (Diptera: Tabanidae, Muscidae) and hard ticks (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 154, 354–9.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.03.019>
- Jezbera, J., Jezberová, J., Kasalický, V., Šimek, K., Hahn, M.W., 2013. Patterns of Limnohabitans microdiversity across a large set of freshwater habitats as revealed by Reverse Line Blot Hybridization. *PLoS One* 8, e58527.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058527>
- Kieser, S.T., Eriks, I.S., Palmer, G.H., 1990. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infect. Immun.* 58, 1117–1119.
- Kivaria, F.M., 2006. Estimated direct economic costs associated with tick-borne diseases on cattle in Tanzania. *Trop. Anim. Health Prod.* 38, 291–299.
<https://doi.org/10.1007/s11250-006-4181-2>
- Knowles, D., De Echaide, S.T., Palmer, G., McGuire, T., Stiller, D., McElwain, T., 1996. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2225–2230.
- Kocan, K.M., Blouin, E.F., Barbet, A.F., 2000. Anaplasmosis control. Past, present, and

- future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916, 501–9.
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Blouin, E.F., Coetzee, J.F., Ewing, S.A., 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.* 167, 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.012>
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Blouin, E.F., Garcia-Garcia, J.C., 2004. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology* 129 Suppl, S285–S300. <https://doi.org/10.1017/S0031182003004700>
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Guglielmone, A.A., Meléndez, R.D., 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 698–712. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.698>
- Kocan, K.M., Ewing, S.A., Hair, J.A., Barron, S.J., 1984. Demonstration of the inclusion appendage of *Anaplasma marginale* in nymphal *Dermacentor andersoni*. *Am. J. Vet. Res.* 45, 1800–1807.
- Kocan, K.M., Goff, W.L., Stiller, D., Claypool, P.L., Edwards, W., Ewing, S.A., Hair, J.A., Barron, S.J., 1992a. Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible calves. *J. Med. Entomol.* 29, 657–668. <https://doi.org/10.1093/jmedent/29.4.657>
- Kocan, K.M., Stiller, D., Goff, W.L., Claypool, P.L., Edwards, W., Ewing, S.A., McGuire, T.C., Hair, J.A., Barron, S.J., 1992b. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from parasitemic to susceptible cattle. *Am J Vet Res* 53, 499–507.
- Kong, F., Gilbert, G.L., 2007. Multiplex PCR-based reverse line blot hybridization assay (mPCR/RLB) - A practical epidemiological and diagnostic tool. *Nat. Protoc.* 1, 2668–2680. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.404>
- Kreier, J.P., Ristic, M., 1963. Anaplasmosis. XI. Immunoserologic characteristics of the parasites present in the blood of calves infected with the Oregon strain of *Anaplasma marginale*. *Am J Vet Res* 24, 688–696.
- Kuttler, K.L., Winward, L.D., 1984. Serologic comparisons of 4 *Anaplasma* isolates as measured by the complement-fixation test. *Vet. Microbiol.* 9, 181–186.
- Latif, A.A., Bakheit, M.A., Mohamed, A.E., Zwegarth, E., 2004. High infection rates of the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum* with *Trypanosoma theileri*.

- Onderstepoort J. Vet. Res. 71, 251–256.
- Leatch, G., 1973. Preliminary studies on the transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*. Aust. Vet. J. 49, 16–19.
- Löhr, C. V., Brayton, K.A., Shkap, V., Molad, T., Barbet, A.F., Brown, W.C., Palmer, G.H., 2002. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 operon-associated proteins during mammalian and arthropod infection. Infect. Immun. 70, 6005–6012. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.11.6005-6012.2002>
- Lorusso, V., Wijnveld, M., Majekodunmi, A.O., Dongkum, C., Fajinmi, A., Dogo, A.G., Thrusfield, M., Mugenyi, A., Vaumourin, E., Igweh, A.C., Jongejan, F., Welburn, S.C., Picozzi, K., 2016. Tick-borne pathogens of zoonotic and veterinary importance in Nigerian cattle. Parasit. Vectors 9, 217. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1504-7>
- Luciani, C., 2003. Babesiosis y anaplasmosis, la “tristeza” bovina.
- Macaluso, K.R., Sonenshine, D.E., Ceraul, S.M., Azad, A.F., 2002. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second Rickettsia. J. Med. Entomol. 39, 809–813. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.6.809>
- Mahoney, D.F., Mirre, G.B., 1974. *Babesia argentina*: the infection of splenectomized calves with extracts of larval ticks (*Boophilus microplus*). Res. Vet. Sci. 16, 112–114.
- Mahoney, D.F., Mirre, G.B., 1971. Bovine babesiosis: estimation of infection rates in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). Ann. Trop. Med. Parasitol. 65, 309–17.
- Mahoney, D.F., Ross, D.R., 1972. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. Aust. Vet. J. 48, 292–298. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1972.tb05160.x>
- Mangold, A.J., Castelli, M.E., Nava, S., Aguirre, D.H., Guglielmone, A.A., 2004. Poblaciones de la garrapata *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* resistentes a los piretroides en Córdoba y Salta, Argentina. Rev. FAVE Ciencias Vet. 3, 55–59.
- Marcelino, I., Chavez, A., Gharbi, M., Farber, M., Holzmüller, P., Martínez, D., Vachiéry, N., 2018. Protozoan and rickettsial vaccines, in: Veterinary Vaccines for Livestock. food and agriculture organization of the united nations.

- Marotta, C.R., Dos Santos, P.N., Cordeiro, M.D., Matos, P.C.M., Barros, J.H.D.S., Madeira, M.D.F., Bell-Sakyi, L., Fonseca, A.H., 2018. *Trypanosoma rhipicephalis* sp. nov. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) ticks in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol. Open* 4, 1–8.
<https://doi.org/10.1017/pao.2017.17>
- Martins, J.R., Leite, R.C., Doyle, R.L., 2008. Tripanosomatídeos como *Trypanosoma theileri* em a gado de leite *Boophilus microplus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17, 113–4.
- Mastropaolo, M., Torioni de Echaide, S., Cuatrin, A., Areche, H., Lobato, S., Mangold, A., 2009. Situación de la babesiosis y anaplasmosis de los bovinos en el sudoeste de la provincia del chaco (Argentina). *Rev. FAVE - Ciencias Vet.* 8, 29–35.
- McCosker, P., 1981. The global importance of Babesiosis, in: Ristic, M., Kreier, J.P. (Eds.), *Babesiosis*. New York, Academic Press, pp. 1–24.
- Meeus, P.F., Barbet, A.F., 2001. Ingenious gene generation. *Trends Microbiol.* 9, 353–5–6.
- Melo, V.S.P., Passos, L.M.F., Facury-Filho, E.J., Saturnino, H.M., Ribeiro, M.F.B., 2001. Natural infection of calves by *Anaplasma marginale* in dairy herds of the Metalúrgica Region, Minas Gerais. *Pesqui. Veterinária Bras.* 21, 146–150.
<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2001000400004>
- Minjauw, B., McLeod, A., 2003. Tick-borne diseases and poverty: the impact of ticks and tick-borne diseases on the livelihoods of small-scale and marginal livestock owners in India and eastern and southern Africa. DFID Animal Health Programme, Centre for Tropical Veterinary Medicine, Edinburgh.
- Monzón, C., Hoyos, C., Jara, G., 1995. Brotes de tripanosomias equina causada por *Trypanosoma evansi* en Formosa, Argentina. *Rer. Sci Tech. off. int. epiz.* 14, 747–752.
- Monzón, C., Mancebo, O., Jimenez, J., 2010. *Trypanosoma vivax* en búfalos (*Bubalus bubalis*) en Formosa, Argentina. *Vet. Argent* 27, 1–4.
- Morzaria, S.P., Latif, A.A., Jongejan, F., Walker, A.R., 1986. Transmission of a *Trypanosoma* sp. to cattle by the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Vet. Parasitol.* 19, 13–21.
- Mosqueda, J., Olvera-Ramírez, a, Aguilar-Tipacamu, G., Canto, G.J., 2012. Current advances in detection and treatment of babesiosis. *Curr. Med. Chem.* 19, 1504–18.

- Munderloh, U.G., Lynch, M.J., Herron, M.J., Palmer, A.T., Kurtti, T.J., Nelson, R.D., Goodman, J.L., 2004. Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Vet. Microbiol.* 101, 53–64.
<https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2004.02.011>
- Ndung'u, L.W., Aguirre, C., Rurangirwa, F.R., McElwain, T.F., McGuire, T.C., Knowles, D.P., Palmer, G.H., 1995. Detection of *Anaplasma ovis* infection in goats by major surface protein 5 competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 33, 675–679. <https://doi.org/PMC228012>
- Noh, S.M., Dark, M.J., Reif, K.E., Ueti, M.W., Kappmeyer, L.S., Scoles, G.A., Palmer, G.H., Brayton, K.A., 2016. Superinfection exclusion of the ruminant pathogen *Anaplasma marginale* in the tick vector is dependent on time between exposures to the strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 3217–3224.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00190-16>
- Núñez, J.L., Muñoz Cobeñas, M.E., Moltedo, H.L., 1982. *Boophilus microplus*: la garrapata común del ganado vacuno. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- O'Connor, R.M., Allred, D.R., 2000. Selection of *Babesia bovis*-infected erythrocytes for adhesion to endothelial cells coselects for altered Variant Erythrocyte Surface Antigen isoforms. *J. Immunol.* 164, 2037–2045.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.4.2037>
- Osório, A.L.A.R., Madruga, C.R., Desquesnes, M., Soares, C.O., Ribeiro, L.R.R., Costa, S.C.G. Da, 2008. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World--a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 1–13. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000100001>
- Otte, M.J., Abuabara, J.Y., 1991. Transmission of South American *Trypanosoma vivax* by the neotropical horsefly *Tabanus nebulosus*. *Acta Trop.* 49, 73–76.
- Palmer, G., Rurangirwa, F., Kocan, K., Brown, W., 1999. Molecular Basis for Vaccine Development against the Ehrlichial Pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitol. Today* 15, 281–286. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01469-6](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01469-6)
- Palmer, G.U.Y.H., Rurangirwa, F.R., McElwain, T.F., Al, P.E.T., Icrobiol, J.C.L.I.N.M., 2001. Strain Composition of the Ehrlichia *Anaplasma marginale* within Persistently Infected Cattle , a Mammalian Reservoir for Tick Transmission 39, 631–635.
<https://doi.org/10.1128/JCM.39.2.631>
- Paoletta, M.S., López Arias, L., de la Fournière, S., Guillemi, E.C., Luciani, C.,

- Sarmiento, N.F., Mosqueda, J., Farber, M.D., Wilkowsky, S.E., 2017. Epidemiology of Babesia, Anaplasma and Trypanosoma species using a new expanded reverse line blot hybridization assay. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 9, 155–163.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.08.011>
- Patton, T.G., Dietrich, G., Brandt, K., Dolan, M.C., Piesman, J., Gilmore Jr., R.D., 2012. Saliva, salivary gland, and hemolymph collection from Ixodes scapularis ticks. *J. Vis. Exp.* 1–6. <https://doi.org/10.3791/3894>
- Perry, B.D., 1996. Epidemiological indicators and their application to the control of tick-borne diseases, in: *Manual on Tick and Tick-Borne Disease Control*. FAO, Rome.
- Potgieter, E.T., 1979. Epizootiology and control of Anaplasmosis in South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 504, 367–372.
- Potgieter, E.T., Stoltsz, W.H., 2004. Bovine anaplasmosis, in: Press, O.U. (Ed.), *Infectious Diseases of Livestock*. Cape Town, p. 2159.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D., 2007. *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*, 10th ed. Saunders Ltd, New York.
- Ravel, S., Grébaud, P., Cuisance, D., Cuny, G., 2003. Monitoring the developmental status of Trypanosoma brucei gambiense in the tsetse fly by means of PCR analysis of anal and saliva drops. *Acta Trop.* 88, 161–165.
[https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(03\)00191-8](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(03)00191-8)
- Ribeiro, M.F.B., Lima, J.D., 1996. Morphology and development of Anaplasma marginale in midgut of engorged female ticks of Boophilus microplus. *Vet. Parasitol.* 61, 31–39. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(95\)00800-4](https://doi.org/10.1016/0304-4017(95)00800-4)
- Richey, E.J., 1991. Bovine anaplasmosis.
- Ristic, M., Watrach, A.M., 1963. Anaplasmosis. VI. Studies and a hypothesis concerning the cycle of development of the causative agent. *Am J Vet Res* 24, 267–276.
- Rosa, R.D., Capelli-Peixoto, J., Mesquita, R.D., Kalil, S.P., Pohl, P.C., Braz, G.R., Fogaça, A.C., Daffre, S., 2016. Exploring the immune signalling pathway-related genes of the cattle tick Rhipicephalus microplus: From molecular characterization to transcriptional profile upon microbial challenge. *Dev. Comp. Immunol.* 59, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.018>

- Ruano, G., Fenton, W., Kidd, K., 1989. Biphasic amplification of very dilute DNA samples via "booster" PCR. *Nucleic Acids Res.* 5, 5407.
- Rudakov, N. V, Shpynov, S.N., Samoilenko, I.E., Tankibaev, M. a, 2003. Ecology and epidemiology of spotted fever group Rickettsiae and new data from their study in Russia and Kazakhstan. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990, 12–24.
- Ruybal, P., Moretta, R., Perez, A., Petrigh, R., Zimmer, P., Alcaraz, E., Echaide, I., Torioni de Echaide, S., Kocan, K.M., de la Fuente, J., Farber, M., 2009. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in Argentina. *Vet. Parasitol.* 162, 176–180.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.02.006>
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarmiento, N., 2013. Vacunas para la babesiosis y anaplasmosis. *Not. y Coment.* 504, 1–3.
- Schaub, G., 2009. Interactions of Trypanosomatids and Triatomines, in: Casas, S.J.S. and J. (Ed.), *Advances in Insect Physiology.* Burlington: Academic Press, pp. 177–242.
- Seddon, H., Albiston, H., 1966. Protozoan and Various Diseases, in: Commonwealth of Australia, D. of H. (Ed.), *Diseases of Domestic Animals in Australia.* pp. 3–8.
- Shastri, U. V, Deshpande, P.D., 1981. *Hyalomma anatolicum anatolicum* (Koch, 1844) as a possible vector for transmission of *Trypanosoma theileri*, Laveran, 1902 in cattle. *Vet. Parasitol.* 9, 151–5.
- Shimada, M.K., Yamamura, M.H., Kawasaki, P.M., Tamekuni, K., Igarashi, M., Vidotto, O., Vidotto, M.C., 2004. Detection of *Anaplasma marginale* DNA in Larvae of *Boophilus microplus* Ticks by Polymerase Chain Reaction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1026, 95–102. <https://doi.org/10.1196/annals.1307.012>
- Simpson, L., Sbicego, S., Aphasizhev, R., 2003. Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria : A complex business. *RNA* 9, 265–276.
<https://doi.org/10.1261/rna.2178403>
- Smith, R.D., Levy, M.G., Kuhlenschmidt, M.S., Adams, J.H., Rzechula, D.L., Hardt, T.A., Kocan, K.M., 1986. Isolates of *Anaplasma marginale* not transmitted by ticks. *Am J Vet Res* 47, 127–129.
- Soltani, M., Pirali, E., Shayan, P., Eckert, B., Rouholahi, S., Sadr, S.N., 2012.

Development of a Reverse Line Blot Hybridization method for Detection of some Streptococcal/Lactococcal Species, the causative agents of Zoonotic Streptococcosis/Lactococcosis in farmed fish. *Iran. J. Microbiol.* 4, 70–4.

Sparagano, O.A.E., Allsopp, M.T.E.P., Mank, R.A., Rijpkema, S.G.T., Figueroa, J. V., Jongejan, F., 1999. Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari - Ixodidae): A review. *Exp. Appl. Acarol.* 23, 929–960.
<https://doi.org/10.1023/A:1006313803979>

Späth, E.J.A., Guglielmo, A.A., Signorini, A.R., Mangold, A.J., 1994. Estimación de las pérdidas económicas directas producidas por la garrapata *Boophilus microplus* y las enfermedades asociadas en la Argentina. *Therios* 23, 389–396.

Stevens, J.R., Brisse, S., 2004. Systematics of trypanosomes of medical and veterinary importance, in: Maudlin, I., Holmes, P. H., Miles, M.A. (Ed.), *The Trypanosomiasis*. CABI Publishing, United Kingdom, pp. 1–23.
<https://doi.org/10.1079/9780851994758.0001>

Stich, R.W., Kocan, K.M., Palmer, G.H., Ewing, S.A., Hair, J.A., Barron, S.J., 1989. Transstadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentor variabilis*. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1377–80.

Sumba, A.L., Mihok, S., Oyieke, F.A., 1998. Mechanical transmission of *Trypanosoma evansi* and *T. congolense* by *Stomoxys niger* and *S. taeniatus* in a laboratory mouse model. *Med. Vet. Entomol.* 12, 417–422. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.1998.00131.x>

Swift, B.L., Paumer, R.J., 1976. Vertical transmission of *Anaplasma marginale* in cattle. *Theriogenology* 6, 515–521. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(76\)90119-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(76)90119-9)

Tebele, N., McGuire, T.C., Palmer, G.H., 1991. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infect. Immun.* 59, 3199–204.

Thekiso, O., Honda, T., Fujita, H., Battsetseg, B., Hatta, T., Fujisaki, K., Sugimoto, C., Inoue, N., 2007. A trypanosome species isolated from naturally infected *Haemaphysalis hystricis* ticks in Kagoshima Prefecture, Japan. *Parasitology* 134, 967–74. <https://doi.org/10.1017/S0031182007002375>

Thompson, C., Baravalle, M., Valentini, B., Torioni de Echaide, S., Echaide, I.E., 2006. Dinámica de la infección experimental de dos cepas de *Babesia bigemina* con diferente fenotipo, en bovinos, in: *Memorias Del XX Congreso Panamericano de*

- Ciencias Veterinarias (PANVET). Santiago de Chile, p. 304.
- Thompson, C.K., Roa, J.C., 1978. Transmisión de *Anaplasma marginale* por la garrapata *Boophilus microplus*. Rev. Inst. Colomb. Agrop 13, 131–13.
- Torioni de Echaide, S., Knowles, D.P., McGuire, T.C., Palmer, G.H., Suarez, C.E., 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.
- Vallejo, G.A., Suárez, Y., Olaya, J.L., Gutiérrez, S.A., Carranza, J.C., 2015. *Trypanosoma rangeli*: un protozoo infectivo y no patógeno para el humano que contribuye al entendimiento de la transmisión vectorial y la infección por *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. Rev. Acad. Colomb. Ciencias Exactas, Físicas y Nat. 39, 111–122.
<https://doi.org/10.18257/raccefyn.143>
- Vallejo Esquerre, E., Herndon, D.R., Alpírez Mendoza, F., Mosqueda, J., Palmer, G.H., 2014. *Anaplasma marginale* superinfection attributable to pathogen strains with distinct genomic backgrounds. Infect. Immun. 82, 5286–92.
<https://doi.org/10.1128/IAI.02537-14>
- Vidotto, M.C., Kano, S.F., Gregori, F., Headley, S.A., Vidotto, O., 2006. Phylogenetic analysis of *Anaplasma marginale* strains from Paraná State, Brazil, using the *msp1alpha* and *msp4* genes. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health 53, 404–11. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2006.00984.x>
- Villa, A., Gutierrez, C., Gracia, E., Moreno, B., Chacón, G., Sanz, P.V., Büscher, P., Touratier, L., 2008. Presence of *Trypanosoma theileri* in Spanish Cattle. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1149, 352–4. <https://doi.org/10.1196/annals.1428.016>
- Viseshakul, N., Kamper, S., Bowie, M. V., Barbet, A.F., 2000. Sequence and expression analysis of a surface antigen gene family of the rickettsia *Anaplasma marginale*. Gene 253, 45–53. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00241-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00241-9)
- Ward, W.H., Hill, M.W., Mazlin, I.D., Foster, C.K., 1984. Anaemia associated with a high parasitaemia of *Trypanosoma theileri* in a dairy cow. Aust. Vet. J. 61, 324.
- Wickwire, K.B., Kocan, K.M., Barron, S.J., Ewing, S.A., Smith, R.D., Hair, J.A., 1987. Infectivity of three *Anaplasma marginale* isolates for *Dermacentor andersoni*. Am J Vet Res 48, 96–99.

- Wilkowsky, S.E., 2018. Trypanosomatids of domestic animals, in: Florin-Christensen, M., Schnittger, L. (Eds.), *Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-70132-5>
- Ybañez, A.P., Mingala, C.N., Ybañez, R.H.D., 2017. Historical review and insights on the livestock tick-borne disease research of a developing country: The Philippine scenario. *Parasitol. Int.* In press. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.11.009>
- Zaugg, J.L., 1985. Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation. *Am. J. Vet. Res.* 46, 570–2.
- Zaugg, J.L., Kuttler, K.L., 1984. Bovine anaplasmosis: in utero transmission and the immunologic significance of ingested colostrum antibodies. *Am. J. Vet. Res.* 45, 440–3.