

**DETECCIÓN MICROBIOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Anaplasma* spp. EN  
GANADO BOVINO DEL MUNICIPIO DE OVEJAS SUCRE-COLOMBIA.**

**AURIS CATERINE CARRILLO MARTINEZ**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE  
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
SINCELEJO – SUCRE  
2017**

**DETECCIÓN MICROBIOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Anaplasma* spp. EN  
GANADO BOVINO DEL MUNICIPIO DE OVEJAS SUCRE-COLOMBIA.**

**AURIS CATERINE CARRILLO MARTINEZ**

**Trabajo de grado como requisito para optar al título de Bióloga**

**Director: ALVEIRO JOSÉ PÉREZ DORIA**

**BSc., M.Sc. Microbiología Tropical, Estudiante de Ph.D**

**Codirector: EDUAR ELÍAS BEJARANO MARTÍNEZ**

**Bacteriólogo, MSc. Microbiología Tropical, Ph.D Medicina Tropical**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE**

**FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS**

**PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

**SINCELEJO – SUCRE**

**2017**

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

---

**Firma del primer jurado**

---

**Firma del segundo jurado**

**CIUDAD Y FECHA:**

## DEDICATORIA

*A Dios por permitirme culminar con éxito esta hermosa etapa de mi vida, etapa en la cual pude entender y valorar cada una de las bendiciones con las cuales él me rodea.*

*A mis padres Margoth Martínez Vergara y Javier Carrillo Múnera porque han creído en mí para cumplir esta y muchas metas más.*

*A mi hermano Javier carrillo Martínez.*

*A mi amada hermana Mary Carrillo Martínez por ser esa persona que siempre me ha apoyado incondicionalmente y por regalarme la mayor motivación de mis logros  
Emilio José Flórez Carrillo al cual le dedico este trabajo investigativo.*

*Auris Carrillo Martínez*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la sabiduría y constancia para terminar este trabajo.

A la Universidad de Sucre por ser el ente que me formó como profesional.

A mi tutor Alveiro Pérez Doria por compartirme sus conocimientos, y por el apoyo brindado para la culminación de este trabajo investigativo.

A mi codirector Eduar Elías Bejarano Martínez, por su colaboración, y su cordial acogida.

A Wendy Barboza Assia por su comprensión y colaboración durante este proceso.

A Matilde Rivero, José Vergara, al Doctor Luis Paternina por ayudarme durante esta investigación.

Al grupo de investigaciones Biomédicas

A COLCIENCIAS por financiar el proyecto denominado “Incriminación de reservorios de *Leishmania* spp. en un foco urbano de Leishmaniasis cutánea de los Montes de María, Costa Caribe Colombiana. Código 112956934732.

## CONTENIDO

1. MARCO REFERENCIAL.....	17
1.1 Marco teórico conceptual .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.1.1 Clasificación taxonómica de las bacterias del género <i>Anaplasma</i> . .....	17
1.1.2 Morfología de <i>Anaplasma marginale</i> .....	18
1.1.3 Vectores .....	19
1.1.4 Ciclo de vida en el invertebrado <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .	19
1.1.5 Trasmisión de <i>Anaplasma marginale</i> . .....	20
1.1.6 Ciclo de vida en el vertebrado bovino .....	22
1.1.7 Manifestaciones clínicas de la anaplasmosis bovina .....	23
1.1.8 Diagnóstico de anaplasmosis bovina .....	24
1.1.9 Distribución de anaplasmosis bovina .....	26
1.1.10 Control de la enfermedad.....	26
1.1.11 Tratamiento .....	27
1.2 Marco de antecedentes.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
2. OBJETIVOS .....	29
2.1 Objetivo general.....	29
2.2 Objetivos específicos .....	29
1. METODOLOGÍA .....	29
3.1 Área de estudio.....	29
3.2 Tipo de estudio y tamaño de la muestra .....	30
3.3 Estudio epidemiológico. ....	30
3.4 Recolección de muestras sanguíneas .....	31
3.5 Estimación de frecuencia de bacterias del género <i>Anaplasma</i> en población bovina del municipio Ovejas, Sucre.....	32
3.5.1 Análisis microbiológicos para la búsqueda de infección con bacterias del género <i>Anaplasma</i> en bovinos del municipio de Ovejas, Sucre.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
3.6 Detección del material genético de las bacterias de la familia Anaplasmataceae en población bovina del municipio de Ovejas, Sucre. ....	32
3.6.1. Extracción de ADN genómico .....	32
3.6.2 Cuantificación de ADN extraído de sangre periférica.....	33
3.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen que codifica la subunidad ribosomal pequeña para la detección del material genético de las bacterias de la familia Anaplasmataceae en población bovina del municipio de Ovejas, Sucre.....	33

3.6.4	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen que codifica las proteínas de choque térmico (GroEL) para la detección del material genético de las especies del género <i>Anaplasma</i> en población bovina del municipio de Ovejas, Sucre.....	34
3.7	Visualización de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa.....	34
3.8	Secuenciación de ADN.....	35
3.9	Análisis de secuencias nucleotídicas.....	35
3.9.1	Edición de secuencias.....	35
3.9.2	Alineamiento múltiple de secuencias .....	35
3.9.3	Análisis filogenético.....	36
3.10	Relación entre los factores demográficos (edad, sexo y raza) y la prevalencia de anaplasmosis en la población estudiada. ....	36
Análisis de datos .....		36
3.11	Socialización de resultados con los productores ganaderos .....	36
4.	RESULTADOS.....	37
4.1	Población bovina estudiada.....	37
4.2	Examen clínico .....	37
4.3	Análisis microbiológico.....	38
4.4	Extracción y cuantificación de ADN genómico total.....	38
4.5.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la subunidad Ribosomal pequeña de 16S. ....	39
4.6	Análisis de las secuencias nucleotídicas de la Subunidad Ribosomal pequeña (16S rRNA). ....	39
4.7	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen que codifica las proteínas de choque térmico (GroEL).....	41
4.8	Análisis de las secuencias nucleotídicas de genes de proteínas de choque térmico (GroEL). ....	42
4.7	Análisis estadístico .....	44
4.7.1	Evaluación de métodos diagnósticos .....	44
4.7.2	Relación entre los parámetros demográficos y la prevalencia de la infección con <i>Anaplasma marginale</i> .....	45
5.	DISCUSIÓN.....	48
6.	CONCLUSIONES .....	54
7.	RECOMENDACIONES .....	55
8.	BIBLIOGRAFIA .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

**Únicamente los autores son los responsables de las ideas expuestas en este trabajo (artículo 12, resolución 02-03)**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ubicación geográfica del municipio de Ovejas, Departamento de Sucre, Colombia .....	30
<b>Figura 4.</b> Árbol consenso para la familia Anaplasmataceae, derivado del análisis de la secuencia de la región que codifica para el 16S rRNA.....	41
<b>Figura 5.</b> Árbol consenso para la identificación de especies del género <i>Anaplasma</i> , derivado del análisis filogenético de la región GroEL.....	44

## LISTA DE IMAGENES

<b>Imagen 1.</b> Eritrocito infectado con bacterias del género <i>Anaplasma</i> ..... <b>¡Error!</b> <b>Marcador no definido.</b>	
<b>Imagen 2.</b> Ciclo de vida de <i>Anaplasma marginale</i> .....	23
<b>Imagen 5.</b> Toma de muestra sanguínea a partir de la vena yugular .....	31
<b>Imagen 8.</b> Observación de <i>Anaplasma</i> spp. en extendido de sangre periférica a 100X.....	38
<b>Imagen 9.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos amplificados por PCR de la subunidad ribosómica pequeña de 16S.....	39
<b>Imagen 10.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % de los productos amplificados por PCR del gen que codifica para proteínas de choque térmico GroEL.. .....	42

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Índice Kappa de Cohen para los métodos diagnósticos utilizados. ....	44
<b>Tabla 2.</b> Análisis de relación entre la frecuencia y la prevalencia de la infección respecto a los parámetros demográficos mediante la prueba Chi-cuadrado y Fisher. ....	45
<b>Tabla 3.</b> Análisis de relación entre la prevalencia de la infección respecto a variables edad, raza y zona (rural, periurbana, urbana) mediante la prueba de Fisher.....	47
<b>Tabla 4.</b> Valores de prueba Fischer relacionando la prevalencia de la infección con la zona (rural, periurbana, urbana). ....	47
<b>Tabla 5.</b> Valores de prueba Fischer relacionando la prevalencia de la infección con la raza (parda, cebú y cruce).....	48

## RESUMEN

Uno de los obstáculos más relevantes de la ganadería Colombiana son las enfermedades transmitidas por ectoparásitos en particular la anaplasmosis bovina, una enfermedad causada por *Anaplasma marginale*. Esta infección se caracteriza por presentar amplia distribución mundial y por alcanzar especial importancia económica, debido a la disminución de la producción de carne y leche, mortalidad, pérdida de la eficiencia reproductiva por abortos, infertilidad y disminución de la natalidad. La principal actividad económica del municipio de Ovejas está basada en las explotaciones agrícolas y ganaderas, sin embargo no se ha registrado la presencia de la enfermedad en bovino, por ello el presente trabajo determinó la prevalencia de infección con *Anaplasma* spp. en bovinos del municipio de Ovejas, Sucre, Colombia. Con base en el registro suministrado por la Federación Colombiana de Ganaderos (FEDEGAN), se escogieron por conveniencia 194 bovinos pertenecientes a 20 hatos ganaderos. Se realizó diagnóstico microbiológico de la infección mediante frotis sanguíneo teñido con Wright y detección molecular del ADN de las bacterias del género *Anaplasma* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) del gen que codifica para la subunidad 16S Ribosomal (16S rRNA). La identificación de especie se realizó con base en el análisis de la secuencia del gen que codifica las proteínas de choque térmico (GroEL). Se determinó que existe un grado de concordancia pobre ( $K= 0,152$ ) entre ambos métodos diagnósticos. Se encontró una frecuencia de infección del 9,74% ( $n:19/194$ ) por métodos microbiológicos, y por PCR-GroEL se encontró una prevalencia de infección del 30,77% ( $n:60/194$ ). Los análisis derivados de las reconstrucciones filogenéticas basados en la secuencia del gen GroEL, indican que *A. marginale* es la especie infectante en los bovinos del municipio de Ovejas. A partir de los análisis estadísticos entre los factores demográficos y la prevalencia de la infección, se encontró diferencia estadística entre la raza ( $F=0,004$ ;  $P< 0,005$ ), pérdida de peso ( $5,0734$ ;  $P<0,05$ ) y zona geográfica donde fueron capturadas las muestras de sangre ( $F= 0,01$ ;  $P< 0,005$ ).

**Palabras clave:** Anaplasmosis, PCR, frotis de sangre, bovinos.

## **ABSTRACT**

One of the most important obstacles of Colombian cattle ranch are the diseases transmitted by ectoparasites, in particular bovine anaplasmosis, a disease caused by *Anaplasma marginale*. This infection is characterized by a wide global distribution and economic importance, due to the decrease in meat and milk production, mortality, loss of reproductive efficiency because of abortion, infertility and decrease in the birth rate. The main economic activity from the municipality of Ovejas is based on agricultural and livestock farms, however the presence of the disease in cattle has not been recorded. So the present study determined the prevalence of infection with *Anaplasma* spp. in cattle from the municipality of Ovejas, Sucre, Colombia. Based on the register supplied by the Colombian Federation of Cattlemen (FEDEGAN), 194 cattle belonging to 20 cattle herds were selected for convenience. Microbiological diagnosis of Wright-stained blood smear infection and molecular detection of *Anaplasma* DNA by Polymerase Chain Reaction (PCR) method based on 16S rRNA. The identification of the species is based on the analysis of the sequence of the gene encoding the heat shock proteins (GroEL). It was determined that there is a degree of poor agreement ( $K = 0.152$ ) between both diagnostic methods. An infection rate of 9.74% ( $n: 19/194$ ) was found by microbiological methods, and by GroEL-PCR found a prevalence of infection of 30.77% ( $n: 60/194$ ). Analyzes derived from the phylogenetic reconstructions based on the GroEL gene sequence indicate that *A. marginale* is the infecting species in cattle in the municipality from Ovejas.

**Key words:** Anaplasmosis, PCR, blood smear, bovine.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades bacterianas transmitidas por vectores están distribuidas en numerosas zonas alrededor del mundo, representan un importante problema económico, de Salud Pública y veterinaria, debido a que afectan un amplio grupo de especies animales de interés comercial; especialmente, aquellos que se distribuyen en zonas tropicales y subtropicales, donde las condiciones ecológicas y ambientales son favorables para el desarrollo de estos microorganismos y sus vectores (Márquez-Quivera, 2000). Dentro de estas enfermedades, la anaplasmosis bovina causada por *A. marginale* (Theiler, 1910), una bacteria intracelular obligada que pertenece al orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceae, género *Anaplasma*. Esta enfermedad representa uno de los retos más importantes en la producción ganadera, puesto que es responsable de generar altos índices de morbilidad y mortalidad en el ganado y de crear uno de los principales limitantes para el desarrollo de la ganadería; en los Estados Unidos mueren anualmente por anaplasmosis entre 50.000 y 100.000 animales, con un costo aproximado de 300 millones de dólares (Palmer & McElwain, 1995); mientras que en América Latina las pérdidas que generan en el sector superan en promedio los 800 millones de dólares anuales (Betancourt, 1995).

Colombia es el cuarto productor de ganado después de Brasil, Argentina y México, con aproximadamente 22,5 millones de bovinos (ICA, 2016). A pesar de la importancia de este sector para la economía Nacional, y aunque se disponen de métodos efectivos de diagnóstico, tratamiento y control de ectoparásitos vectores de hemoparasitosis, todavía estas enfermedades representan un importante problema de salud veterinaria, especialmente por los costos del manejo de animales infectados los cuales se estiman en 363.295.504 millones de pesos (ICA, 2013).

La anaplasmosis bovina es transmitida por la picadura de dípteros hematófagos y garrapatas de los géneros *Dermacentor*, *Ixodes*, y *Rhipicephalus* (Katherine Kocan, De La Fuente, Blouin, & Garcia-Garcia, 2004). Dentro de las hemoparasitosis registradas en bovinos de Colombia, la anaplasmosis es quizás la más importante

(Fedegan, 2013), por ejemplo, en un estudio realizado en el 2005, en el Bajo Cauca y Alto San Jorge, se determinó que la frecuencia de infección con *Anaplasma* spp. fue del 61,8% (n:316/511), mientras que la infección con parásitos del género *Trypanosoma* spp. y *Babesia* spp. alcanzó valores del 33.3% (n:170/511) y 4.9% (n:25/511), respectivamente (Herrera et al., 2008).

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es la especie de mayor importancia veterinaria y se ha convertido en un problema para el sector ganadero (Kocan et al., 2010). Esta especie juega un papel importante como vector de *A. marginale*. En Colombia se ha calculado que las pérdidas relacionadas con garrapatas y moscas para la ganadería ascienden a 76.713 millones de pesos anuales (Benavides et al., 2001). Es importante resaltar que en las últimas cinco décadas se han producido cambios en la epidemiología de la enfermedad, los cuales han sido asociados con cambios en la distribución y abundancia de los vectores como consecuencias del calentamiento global (Vecino et al., 2013). En este sentido, los estudios de vigilancia epidemiológica de vectores, han registrado la presencia de *R. microplus* en áreas ubicadas por encima de los 2.900 msnm, donde hace cuatro décadas se consideraban libres de estos hemoparásitos (Benavides, Vizcaino, Britto, Romero, & Rubio, 2000).

Por su parte en la Costa Caribe Colombiana se ha reportado la presencia de anaplasmosis; por ejemplo, estudios realizados en zonas ganaderas del Departamento de Córdoba se encontró que el 11,18% de los búfalos analizados en tal población fue positivo para infección con bacterias del género *Anaplasma* (Cardona Álvarez, Ensuncho Hoyos, & Vergara Garay, 2012), así mismo, en 2015, estudios realizados en cuatro explotaciones ganaderas en Córdoba se registraron una prevalencia del 20,61 % de *Anaplasma* spp. en bovinos gyr puros (Martínez, Álvarez, & Vilorio, 2015); por otra parte, en el Departamento de Sucre, en un estudio realizado en el municipio de Toluviejo, se encontró una prevalencia de infección del 90% en ovinos (Martínez Sierra, 2010).

En el Departamento de Sucre, hasta la fecha se desconoce la circulación y prevalencia de infección con bacterias del género *Anaplasma* en bovinos, lo que

evita calcular el impacto económico causado por esta infección en los diferentes hatos ganaderos. Considerando el importante problema de Salud veterinaria que representa la anaplasmosis bovina en la ganadería del país, en el presente trabajo se realizó búsqueda microscópica combinada con reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el objetivo determinar la prevalencia de infección de anaplasmosis bovina en zonas ganaderas del municipio de Ovejas, este conocimiento permitirá diseñar, evaluar e implementar mecanismos de control y prevención tendientes a reducir los casos y pérdidas producidas por la enfermedad.

# 1. MARCO REFERENCIAL

## Marco teórico conceptual

### 1.1.1 Clasificación taxonómica de las bacterias del género *Anaplasma*.

El agente etiológico de anaplasmosis bovina es una bacteria intracelular obligada que pertenece al Super Reino Bacteria, Orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceae.

Super Reino: Bacteria

Clase: Proteobacteria

Subclase: Alfa

Orden: Rickettsiales

Familia: Anaplasmataceae

Género: *Anaplasma*

Especie: *A. marginale*

Los organismos del orden Rickettsiales son  $\alpha$ -Proteobacterias, intracelulares que crecen libres en el citoplasma de células eucariotas de hospederos (Kocan et al., 2003). Inicialmente fueron clasificados de acuerdo a su morfología, ecología, epidemiología, y características clínicas, sin embargo, recientemente se propuso un nuevo esquema de clasificación basado en análisis filogenéticos de la secuencia del gen que codifica para la subunidad 16S Ribosomal (16SrRNA), y genes que codifican para proteínas de superficie (groESL), como resultado de estos estudios se propuso reorganizar la familia Ehrlichiaaceae de tal forma que este taxón fue sustituido por la familia Anaplasmataceae, finalmente el orden Rickettsiales quedó conformado por la familia Anaplasmataceae y Rickettsiaceae (Dumler et al., 2001).

Los análisis filogenéticos han apoyado la formación de cuatro grupos dentro de la familia Anaplasmataceae, dentro de los cuales se encuentra el género *Anaplasma*, cuyos miembros exhiben una similitud mínima del 96,1%; así mismo se encuentra el género *Ehrlichia*, cuyos miembros exhiben una similitud mínima del 97,7%;

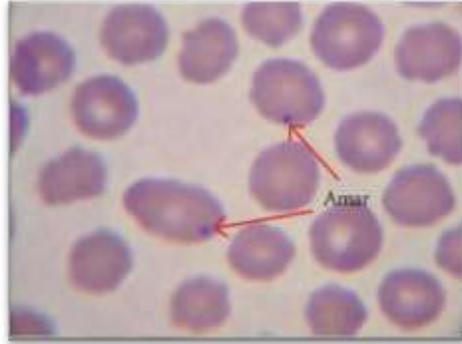
mientras que entre los miembros del género *Wolbachia* y el género *Neorickettsia* se observa una similitud 95,6% y 94,9% respectivamente (Dumler et al., 2001). Todas estas bacterias se caracterizan por replicarse exclusivamente dentro de vacuolas unidas a la membrana en el citoplasma de la célula hospedera (Rikihisa, 1991).

A excepción del género *Wolbachia* cada especie de la familia Anaplasmataceae puede replicarse en hospederos vertebrados, generalmente dentro de células derivadas de estructuras mesodérmicas, en particular células hematopoyéticas maduras e inmaduras (Barbet, 1995; Rikihisa, 1991). Estudios realizados en artrópodos han permitido identificar algunos vectores invertebrados involucrados en la transmisión de estos microorganismos principalmente garrapatas o trematodos con excepción de las especies del género *Wolbachia*, que se encuentran en una alta variedad de hospederos invertebrados y helmintos (Barbet, 1995; Rikihisa, 1991; Zhou, Rousset, & O'Neill, 1998).

El género *Anaplasma* solo agrupaba patógenos que infectaban a rumiantes (*A. marginale*, *A. Centrale* (Theiler, 1911) y *A. ovis* (Bevan, 1912); sin embargo después de la reclasificación en el año 2001 este género se amplió y actualmente incluye: *A. phagocytophilum* (Gordon, Brownlee, & Wilson, 1940), un taxón que resultó de la unificación de tres organismos previamente clasificados como especies del género *Ehrlichia* (*Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, y el agente identificado de ehrlichiosis granulocítica humana). El género *Anaplasma* también incluye a *A. bovis* (Donatien & Lestoquard, 1936) anteriormente denominado como *E. bovis*, y *A. platys* (Harvey, Simpson, & Gaskin, 1978) anteriormente *E. platys*.

### **1.1.2 Morfología de *A. marginale*.**

*A. marginale* es una bacteria intraeritrocitaria gram negativa, que al ser visualizada al microscopio se observa un aspecto de una inclusión redondeada pequeña de aproximadamente 0,3-1µm, generalmente localizada alrededor del margen del eritrocito; consta de un cuerpo inicial, que invade el eritrocito y posteriormente se multiplica para formar inclusiones con 4 a 8 cuerpos iniciales (Rodríguez Camarillo, García Ortíz, Aboytes Torres, Cantó Alarcón, & Barigye, 2003). (Imagen 1).



**Imagen 1.** Eritrocito infectado por bacterias del género *Anaplasma* (Benavides et al., 2012)

### 1.1.3 Vectores

Las garrapatas cumplen un papel importante en la epidemiología de la enfermedad, se estima que al menos 20 especies han sido incriminadas en la transmisión de *A. marginale* alrededor del mundo; dentro de estas, los miembros de los géneros *Dermacentor*, *Ixodes* y *Rhipicephalus* son los taxones más representativos (Kocan et al., 2004).

En Colombia la garrapata *R. microplus*, es el principal vector de *A. marginale*, tiene una amplia distribución, que va desde el nivel del mar hasta los 2.800 metros de altitud; sin embargo, en las últimas cinco décadas, el impacto ocasionado por el calentamiento global, ha ampliado la distribución geográfica de estos artrópodos vectores y de los organismos patógenos que transmiten (Vecino et al., 2013), los cuales han sido registrados en áreas situadas por encima de los 2.900 msnm, que cuatro décadas atrás eran consideradas libres de ectoparásitos sanguíneos (Corpoica, 2008; Pulido-Herrera, Rudas-LI, Betancourt, Grant, & Vilchez, 2015; Vecino et al., 2013). Este hecho indica que existe un panorama de riesgo de transmisión de anaplasmosis bovina en poblaciones altamente susceptibles.

### 1.1.4 Ciclo de vida en el invertebrado *R. microplus*.

Se ha demostrado que *A. marginale* es transmitida por garrapatas de la familia *Ixodidae*, entre sus miembros *R. microplus*, es quizás el vector más importante en

los países tropicales y subtropicales del mundo (Futse, Ueti, Knowles, & Palmer, 2003). El ciclo de desarrollo de *A. marginale* en garrapatas es sincrónico con el ciclo de alimentación (Kocan et al., 1992b). Después de la ingesta de sangre realizada por el vector *A. marginale* invade y coloniza el epitelio del intestino medio mediante un proceso de fagocitosis formando el primer sitio de infección (Blouin, Saliki, de la Fuente, Garcia-Garcia, & Kocan, 2003). Durante el transcurso de la infección en las células epiteliales del intestino medio de la garrapata *A. marginale* se desarrolla dentro de vacuolas o forma colonias unidas a la membrana; la primera forma de *A. marginale* observada dentro de la colonia se denomina forma reticulada, la cual se divide por fisión binaria y forma grandes colonias que pueden albergar cientos de microorganismos (equivalentes a  $10^6$  organismos por intestino). Luego de esta replicación inicial en el epitelio del intestino medio, *A. marginale* ingresa a la hemolinfa e invade las células epiteliales de la glándula salival. El desarrollo de la infectividad necesita una replicación final que produce  $10^6$  microorganismos por glándula salival, además es necesario que la garrapata se fije efectivamente al vertebrado susceptible e inocule las bacterias durante la ingesta (Kocan et al., 2003).

#### **1.1.5 Trasmisión de *A. marginale*.**

El estudio de los mecanismos de transmisión de *A. marginale* es de fundamental importancia para instaurar un control efectivo de la enfermedad; son amplias y muy variadas las formas en que el microorganismo puede transmitirse y dependen de la presencia de vectores, la existencia de animales susceptibles y condiciones ecológicas favorables (Palmer & McElwain, 1995). La transmisión de *A. marginale* puede efectuarse biológicamente por garrapatas o mecánicamente por moscas hematófagas o fómites contaminados con sangre (Scoles, Broce, Lysyk, & Palmer, 2005). Sin embargo, investigaciones recientes han documentado que la transmisión biológica por garrapatas es más eficiente que la transmisión mecánica por la mosca de los establos (*Stomoxys calcitrans*) (Baldacchino et al., 2013b).

#### **1.1.5.1 Trasmisión biológica de *A. marginale*.**

La transmisión biológica se lleva a cabo mediante la picadura de garrapatas, esta puede ocurrir en distintas fases de su desarrollo: interestadial, cuando la infección inicial en garrapata con *A. marginale* se adquiere en un estadio previo al estadio que pica y transmite los microorganismos durante la ingesta; intraestadial, ocurre cuando una garrapata infectada, en cualquier fase de desarrollo (larva, ninfa o adulto), se alimenta del hospedero susceptible (Doudier, Olano, Parola, & Brouqui, 2010; Kocan, De la Fuente, Blouin, Coetzee, & Ewing, 2010) y transovárica, cuando una hembra infectada, transmite la bacteria a los óvulos y por ende a los huevos en desarrollo, de tal forma que las larvas que emergen están en capacidad de transmitir los patógenos al siguiente hospedero (Baldrige et al., 2009; Ortiz et al., 2014).

#### **1.1.5.2 Trasmisión mecánica de *A. marginale*.**

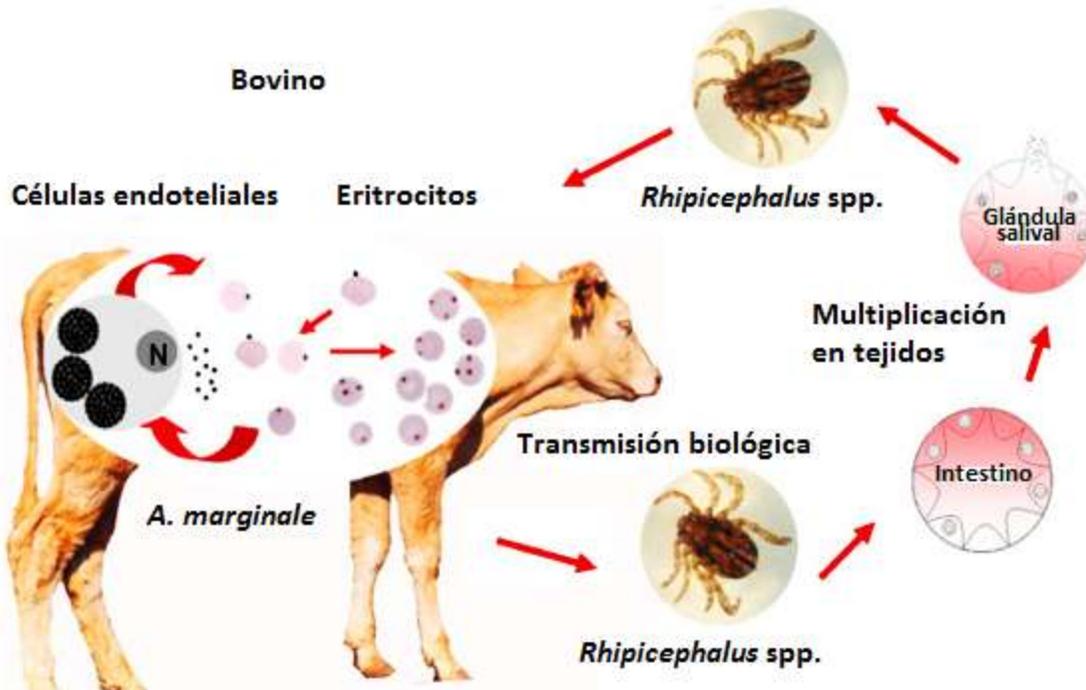
En ensayos de transmisión experimental de bacterias del género *Anaplasma* se ha encontrado que al menos doce especies de dípteros exhiben la capacidad de transmitir de forma mecánica estas bacterias; dentro de estos se encuentra la mosca de los establos *Stomoxys calcitrans*, ocho especies del género *Tabanidae* y tres especies de mosquitos del género *Culicidae* (Baldacchino et al., 2013a; Bram & Roby, 1970; Scoles et al., 2005; Scoles, Miller, & Foil, 2008). La transmisión mecánica de estas bacterias implica que las partes bucales de los insectos se contaminen al alimentarse de un rumiante infectado, luego al desplazarse a un animal susceptible inoculan los eritrocitos infectados de forma mecánica. Este tipo de transmisión depende del nivel de bacteriemia en el hospedero al momento de la alimentación; por lo tanto, es posible sólo durante la fase aguda de la infección cuando el nivel de bacteria en sangre está en su punto más alto (Scoles et al., 2008). Otra forma mecánica de transmisión se lleva a cabo por fómites contaminados con sangre, incluyen agujas, pinzas para la nariz, equipos de castración, los instrumentos de tatuaje, los dispositivos de la marca de oreja y trasplante de embriones empleados en la práctica veterinaria en áreas rurales (Aubry & Geale, 2011; Palmer, Brown, & Rurangirwa, 2000; Shimada et al., 2004).

### **1.1.5.3 Transmisión transplacentaria de *A. marginale*.**

La transmisión transplacentaria puede ocurrir en el bovino gestante durante el segundo y tercer trimestre de gestación, cuando la madre presente un alto nivel de bacteriemia en sangre; en esta etapa *A. marginale* puede atravesar la barrera placentaria e infectar al feto (Meldonado, Coronado, Kowalski, & Medina, 2013). Por lo tanto, al igual que la transmisión mecánica la transmisión transplacentaria de *A. marginale* puede contribuir a la epidemiología de esta enfermedad en algunas regiones del mundo (Kocan et al., 2003).

### **1.1.6 Ciclo de vida en el vertebrado bovino.**

En el hospedero bovino, los cuerpos iniciales de *A. marginale* transmitidos por el vector, ingresan a los glóbulos rojos maduros por endocitosis e invaginación de la membrana, se multiplican por fisión binaria para llegar a formar un cuerpo de inclusión que contiene entre 6 y 8 bacterias; las bacterias formadas abandonan el cuerpo de inclusión y el eritrocito por un proceso no lítico e infectan otros glóbulos rojos para repetir el proceso por periodos indefinidos. Adicionalmente se ha observado que *A. marginale* infecta a las células endoteliales del bovino y aunque se sabe muy poco sobre este proceso, se sospecha que estas células brindan el sitio donde la bacteria permanece en los animales portadores y quizás es donde se lleve a cabo el proceso de formación de variantes antigénicas a partir de la recombinación de la proteína Msp2 (proteína mayor de superficie 2), la cual está directamente involucrada en la evasión del sistema inmune (Futse, Brayton, Nydam, & Palmer, 2009) (Imagen 2).



**Imagen 2.** Ciclo de vida de *A. marginale*. Tomado del centro de sanidad animal. [http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://centrodesanidadanimal.blogspot.com/2016\\_01\\_01\\_archive.html](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://centrodesanidadanimal.blogspot.com/2016_01_01_archive.html).

### 1.1.7 Manifestaciones clínicas de anaplasmosis bovina.

Después de la infección inicial y un periodo de incubación de 7-60 días (Kocan et al., 2003), *A. marginale* invade los eritrocitos del hospedador y experimenta ciclos de replicación; durante la infección inicial ocurre un aumento geométrico del número de eritrocitos infectados que se duplica cada 24 horas. Los signos clínicos durante esta fase incluyen, fiebre alta (41°C), anorexia, depresión, debilidad muscular e ictericia. En la fase aguda de la infección, el número de eritrocitos infectados es de aproximadamente  $10^9$  células por mililitro de sangre dependiendo de la cepa infectante y la susceptibilidad del hospedero, por lo general del 10% al 90% de los eritrocitos pueden ser infectados en esta fase; por lo cual un animal no presenta signos clínicos al inicio de la infección, y estos solo aparecen cuando más del 15% de los eritrocitos han sido invadidos (Radostits, Gay, Hinchcliff, & Constable, 2006). El ganado puede contraer la enfermedad a cualquier edad, pero tanto la mortalidad

como la severidad de esta aumentan con la misma. Generalmente los terneros presentan una menor frecuencia de la enfermedad clínica; en animales menores de 6 meses de edad la enfermedad no es común, animales entre 6 meses y 1 año de edad suelen desarrollar la enfermedad leve y animales entre 1 y 2 años de edad sufren la enfermedad aguda, pero rara vez es fatal. Por otro lado, en bovinos adultos de más de 2 años de edad, la enfermedad es aguda y con frecuencia fatal con riesgos de mortalidad entre 29% y 49% (Kocan et al., 2003). Los animales que superan la fase aguda permanecen como portadores con continuos ciclos de bacteriemia en un estado de portador crónico; recuperan su condición física y se hacen asintomáticos, convirtiéndose en animales persistentemente infectados (Viseshakul, Kamper, Bowie, & Barbet, 2000). Dado que el tiempo de vida media de un glóbulo rojo de la especie bovina es de 160 días, nuevos eritrocitos necesitan ser infectados continuamente para mantener la infección (infección persistente de *A. marginale* en el hospedero) (Eleizalde & Reyna-Bello, 2014; Palmer, Futse, Knowles, & Brayton, 2006).

### **1.1.8 Diagnóstico de anaplasmosis bovina.**

Es importante hacer un diagnóstico diferencial de anaplasmosis bovina, puesto que los signos clínicos que se presentan con mayor frecuencia incluyen; fiebre, anemia hemolítica aguda e ictericia en el ganado adulto y estos signos son comunes con otras enfermedades como: babesiosis, eperytozoonosis, theileriosis, leptospirosis, hemoglobinuria bacilar, hemoglobinuria postparto y ántrax; afortunadamente la ausencia de hemoglobinuria con anemia aguda y la identificación del eritrocito infectado, permiten diferenciar estas enfermedades hemolíticas de la anaplasmosis clínica (González et al., 2014).

#### **1.1.8.1 Métodos microbiológicos.**

El control de la anaplasmosis necesita de métodos diagnóstico que permitan conocer la prevalencia de la infección del microorganismo en las diferentes zonas del mundo (Camacho-Nuez et al., 2000). La observación de frotis sanguíneo es la técnica de primera elección en el diagnóstico de referencia y es el método más

común para la identificación de *Anaplasma* spp. en animales que presentan infección clínica (González et al., 2014). Sin embargo, cuando el animal se encuentra en la fase crónica o en el estadio de portador no se observa un elevado nivel de bacterias como para ser detectado por la tinción (Trueblood & Palmer, 1998). Este método se caracteriza por ser confiable, económico y capaz de detectar niveles de bacteriemia de 0.1 a 0.2% (Gale, Dimmock, Gartside, & Leatch, 1996).

#### **1.1.8.2 Detección del material genético de bacterias del género *Anaplasma* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

Esta técnica es de gran utilidad para la identificación de bacterias del género *Anaplasma* en bovinos portadores y vectores que presenten una baja carga bacteriana; se estima que el límite de detección es de 24 eritrocitos infectados por microlitro de sangre, equivalente a 0,0001% de eritrocitos infectados (Figueroa, Chieves, Johnson, & Buening, 1993; Gale et al., 1996).

Para la identificación de bacterias de este género se han desarrollado PCR, utilizando cebadores comunes que permiten amplificar el ARN ribosómico de 16S (16S rRNA) de las bacterias de la familia Anaplasmataceae, esta región es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 pb, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S). La secuencia de estos genes ha sido utilizada ampliamente en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana, debido a que el operón ribosómico presenta entre 1 y 15 copias por cada genoma bacteriano y aunque la secuencia varía considerablemente, es relativamente conservado entre los miembros de este género (del Rosario Rodicio & del Carmen Mendoza, 2004; Dumitrache et al., 2015; Dumler et al., 2001; González et al., 2014; Inokuma, Terada, Kamio, Raoult, & Brouqui, 2001; Jimenez, Garcia, Angulo, & Gómez, 2013).

Para la identificación de especies del género *Anaplasma* se utiliza una variedad de marcadores moleculares, entre los cuales se destaca los que amplifican el operón de choque térmico groESL. Este operón abarca una región que contiene dos genes que codifican las proteínas de choque térmico GroES y GroEL (HSP) (Tutar & Tutar, 2010). GroEL se considera una herramienta valiosa para estudios filogenéticos de

los miembros de la familia Anaplasmataceae, este gen codifica una proteína de choque térmico de aproximadamente 60-47 kDa, involucrada en el plegamiento y la formación de la estructura cuaternaria de otras proteínas (Gupta, 1995; Psaroulaki et al., 2009; Sumner, Nicholson, & Massung, 1997).

### **1.1.9 Distribución de anaplasmosis bovina.**

Anaplasmosis bovina se halla ampliamente distribuida en las zonas tropicales y subtropicales del mundo (40° N-32° S); el área de distribución comprende América del Sur, América Central, Estados Unidos (EEUU), el Sur de Europa, África, Asia, Australia, América Central y América del Sur (Kocan et al., 2010). La anaplasmosis es enzoótica en todos los países de América Latina, con la excepción de las zonas desérticas y ciertas cadenas montañosas, como los Andes (Guglielmone, 1995). Se ha planteado que la distribución de esta enfermedad podría cambiar a causa del calentamiento global (Kocan et al., 2004).

#### **1.1.10 Control de la anaplasmosis bovina.**

Las medidas de control utilizadas para la anaplasmosis bovina no han variado notablemente durante los últimos 50 años. Las medidas de control y prevención incluyen:

##### **1.1.10.1 Rebaños libres de *Anaplasma* spp.**

El mantenimiento de zonas libres de la enfermedad es posible a nivel del rebaño. Se recomienda realizar pruebas diagnósticas dos veces cada tres semanas a los animales que ingresen por primera vez en un hato, con el fin de disminuir el riesgo de introducir animales infectados (Benavides, 2012).

##### **1.1.10.2 Control de vectores**

El control de vectores involucra la aplicación de acaricidas, sin embargo no resulta factible para muchos ganaderos por su elevado costo y porque su prolongado uso solo puede generar el desarrollo de garrapatas resistentes (Aubry & Geale, 2011). Adicionalmente, el uso de baños periódicos con productos químicos conlleva a

contaminación ambiental, presencia de residuos en carnes y leche (Gutiérrez, 2006).

### **1.1.10.3 La prevención de la transmisión iatrogénica**

La transmisión iatrogénica a través de fómites contaminados con sangre puede contribuir a la propagación de *A. marginale*, las medidas de control recomendables sugieren un solo uso de agujas entre el hato ganadero, además es importante la limpieza y desinfección de todos los instrumentos que se utilizan en las practicas rurales como equipo de tatuaje, etiquetadores de oído, mochetas; entre otros (Reinbold et al., 2010).

### **1.1.11 Tratamiento.**

El tratamiento antibiótico en la anaplasmosis es efectivo para disminuir la carga bacteriana y la limitación de los efectos clínicos, pero no eliminan completamente las infecciones persistentes (Suarez & Noh, 2011); por lo que se debe restringir el movimiento de ganado infectado, como medida precautelar en zonas donde persiste la infección, esto evita el ingreso de la enfermedad en áreas donde residen animales susceptibles (Kocan et al., 2010). El grupo de medicamentos de primera elección para el tratamiento de la enfermedad son las tetraciclinas. La administración de este antibiótico va acompañado de las desventajas asociadas al costo y el riesgo de aparición de microorganismos resistentes (Kocan, Blouin, & Barbet, 2000). Usualmente se aplican 10-12 mg/kg por vía intravenosa o intramuscular. El mecanismo de este grupo de antibióticos depende de su interacción con la subunidad 30S de los ribosomas y con ácido ribonucleico mensajero (ARNm), lo que inhibe la síntesis de proteínas (Scholar & Pratt, 2000).

## **1.2 Marco de antecedentes.**

En Colombia, desafortunadamente, no se cuenta con un registro preciso de los brotes ocasionados por *A. marginale* en bovinos. Aunque tradicionalmente los casos de anaplasmosis se han registrado en varias zonas del país: Córdoba 90%, Costa Atlántica 90%, Antioquia 50%, Santanderes 80%, Valle del Cauca 60%, y Llanos Orientales 72% (Benavides et al., 1996); en los últimos años se ha observado un

incremento en las áreas de distribución de la enfermedad, y ahora se registran casos de infección con esta especie en más del 85% del territorio Colombiano (Benavides et al., 2001). Los registros indican que en el año 2009, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) notificó bovinos en diversas condiciones patológicas, evaluadas en 2.924 predios ubicados en 28 Departamentos, en este estudio se encontró que 350 predios fueron afectados por anaplasmosis (Orjuela et al., 2009). Para el año 2010 se evaluaron 1.434 predios ganaderos localizados en 24 Departamentos; se encontró un total de 237 bovinos afectados por anaplasmosis, de los cuales 188 animales murieron a causa de la enfermedad lo que representó pérdidas estimadas en 239.681.200 millones de pesos (Orjuela, González, Patiño, Díaz, & Ortiz, 2010 ). En el año 2013 se registró una frecuencia de infección con *Anaplasma* spp. del 73,7 % en cinco municipios del Norte y Nororiente de Antioquia (Ávila Pulgarín et al., 2013). De acuerdo a lo anterior en Colombia la enfermedad es considerada de gran importancia, ya que constituye una restricción para el incremento de la productividad ganadera del país (Benavides et al., 2000).

Por su parte la anaplasmosis se ha convertido en una enfermedad emergente y desde hace varios años es una de las infecciones transmitidas por garrapatas más importantes que amenazan la vida humana en países como Estados Unidos (Dumler, Madigan, Pusterla, & Bakken, 2007); estos cambios se atribuyen al aumento de los reservorios animales y los vectores (garrapatas). En este sentido, el primer registro de anaplasmosis humana granulocítica (AHG) en Colombia se reportó en el año 2013, un caso de un paciente masculino con cuadro febril prolongado en la ciudad de Cartagena (Hernandez-Ayazo & Marien-Clarete, 2013), por lo cual es importante sugerir el diagnóstico temprano y establecer las diferencias que existe con otras infecciones similares (Hernandez-Ayazo & Marien-Clarete, 2013).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general:

Determinar la infección con *Anaplasma* spp. en bovinos del municipio de Ovejas, Sucre, Colombia.

### 2.2 Objetivos específicos:

- Estimar las tasas de infección microbiológica con bacterias del género *Anaplasma* en bovinos del municipio de Ovejas, Sucre, Colombia.
- Detectar e identificar las bacterias de la familia Anaplasmataceae que infectan a la población de estudio.
- Correlacionar los factores demográficos (edad, sexo y raza) de la población de estudio con la infección por *Anaplasma* spp.

## 3. METODOLOGÍA

### 3.1 Área de estudio.

El estudio se llevó a cabo en el municipio de Ovejas, Departamento de Sucre, ubicado en la Región Costa Norte de Colombia, perteneciente a la subregión de los Montes de María, se ubica a 09° 31' 48" de latitud Norte y a 75° 14' 01" de longitud Oeste, presenta una altitud de 265 metros. Su extensión total es de 444.7 Km<sup>2</sup>. Esta región sabanera se caracteriza por su paisaje montañoso; en términos ecológicos la zona corresponde a la categoría de bosque seco tropical, con registros de temperatura media de 28.8°C, humedad relativa del 77- 80% y precipitaciones que alcanzan los 1000-1300 mm anuales. Limita con el Carmen de Bolívar, San Pedro, los Palmitos, Chalan, Coloso y el municipio de Córdoba en el Departamento de Bolívar constituyen los límites circunvalares de Ovejas al Norte, Sur, Occidente y Oriente respectivamente (OVEJAS). (Figura 2).



**Figura 1.** Ubicación geográfica del municipio de Ovejas, Departamento de Sucre.

### **3.2 Tipo de estudio y tamaño de la muestra.**

Se realizó un estudio transversal observacional y de secuencia temporal retrospectiva. El tamaño de la muestra de estudio se estimó a partir de una población total de 305 animales activos en el municipio, el cálculo se realizó con el programa WinPEPI v11.18 (Abramson, 2010), con un nivel de confianza del 95%, admitiendo un error del 5% y una prevalencia del 50%, debido a que en esta región no se han realizado estudios que aborden la prevalencia de la enfermedad; la muestra estimada para este estudio fue de 194 animales.

### **3.3 Estudio epidemiológico.**

La elección de los puntos de muestreo se realizó por conveniencia con base al registro suministrado por la Federación Colombiana de Ganaderos (FEDEGAN) de Sucre. A cada propietario del hato ganadero se le explicaron los objetivos, riesgos y beneficios del estudio, se respondieron inquietudes, se pidió autorizar un consentimiento informado (Anexo N° 1) y por último se realizó una encuesta

epidemiológica (Anexo N° 2) en la que se indagó sobre los datos del animal (edad, el sexo, la raza, presencia de vectores, entre otros) y del domicilio con el fin de buscar posibles asociaciones entre los factores del entorno, la signos clínicos y la prevalencia de la infección en el municipio.

### **3.4 Recolección de muestras sanguíneas.**

Para la toma de muestra sanguínea fue necesario la compañía de un funcionario del programa de vacunación contra la Brucelosis y la fiebre Aftosa de Fedegan; el bovino escogido se sujetó e inmovilizó con ayuda del personal del ható, una vez en el suelo o en la manga del corral se localizó la vena yugular del animal, se realizó la limpieza de la zona y se tomaron cinco ml de sangre periférica con ayuda de una aguja hipodérmica calibre 26G x 1/2" de 10cm<sup>3</sup>. La muestra se depositó en dos tubos de microcentrifugas que contenía 100 µl de EDTA, el primer tubo se utilizó para realizar el frotis sanguíneo y el segundo para los análisis de detección con herramientas de biología molecular. Las muestras se rotularon con la fecha y un código único para cada animal. Este código permitió llevar un registro detallado de los bovinos utilizados en el estudio (anexo N°2). Las muestras sanguíneas recolectadas fueron transportadas al Laboratorio de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre. Cabe mencionar que se excluyeron del muestreo hembras embarazadas, animales mayores de tres meses y tiempo de residencia en la zona superior a tres meses.



**Imagen 3.** Toma de muestra de sangre a partir de la vena yugular.

### **3.5 Estimación de la frecuencia de infección con bacterias del género *Anaplasma* en población bovina del municipio Ovejas.**

Para la realización del frotis sanguíneo se emplearon dos portaobjetos con bordes biselados: uno como soporte del frotis de sangre y el otro como portaobjetos extensor. En un extremo del portaobjetos se colocó una gota de sangre (15  $\mu$ l aproximadamente) con anticoagulante (ácido etilendiaminotetraacético EDTA). Se creó así un frotis de bala, siguiendo las instrucciones de Rodak & Carr, 2014, el cual se dejó secar a temperatura ambiente (Rodak & Carr, 2014). Una vez seco el extendido se realizó la coloración con tinción Wright; por último se procedió a la lectura en un microscopio de luz con el objetivo 100X, para visualizar el agente etiológico (Calderón, Cardona, & Vergara, 2013). Cabe mencionar que aquellas muestras positivas fueron confirmadas por un funcionario del ICA de la ciudad de Sincelejo, Sucre.

### **3.6 Detección del material genético de las bacterias de la familia Anaplasmataceae en población bovina del municipio de Ovejas, Sucre.**

#### **3.6.1. Extracción de ADN genómico**

Las muestras de sangre almacenadas se procesaron para extraer el ADN total mediante el método de altas concentraciones de sales modificado por Rivero & Blanco 2003 (Rivero, 2003): la muestra obtenida se centrifugó a 12000 r.p.m. por diez minutos a 4°C, al pellet obtenido se le adicionaron 500  $\mu$ l de búfer de extracción (Tris 10mM, EDTA 1 mM, SDS 1%), inmediatamente se le agregaron 2,5  $\mu$ l de proteinasa k (20ug/ $\mu$ l) y se incubó por 1h en baño seco a 65°C, posteriormente, se inactivó la proteinasa k a 95°C por un minuto, se centrifugó a 12000 r.p.m. durante diez minutos a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo al que se le adicionaron 500  $\mu$ l de Acetato de Potasio 5M, luego se homogenizó por inversión seguido de incubación en hielo por quince minutos. Se centrifugó nuevamente a 12000 r.p.m durante diez minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a otro tubo.

Al sobrenadante se le adicionaron 0.6 volúmenes de isopropanol y se incubó a una temperatura de -20°C durante toda la noche. Al precipitado de ADN resultante se le agregaron 500 µl de etanol al 70%, se centrifugó a 12000 r.p.m por cinco minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El ADN se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en agua ultra pura antes de almacenarlo a -20°C.

### **3.6.2 Cuantificación de ADN extraído de sangre periférica.**

La concentración de ADN extraído a partir de las muestras sanguíneas se determinó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 Thermo Scientific. Se midió la concentración y pureza haciendo mediciones a 260, 280 y 230 nanómetros y se infirieron las relaciones entre los valores de absorbancia medidos a las diferentes longitudes de onda.

### **3.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen que codifica la subunidad ribosomal pequeña para la detección del material genético de las bacterias de la familia Anaplasmataceae en población bovina del municipio de Ovejas, Sucre**

La identificación del material genético de las bacterias de la familia Anaplasmataceae en población bovina del municipio de Ovejas, se realizó mediante PCR del gen que codifica para el ARN ribosomal de 16S, en este proceso se emplearon los cebadores: EHR16SD 5'-GGT ACC YAC AGA AGA AGT CC-3' & EHR16SR 5'-TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC-3' (Parola et al., 2003), los cuales flaquean un fragmento de 347 pb en todos los miembros que conforman la familia. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25µl. En cada reacción se usaron 3µl del DNA extraído a una concentración promedio de 154, 86 ng/µl, 1.0 µl de cada cebador a 10pmoles/µl, 5µl reacción mix con dNTPs; 1.0 unidad de enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase. La mezcla de reacción se incubó en un termociclador Bio-Rad bajo el siguiente perfil térmico: activación inicial a 95°C durante dos minutos, seguido por 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C por 20 segundos, alineamiento a 56°C durante 25 segundos y una fase de extensión final durante de cinco minutos a 72°C.

### **3.6.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen que codifica las proteínas de choque térmico (GroEL) para la detección del material genético de las especies del género *Anaplasma* en población bovina del municipio de Ovejas.**

Aquellas muestras que fueron positivas por el marcador anterior fueron utilizadas para identificar la especie infectante, para lo cual se amplificó el gen que codifica la proteína de choque térmico GroEL por PCR convencional, en el proceso se usaron los cebadores HSPC: 5'-AAATGGCGAATGTTGT(TA)GT(TC)AC-3' HSPB: 5'-TTA(GA)AA(GATC)CC(GATC)CCCAT(GATC)CC(GATC)CCCATGCC-3' que delimitan un fragmento de aproximadamente 1650 pb (Lew, Gale, Minchin, Shkap, & de Waal, 2003). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 50µl. En cada reacción se usaron 3µl del DNA extraído a una concentración aproximada de 154,86 ng/µl, 1.5µl de cada cebador a 10 pmoles/µl, 10µl reacción mix con dNTPs; 1.5 unidades de enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase. La mezcla de reacción se incubó en un termociclador Bio-Rad bajo el siguiente perfil térmico: activación inicial a 95°C durante 2 minutos, seguido por 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C por 20 segundos, alineamiento a 62°C durante 85 segundos y una fase de extensión final de cinco minutos a 72°C.

Para ambas reacciones de PCR se usó ADN de cepas de referencia de *A. marginale* como control positivo y como control negativo se usó agua ultra pura.

### **3.7 Visualización de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa.**

Los productos amplificados con los cebadores EHR16SD & EHR16SR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en búffer TBE 0.5 X (Tris – Ácido bórico – EDTA) durante 40 minutos a 90 voltios, mientras que los amplificados con los cebadores HSPC & HSPB fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,0% en búffer TBE 0.5 X (Tris – Ácido bórico – EDTA) durante 50 minutos a 80 voltios. Luego fueron visualizados en un transiluminador con previa tinción con GelStar® (Nucleic Acid Gel stain for DNA and RNA analysis). El tamaño de los fragmentos amplificados se determinó usando como referencia el marcador

de peso molecular M.biotech 1 Kb, extrapolando el logaritmo de la masa respecto a la distancia recorrida en el gel.

### **3.8 Secuenciación de ADN.**

Teniendo en cuenta el número de muestras totales que amplificaron el gen 16S rRNA; se escogió una muestra por conveniencia teniendo en cuenta que existiera al menos un animal positivo por cada hato ganadero o al menos entre varios hatos cercanos; de este modo se seleccionaron 10 muestras equivalente a un 7% de las muestras positivas por este gen. Del mismo modo se escogieron productos de las muestras que amplificaron el gen GroEL, los 19 productos elegidos presentaron una concentración igual o mayor a 150 ng/μl y un volumen de 30 μl. Las muestras se cuantificaron con ayuda de NanoDrop 2000 Thermo Scientific. Posteriormente los productos fueron secados y sometidos a un proceso de secuenciación automatizada en ambos sentidos de la cadena, empleando un analizador genético Applied Biosystems 3700xL, este servicio fue contratado con la compañía MacroGen™.

### **3.9 Análisis de secuencias nucleotídicas.**

#### **3.9.1 Edición de secuencias.**

Las secuencias del gen 16S rRNA y del gen GroEL, obtenidas después del proceso de secuenciación fueron editadas de forma automática con el programa Geneious versión 9.1.7 (Kearse et al., 2012), posteriormente, los consensos obtenidos fueron revisados de forma manual. Con el fin de confirmar la identidad taxonómica de las bacterias se realizó una búsqueda de alineamiento local con el programa BLAST (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990).

#### **3.9.2 Alineamiento múltiple de las secuencias.**

Las secuencias consenso del gen 16S rRNA y las secuencias del gen GroEL, se alinearon con secuencias homólogas de diferentes miembros de la familia y otras especies del género *Anaplasma* con ayuda del programa MAFFT (Katoh, Misawa, Kuma, & Miyata, 2002). Para cada gen se realizó un alineamiento independiente en

el que se incluyeron secuencias depositadas en Genbank. El modelo de sustitución de nucleótidos que mejor describe la diversidad observada entre las secuencias alineadas se evaluó con el programa MEGA 6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013).

### **3.9.3 Análisis filogenético**

Las reconstrucciones de los dendogramas se realizaron con el programa PhyML (Lefort, Longueville, & Gascuel, 2017) que implementa un algoritmo de búsqueda heurístico, rápido y preciso para la estimación de las filogenias basado el método de Máxima Verosimilitud. El soporte interno de los nodos fue estimado a partir de 1000 pseudoreplicas (Felsenstein, 1985).

## **3.10 Relación entre los factores demográficos (edad, sexo y raza) y la prevalencia de anaplasmosis en la población estudiada.**

### **3.10.1 Análisis de datos**

#### **3.10.1.2 Análisis bivariante.**

Se realizó prueba Chi- cuadrado y Fisher para comparar cada una de las variables explicativas: sexo, edad, raza, signos clínicos, vacunación y medidas de control y prevención con respecto a la variable respuesta (muestras positivas por GroEL) con ayuda del programa R estadístico (Team, 2014) y el paquete Rcomander (Thioulouse & Dray, 2007).

## **3.11 Socialización de resultados con los productores ganaderos**

Una vez obtenido los resultados de esta investigación se realizó un informe final, en el cual se agradeció a la comunidad por su participación e invaluable ayuda en el desarrollo de las actividades del Proyecto; se notificaron los respectivos resultados para cada animal, detallando la presencia de infección de los géneros *Anaplasma* y

*Babesia* (datos no mostrados), seguido de una serie de recomendaciones que conllevan a notificar la presencia de estos patógenos y promover el control pertinente en la zona de estudio (Anexo 4).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Población bovina estudiada

Durante el periodo comprendido entre los meses de Abril y Julio del año 2015 se muestrearon 194 animales, proveniente de 20 hatos ganaderos; 5 hatos ubicados en zona rural (41 animales), 3 hatos ubicados en zona periurbana (30 animales) y 12 ubicados en zonas urbanas del municipio de Ovejas, Sucre, Colombia (123 animales). Del total de bovinos estudiados el 26% (n:52/194) correspondió a machos y el 73% (n:142/194) a hembras. La edad de los animales fue clasificada en cuatro grupos etarios; el grupo I animales entre 3 y 8 meses, grupo II, animales entre 9 y 24 meses, grupo III, animales entre 24 y 48 meses de edad y el grupo IV animales entre 49 y 96 meses de edad. De acuerdo a lo anterior, el 26,28% (n:51/194) de bovinos pertenecen al grupo I, el 25,25% (n:49/194) al grupo II, el 26,80% (n:52/194) al grupo III y el 21,64% (n:42/194) pertenecen al grupo IV. En cuanto a las razas de los animales se encontró que el 85,05% (n:164/194) de los individuos estudiados fueron de raza cebú, seguido el 8,7% (n:17/194) raza parda, por último el 6,18% (n:12/194) corresponde a un cruce entre la raza cebú y parda.

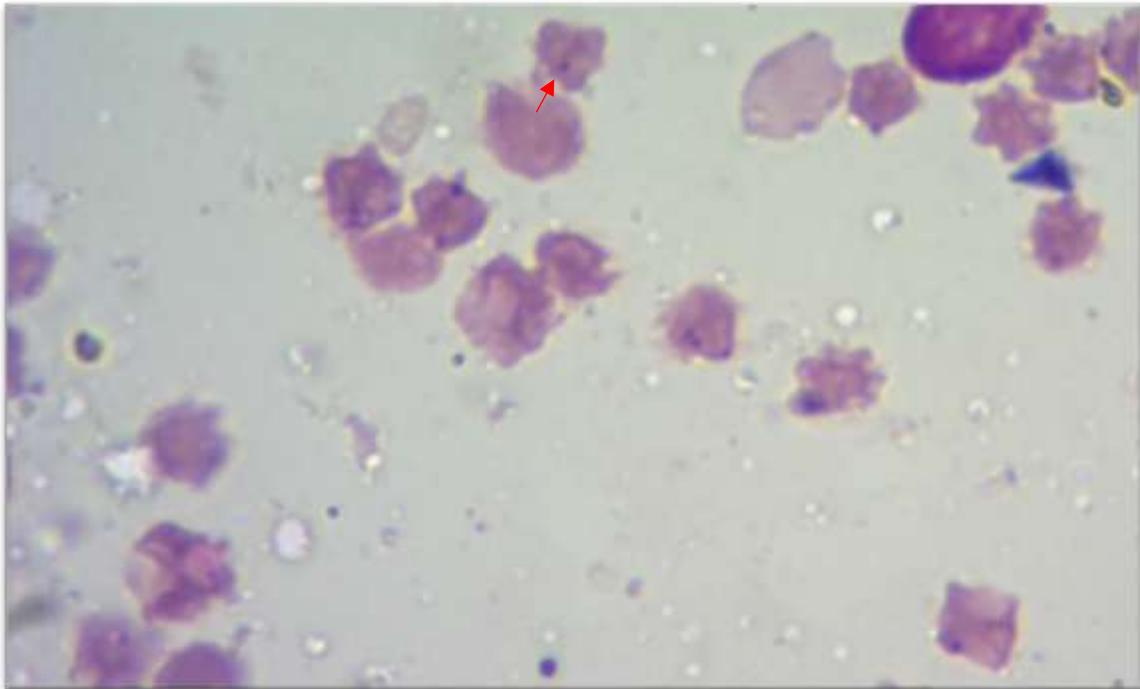
### 4.2 Examen clínico

Del total de animales estudiados el 27,31% (n:63/194) presentó al menos un signo clínico característico de anaplasmosis bovina, los principales signos clínicos observados fueron: presencia de mucosas pálidas, pérdida de peso, inapetencia y debilidad (Tabla 5).

**Análisis microbiológico de búsqueda de infección con *Anaplasma* spp. en bovinos del municipio de Ovejas Sucre.**

### 4.3 Análisis microbiológico.

Del total de muestras evaluadas mediante observación microscópica con tinción Wright, se encontró infección en 19 muestras, las cuales presentaron corpúsculos puntiformes en la periferia de la membrana celular de los glóbulos rojos (Imagen 8), base en estos hallazgos se calculó una frecuencia de infección con *Anaplasma* por este método del 9,74% (n:19/194).



**Imagen 4.** Observación de *Anaplasma* spp. en extendido de sangre periférica a 100X.

**Detección del material genético de las bacterias de la familia Anaplasmataceae en población bovina del municipio de Ovejas, Sucre, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

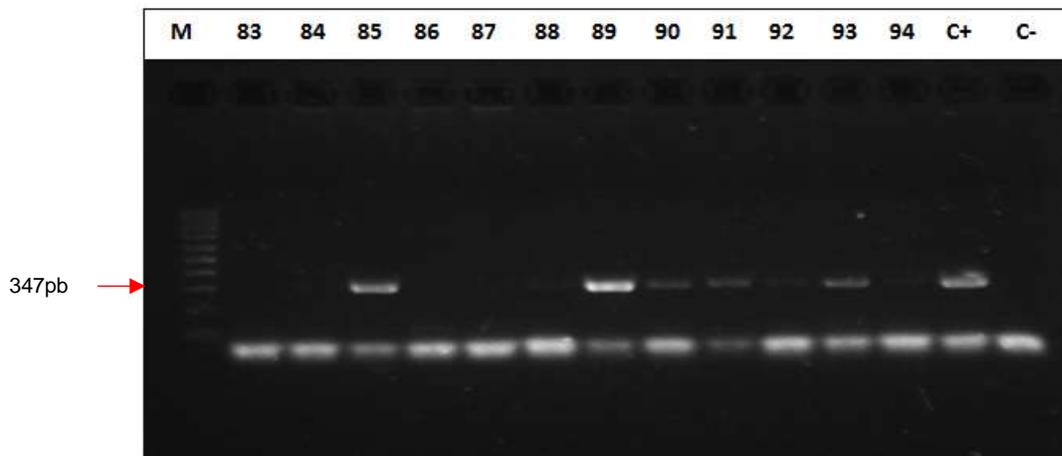
### 4.4 Extracción y cuantificación de ADN genómico total.

Con la metodología de altas concentraciones de sales utilizadas para la extracción de ADN se logró obtener valores promedios de concentración de 154,86 ng/ $\mu$ l, con

una excelente pureza, puesto que el valor promedio de A260/280 fue de 1,78 (1,6 – 1,91).

#### 4.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la subunidad Ribosomal pequeña 16S.

A partir del material genético extraído de muestras de sangre periférica se logró amplificar un fragmento de 347pb de la subunidad ribosomal pequeña empleando los cebadores EHR16SD & EHR16SR, los cuales son específicos para detectar géneros de la familia Anaplasmataceae (Imagen 9). La prevalencia de infección detectada con este marcador molecular fue del 76,41% (n:149/194) de los bovinos analizados.

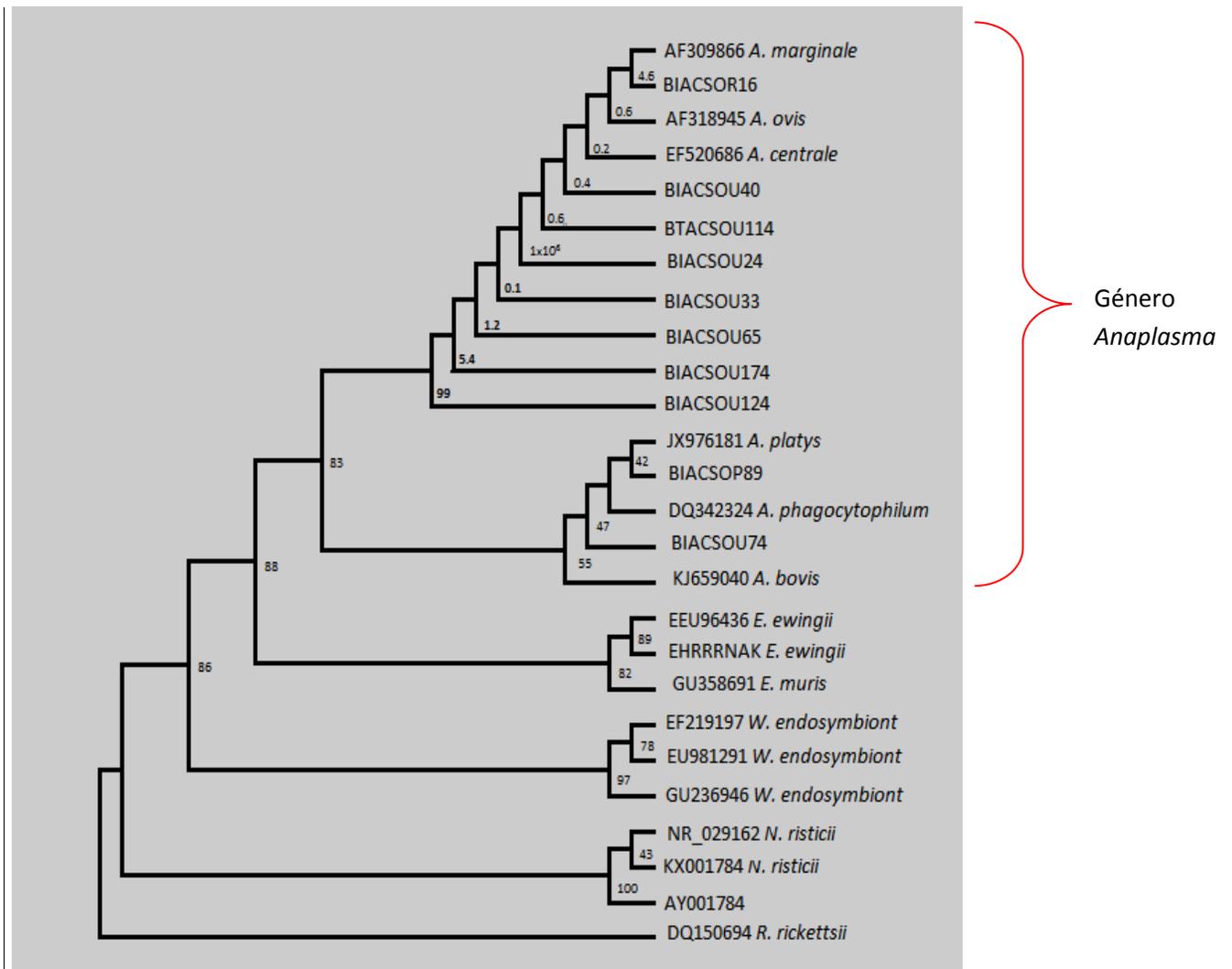


**Imagen 5.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos del gen que codifica para la subunidad ribosomal pequeña 16S amplificados por PCR convencional de la subunidad ribosomal pequeña de 16S. **M.** Marcador de peso molecular (M.biotech 100bp DNA Ladder Marker); pozo 2-13 muestras de bovinos **C+**. Control positivo ADN de *A. marginale*; **C-**. Control negativo, agua ultra pura.

#### 4.6 Análisis de las secuencias nucleotídicas de la Subunidad Ribosomal pequeña (16S rRNA).

Una vez obtenidos los electroforegramas de las muestras amplificadas con los marcadores EHR16SD, EHR16D y HSPB, HSPC fueron usadas para realizar la búsqueda de similitud con las secuencias depositadas en GenBank mediante la herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Blast (Altschul, 1990). El análisis

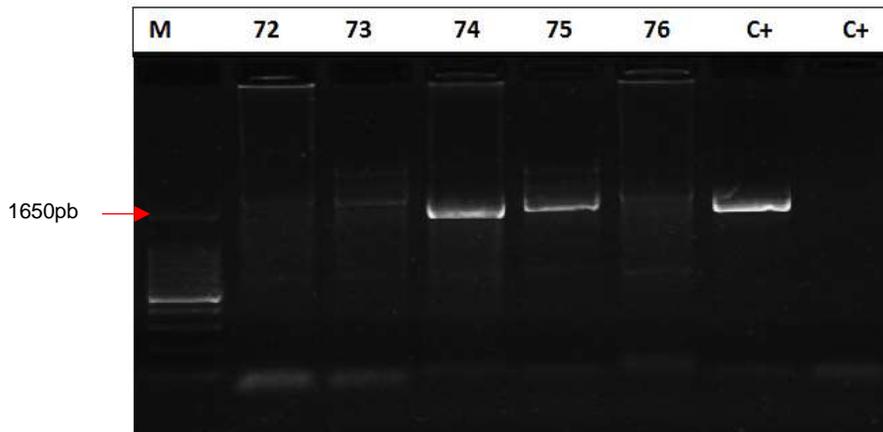
de similitud de las diez secuencias nucleotídicas del gen 16S rRNA mostraron una identidad de 98%-100% con bacterias del género *Anaplasma*. Las secuencias obtenidas en conjunto con secuencias de referencia de distintos miembros representantes de la familia Anaplasmataceae descargadas de Genbank fueron alineadas con el programa MATFF (Kato, 2002). El alineamiento resultante fue usado para estimar el modelo de sustitución que mejor se ajusta a la matriz de secuencias analizadas, y se encontró que modelo de Kimura 2 parámetros presentó el mejor valor de criterio de información Akaico y mejor valor de criterio de información bayesiana; el modelo utilizado en la reconstrucción filogenética fue Máxima Parsimonia. Los análisis filogenéticos realizados indican que la familia Anaplasmataceae es un taxón polifilético conformado por los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Wolbachia* y *Neorickettsia*. En la Figura 10, se observa que las secuencias obtenidas en este estudio (BIACSOR16, BIACSOU40, BTACSOU144, BIACSOU24, BIACSOU33, BIACSOU65, BIACSOU174, BIACSOU124) se agrupan con las secuencias de las especies del género *Anaplasma*, por tanto, se confirma de este modo la infección con bacterias de este género en la población de bovinos del municipio de Ovejas, Sucre. Tal inferencia es soportada por la topología del árbol en la que se puede apreciar que cada clado presenta altos valores de soporte de rama, lo que es consistente con la taxonomía molecular de esta familia.



**Figura 2.** Árbol consenso para la familia Anaplasmataceae, derivado del análisis de la secuencia de la región que codifica para el 16S rRNA. La reconstrucción se realizó con el programa PhyML. El modelo de sustitución nucleotídica usado en la reconstrucción fue Kimura 2 parámetros, en la estimación de los soportes de rama se emplearon 1000 réplicas. Secuencias obtenidas en este estudio: BIACSOR16, BIACSOU40, BTACSOU144, BIACSOU24, BIACSOU33, BIACSOU65, BIACSOU174, BIACSOU124. Como grupo externo se usó una secuencia de *Rickettsia rickettsi* (DQ150694).

#### 4.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen que codifica las proteínas de choque térmico (GroEL)

En 60 de las 149 muestras positivas en la PCR de la subunidad ribosomal pequeña, se amplificó un fragmento de aproximadamente 1650 pb empleando los cebadores HSPB y HSPC, con este dato se obtuvo una prevalencia de infección con bacterias del género *Anaplasma* del 30,77% (n: 60/149) (Imagen 10).

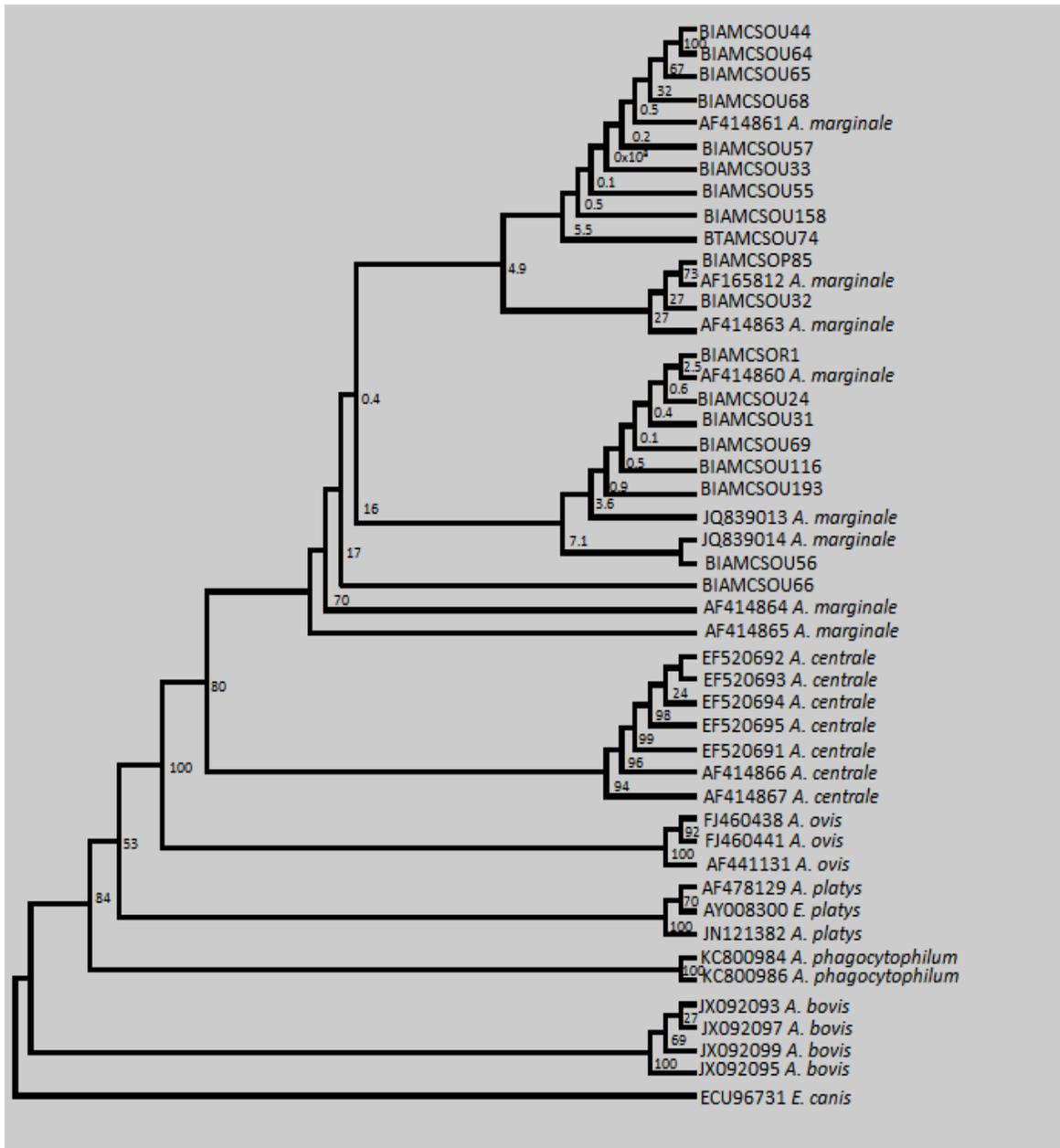


**Imagen 6.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los productos amplificados por PCR del gen que codifica para proteínas de choque térmico GroEL. **M.** Marcador de peso molecular (M.biotech 1kb DNA Ladder Marker); pozo 72-76 muestras de bovinos **C+**. Control positivo ADN de *A. marginale*; **C-**. Control negativo, agua ultra pura.

#### 4.8 Análisis de las secuencias nucleotídicas de genes de proteínas de choque térmico (GroEL).

El análisis de similitud con la herramienta Blast de las secuencias de nucleótidos derivadas de los individuos de estudio, estableció que las 19 muestras muestran una identidad del 98% al 100% con *A. marginale*. Las secuencias fueron procesadas del mismo modo como fue descrito anteriormente, los análisis filogenéticos se realizaron mediante el método de Máxima Parsimonia, empleando el modelo de sustitución de Hasegawa-Kishino-Yano. En la topología del árbol (imagen 11), se observa que las secuencias obtenidas en este estudio (BIAMCSOU44, BIAMCSOU64, BIAMCSOU65, BIAMCSOU68, BIAMCSOU57, BIAMCSOU33, BIAMCSOU55, BIAMCSOU158, BIAMCSOU74, BIAMCSOP85, BIAMCSOU32, BIAMCSOR1, BIAMCSOU24, BIAMCSOU31, BIAMCSOU69, BIAMCSOU116, BIAMCSOU193, BIAMCSOU56, BIAMCSOU66 ) agrupan con las secuencias de

esta especie confirmando un clado monofilético, tal inferencia es soportada por la topología del árbol en la que se puede apreciar que el clado que corresponde a esta especie presenta altos valores de soporte de rama, lo que es consistente con la taxonomía molecular de la misma.



**Figura 3.** Árbol consenso para la identificación de especies del género *Anaplasma*, derivado del análisis filogenético de la secuencia de la región GroEL, Reconstruido con el software PhyML. El modelo de sustitución nucleotídica usado en la reconstrucción fue Hasegawa-Kishino-Yano, en la estimación de los soportes de rama se emplearon 1000 réplicas. Las secuencias obtenidas en este estudio BIAMCSOU44, BIAMCSOU64, BIAMCSOU65, BIAMCSOU68, BIAMCSOU57, BIAMCSOU33, BIAMCSOU55, BIAMCSOU158, BIAMCSOU74, BIAMCSOP85, BIAMCSOU32, BIAMCSOR1, BIAMCSOU24, BIAMCSOU31, BIAMCSOU69, BIAMCSOU116, BIAMCSOU193, BIAMCSOU56, BIAMCSOU66. Como grupo externo se usó una secuencia de *Ehrlichia canis* (ECU96731)

#### 4.7 Análisis estadístico.

##### 4.7.1 Evaluación de métodos diagnósticos.

Al contrastar los resultados positivos obtenidos en ambos métodos de diagnósticos se encontró que 19 animales fueron positivos por búsqueda microscópica, sin embargo por el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa se obtuvo un número de 60 muestras positivas (muestras positivas con el marcador GroEL) (Tabla 2).

Tabla 1: Tabla de contingencia de muestras positivas y negativas obtenidas por diagnóstico microbiológico y PCR-GroEL.

Método	Positivos	Negativos
Microbiológico	19	175
PCR-ARNr 16S	149	45
PCR- GroEL	60	134

De acuerdo a los resultados expuestos en la tabla de contingencia anterior se realizó una valoración de concordancia entre ambos métodos diagnóstico empleando el coeficiente de Kappa, el cual demuestra que entre estos métodos existe un grado de concordancia pobre ( $K= 0,152$ ) (Tabla 3) según la escala establecida en 1977 por Landis y Koch (Landis & Koch, 1977).

Tabla 2. Índice Kappa de Cohen para los métodos diagnósticos utilizados.

MÉTODO DIAGNÓSTICO	ÍNDICE DE KAPPA	ERROR ESTANDAR	I.C95%	FUERZA DE CONCORDANCIA
PCR-ARNr 16S	0,063	0,017	0,031-0,096	POBRE
PCR- GroEL	0,152	0.065	0.025-0.280	POBRE

#### 4.7.2 Relación entre los parámetros demográficos y la prevalencia de la infección con *A. marginale*

Para establecer la relación entre los parámetros demográficos y la prevalencia de infección con *A. marginale*, se realizó una prueba Chi-cuadrado ( $X^2$ ) en la que se analizaron las variables explicativas: edad, sexo, raza, presencia de signos clínicos, vacunación y medidas de control y prevención con respecto a la variable respuesta prevalencia de la infección. De acuerdo a los resultados obtenidos se encontró diferencia estadística entre la infección y la pérdida de peso ( $X^2= 5,0734$ ;  $P<0,05$ ) con un 5,6%, igual entre aquellos animales que fueron sometidos a vacunación con un 26,28% ( $X^2= 6,6397$ ;  $P<0,05$ ), no se encontró diferencia estadística entre la prevalencia de la infección y las variables explicativas sexo, presencia de vectores, el uso de baños periódicos y signos clínicos a excepción de pérdida de peso (Tabla 4).

Tabla 3. Análisis de relación entre la frecuencia y la prevalencia de la infección respecto a los parámetros demográficos mediante la prueba Chi-cuadrado y Fisher.

POBLACIÓN BOVINA							
VARIABLES	N° Total	N° positivos	Prevalencia	N° positivos	Prevalencia	IC-95%	p-value
<b>Microbiológico</b>				<b>PCR</b>			
<b>Sexo</b>							
M	144	13	6%	43	22%	22,97 - 37,80	0,6651
H	51	6	3%	17	8,7%	21,92 - 47,08	
<b>Presencia de</b>							
<b>vectore:</b> Garrapatas	61	9	4,6%	21	10,8%	23,71 - 46,98	0,4116
Moscas	155	16	8,2%	44	22,6%	21,86 - 35,96	0,1269
<b>Signos clínicos</b>							
M_Pálidas	53	7	3,6%	19	9,7%	24,27 - 49,34	0,3632
Inapetencia	5	0	0%	2	1%	11,60 - 77,09	0,6956
Debilidad	2	0	0%	2	1%	29,02 - 100	0,0945
P_Peso	21	6	3%	11	5,6%	32,37 - 71,66	0,0243
Vacunación	141	11	5,6%	51	26,2%	28,69 - 44,38	0,0099
B_Periódicos	172	19	9,7%	55	28,3%	25,45 - 39,29	0,4679

Por otra parte, para evaluar la relación entre la raza del animal, los grupos etarios y la ubicación de la zona donde fueron tomadas las muestras sanguíneas (rural, periurbano y urbano) con respecto a la prevalencia de la infección con *A. marginale.*, se realizó una prueba exacta de Fisher; y se encontraron diferencia estadística en cuanto a la variable raza ( $F=0.0048$ ;  $P < 0.05$ ) y la zona donde se tomaron las muestras de sangre (rural, periurbana, urbana) ( $F= 0,01$ ;  $P < 0.05$ ) (Tabla 5).

Tabla 4. Análisis de relación entre la prevalencia de la infección respecto a variables edad, raza y zona (rural, periurbana, urbana) mediante la prueba de Fisher.

POBLACIÓN BOVINA						
VARIABLES		N° Total	Prevalencia		IC-95%	Fisher (p-value)
Microbiológico PCR						
<b>Edad</b>						
	I	51	4	16	20,26 - 45,09	
	II	49	6	16	21,15 - 46,68	0,9077
	III	52	6	14	16,67 - 40,35	
	IV	42	3	14	20,95 - 48,51	
<b>Raza</b>						
	Cebú	165	18	58	28,27 - 42,71	
	Parda	12	0	0	0 - 28,20	0,0048
	Cebú/Parda	17	1	2	2,03 - 35,59	
<b>Zona</b>						
	Rural	41	4	19	32,05 - 61,26	
	Periurbana	30	0	4	4,70 - 30,30	0,01
	Urbana	123	15	47	30,10 - 47,04	

Teniendo en cuenta la diferencia estadística encontrada entre la raza y la zona de ubicación donde fueron recolectadas las muestras de sangre, se aplicó una prueba de Fisher ajustada incluida en el paquete fmsb del programa R; en cuanto a la variable raza se encontró que existe diferencia estadística entre la raza parda con una frecuencia del 0% y cebú con una frecuencia del 35,1%; demostrado con un valor de p-value de Fisher de 0.028 (Tabla 6). Por su parte en cuanto a las zonas se encontró diferencia estadística en aquellos hatos ganaderos situados en la zona urbana y periurbana del municipio de Ovejas; lo anterior se demuestra con un valor de p-value de Fisher de 0.026 (Tabla 7).

Tabla 5. Valores de prueba Fischer relacionando la prevalencia de la infección con la raza.

RAZA	Fisher (P-value)	
	Cebú	Parda
Parda	0,028	-
Cebú/Parda	0,119	0,498

Tabla 6. Valores de prueba Fischer relacionando la prevalencia de la infección con la zona.

Fisher (P-value)		
ZONA	Rural	Periurbana
Periurbana	0,536	-
Urbana	0,121	0,026

#### 4. DISCUSIÓN

La anaplasmosis bovina en los últimos años se ha caracterizado por la repercusión económica y sanitaria que genera en las diferentes zonas del país; Las pérdidas debidas a la anaplasmosis se miden a través de varios parámetros: bajo peso, reducción de la producción de leche, aborto, costo de atención veterinaria y mortalidad (Kocan, De La Fuente, & Cabezas-Cruz, 2015). En el departamento de Sucre la ganadería es considerada de doble propósito (carne y leche), de tipo extensivo, escasa preparación tecnológica, bajo nivel empresarial y de baja productividad; por lo cual el pequeño y mediano ganadero tradicional maneja su negocio en forma individual (Aguilera, 2005); lo que hace necesario generar políticas agrarias claras y precisas que busquen orientar el adecuado desempeño de este sector dentro del contexto de sustentabilidad económica y sostenibilidad ambiental. De acuerdo a lo anterior, los resultados del presente trabajo de investigación aportan información sobre el panorama real de la presencia de anaplasmosis en la población bovina del Municipio de Ovejas, departamento de Sucre.

Es importante resaltar que la vigilancia y el control de la anaplasmosis requieren de métodos de diagnósticos que permitan conocer la prevalencia del microorganismo en las diferentes zonas ganaderas del país (González et al., 2014). En este sentido los métodos microbiológicos directos constituyen la técnica diagnóstica de referencia, sin embargo, requieren de tiempo para preparar y analizar los extendidos, lo que limita el número de muestras procesadas, adicionalmente, la sensibilidad y especificidad es variable; sólo se puede aplicar a animales con infección aguda y falla para la determinación de infección en animales que se

encuentran en fase crónica, ya que el nivel de bacteriemia en sangre es muy bajo como para ser detectado (Noaman & Shayan, 2010); a pesar de tales limitaciones, esta técnica, ha sido, y sigue siendo empleada rutinariamente en el diagnóstico clínico de laboratorio, como en la vigilancia epidemiológica de la anaplasmosis (Herrera et al., 2008). En este sentido, se encontró que la frecuencia de infección de *Anaplasma* spp. hallada en este estudio fue del 9,74%(n:197194), estos hallazgos concuerdan con los estudios realizados en la región Caribe Colombiana, en los Departamentos de Córdoba (Ciénaga de Oro, Los Córdoba, Montería, P. Libertador, Planeta Rica, Valencia), Sucre (San Benito Abad) y Antioquia (Arboletes) donde se registró una frecuencia de infección del 27,73% (n:86/310) (Calderón, Martínez, & Iguarán, 2016). Similarmente en un estudio realizado en el bajo Cauca y alto de San Jorge reportaron una frecuencia de infección de *Anaplasma* spp. del 61,8% (316/511) en bovinos (Herrera et al., 2008). Estos resultados en conjunto indican que la región Caribe presenta las características ambientales, ecológicas y sociales que favorecen los ciclos de transmisión vectorial y mecánica de la enfermedad (Calderón et al., 2016; Herrera et al., 2008); por tanto, se plantea que la enfermedad presenta un carácter endémico en la región, que debe ser tenido en cuenta por los gremios productores, en las políticas de prevención y promoción, puesto que los microorganismos responsables, así como sus vectores representan un problema de salud humana y veterinaria. Por otra parte, la diferencia en cuanto a la frecuencia de infección observada, se pueden atribuir a la sensibilidad de la técnica en los diferentes estados de la infección, probablemente, estas limitaciones son responsables en parte del subregistro de la infección, en las zonas donde se ha registrado su presencia.

Frente a las limitaciones de los métodos microbiológicos, la implementación de métodos diagnósticos basados en biología molecular como la PCR, han permitido mejorar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico (González, 2014). En este sentido, se observó que la frecuencia de infección con *A. marginale* hallada en este estudio fue del 30,77 % (n:60/194), estos resultados son consistentes con un estudio realizado en los Departamentos de Antioquia y Cauca en el que se encontró una prevalencia de infección de *A. marginale* del 21,5% (/98464) en bovinos (Jaimes-

Dueñez, Triana-Chávez, & Mejía-Jaramillo, 2016). Similarmente, en un estudio realizados en Costa Rica se encontró una prevalencia de infección del 52,3% (n:320/156) (Ashuma et al., 2013). Estos valores, confirman que la anaplasmosis presenta un carácter endémico en Centro América y el Caribe Colombiano. La similitud en los valores de la prevalencia encontradas en el actual estudio y el realizado por Jaimes et al., 2016 (Jaimes-Dueñez et al., 2016) se debe probablemente a la amplia distribución y abundancia de *R. microplus* en las zonas tropicales y subtropicales de América, donde su presencia también ha sido documentada en Venezuela, Colombia, al sur de Brasil y Argentina (Estrada-Peña et al., 2006).

Al comparar la frecuencia de infección observada por métodos microbiológicos y por técnicas de biología molecular se observó que la PCR fue más sensible que el diagnóstico microscópico, en ambos hubo poca concordancia debido a los bajos valores obtenidos en la prueba de coeficiente de kappa ( $K=0,152$ ); la falta de concordancia entre estos métodos diagnósticos, posiblemente se deba a la baja bacteriemia de los animales persistentemente infectados, que es difícil de detectar por microscopía (Gale et al., 1996). En estudios similares se ha encontrado que la prevalencia de infección es más alta cuando se realiza el diagnóstico por PCR, ya que estas permiten la detección de patógenos durante la fase inicial de la infección, así como los portadores asintomáticos (Awad et al., 2011; Jimenez et al., 2013).

Los análisis filogenéticos basados en la región que codifica para el 16S rRNA, se encontró que las bacterias que infectan a los bovinos del municipio de Ovejas, pertenecen al género *Anaplasma*. Esta inferencia es soportada por la topología del árbol (figura 4) en la que se observa los cuatro clados bien diferenciados, cada uno correspondiente a un género (*Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* y *Wolbachia*,) de la familia Anaplasmataceae, en cada grupo, las especies muestran relaciones monofiléticas con las de su respectivo género, la topología de cada uno de estos grupos es apoyada por altos valores de soporte de rama, los cuales son consistentes con la propuesta molecular de Lew et al., 2003 (Lew et al., 2003).

En cuanto a la identificación de la especie infectante mediante análisis de las secuencias GroEL (figura 5), se observa que el género *Anaplasma* es un taxón parafilético, en el árbol se pueden apreciar seis clados, con sus respectivas especies, las cuales se agrupan de forma inequívoca y estos agrupamientos, son respaldados por altos soportes de rama. De acuerdo a lo anterior, las secuencias obtenidas en bovinos del municipio de Ovejas, Sucre corresponden a *A. marginale*, por lo que al menos el 30,77 % (n:60/194), de las infecciones se debían a esta especie. Estos resultados son consistente con la epidemiología de la enfermedad, puesto que esta especie infecta a bovinos principalmente y tiene una alta distribución asociada a la de sus vectores, al aumento del transporte de ganado y por ende la posibilidad de transmisión mecánica de los bovinos persistentemente infectados a bovinos susceptibles (Kocan et al., 2010). La topología del árbol es consistente con la que obtenida en estudios realizados por Psaroulaki et al; 2009 (Psaroulaki et al., 2009). Dada la diferencia entre el número de muestras que amplificaron en la PCR-16S rRNA y la PCR GRoEL, se plantea que existe la posibilidad de que en la región circulen otras especies de la familia Anaplasmataceae.

### **Relación entre los parámetros demográficos de la población bovina y la prevalencia de infección con *A. marginale***

En cuanto a la relación entre los parámetros demográficos de la población bovina se encontró que el porcentaje de hembras infectadas es mayor que el de machos (Tabla 4), sin embargo, el análisis de asociación realizado con la prueba Chi-cuadrado, no mostró diferencia estadística entre la prevalencia de la infección en ambos sexos ( $X^2= 0,18741$   $P>0,05$ ); una observación similar fue descrita en trabajos realizados por Awad et al., 2011, Díaz et al., 2003 y Martínez et al., 2015 quienes observaron que el sexo no se asocia con la presencia de la infección en bovinos, esto indica que tanto machos como hembras tienen la misma probabilidad de adquirir la bacteria (Awad et al., 2011; Díaz et al., 2003; Martínez et al., 2015). En cuanto a la relación entre la edad y la prevalencia de infección no se encontró

diferencia estadística ( $F= 0,9077$   $P>0,05$ ) entre los grupos etarios evaluados; estos resultados coinciden con un estudio realizado en la Ciudad de Quito, provincia de Pichincha (Soto, 2010); pese a nuestro hallazgos, en la literatura, algunos autores señalan que la infección clínica de los bovinos a *A. marginale* tiende a estar asociado con la edad, es decir, los bovinos jóvenes son más resistentes a los efectos desarrollados en la primera etapa de la infección por lo que disminuye los cuadros clínicos de la enfermedad y desarrollan una larga inmunidad (Puglla & Vicente, 2013).

Por otra parte; en cuanto a las manifestaciones clínicas de la enfermedad, se encontró que del total de los animales estudiados, el 27,31% (n:53/194) presentó al menos un signo clínico característico de anaplasmosis bovina, los principales signos clínicos observados fueron, presencia de mucosa pálida, pérdida de peso, inapetencia y debilidad, sin embargo solo se encontró relación estadística entre la pérdida de peso y la prevalencia de la infección; posiblemente esta asociación se debe a que en la primera etapa de la infección *A. marginale* invade los eritrocitos del hospedador y se somete a ciclos de replicación en los que las bacterias se duplican cada 24 horas, dando como resultado una respuesta febril seguida de anorexia, depresión y debilidad muscular, que conllevan a que el animal no pueda alimentarse normalmente; lo que podría explicar la pérdida dramática de peso. No obstante estudios recientes han indicado que la ausencia de signos clínicos se relaciona con bajos niveles de bacteria en sangre, los cuales no son suficientes para causar un daño importante y por lo tanto no se ven reflejados signos clínicos de la infección (Jimenez et al., 2013; Tavares, Núñez, Rey, & Reyna, 2010).

En cuanto a la relación entre la presencia de garrapatas y la prevalencia de infección con *A. marginale* se encontraron 132 especímenes de *R. microplus*, 111 hembras (84%) y 21 machos (16%) (Datos no mostrados), aunque esta especie al igual que los dípteros hematófagos son los principales vectores de estas bacterias, en el presente estudio no se observó diferencia estadística entre la presencia de vectores (garrapatas y tábanos) y la infección con *A. marginale* en los bovinos. En contraste, cuando se evaluó la relación entre la prevalencia de la infección y la vacunación,

se encontró diferencia estadística entre aquellos animales que fueron vacunados en el programa de sanidad animal, probablemente este resultado se debe a que la transmisión iatrogénica es el segundo mecanismo de transmisión, después del vectorial, durante la toma de muestras se observó que el funcionario encargado de la vacunación usa la misma aguja en todos los animales vacunados, estas inferencias son consistentes con estudio realizado por Reinbold et al., 2010, en el que se confirmó que *A. marginale* puede transmitirse a través de la inyección con una aguja contaminada, en tal trabajo se encontró infección en seis animales de los diez que fueron vacunados secuencialmente con la misma aguja hipodérmica (Reinbold et al., 2010).

Un año después de la toma de muestra, cuando se entregaron los resultados del estudio a los productores, se realizó seguimiento de los 194 animales analizados, y se encontró que 24 bovinos infectados con *A. marginale* fallecieron. Es importante resaltar que aunque no se pudo inferir que la causa de muerte de estos animales haya sido la infección por el microorganismo, cabe mencionar que los propietarios manifestaron que los animales murieron a causa de las condiciones extremas derivadas de la temporada de sequía, con pérdida de peso, bajas en la producción de carne y leche, que en conjunto con la infección con *A. marginale* podrían contribuir a la muerte del animal.

Con respecto a los aspectos relacionados con la biología de los animales, se encontró diferencia estadística entre la prevalencia de la infección y la raza (cebú y parda), en este sentido, se observó que la prevalencia de la infección fue mayor en los bovinos de la raza cebú con una frecuencia del 35,1%, mientras que la raza parda se obtuvo una frecuencia del 0%. Estos datos contrastan con los antecedentes de susceptibilidad de las razas de ganado a la infección con *A. marginale*, puesto que se tiene conocimiento que la raza *Bos indicus* (raza cebú), es considerada una raza resistente a los ectoparásitos, a *A. marginale* y a otras infecciones hemopatozoarias, pero que al mismo tiempo pueden actuar como portadores de la infección para bovinos de otras razas como *Bos taurus* (raza parda); sin embargo, existe la posibilidad de que estas diferencias observadas en

nuestro conjunto de datos sean producto de un sesgo, puesto que todas las bovinos de raza parda provenían de un mismo predio.

En cuanto a la ubicación de los predios, respecto al núcleo urbano, se encontró diferencia estadística entre la frecuencia de infección observada en la zona urbana con una frecuencia de 38,21% y la zona periurbana con una frecuencia del 13,3%, a pesar de los resultados estadísticos no se puede asumir con total certeza esta relación, puesto que el muestreo al realizarse por conveniencia muestra un desbalance entre el número de bovinos y predios de cada zona; pero de forma independiente, los resultados obtenidos en conjunto indican que existe riesgo de infección por *A. marginale* en los bovinos de pequeños productores del municipio de Ovejas.

Los resultados obtenidos en esta investigación constituyen un aporte importante que informa la presencia de la infección con *A. marginale* en el municipio de Ovejas Sucre, por lo que se espera que este conocimiento permita crear medidas de control tendientes a mejorar la producción ganadera en la zona, incentivando el uso de mecanismos de prevención, lo cual podría reducir los costos asociados al manejo de la enfermedad y a las pérdidas económicas, ya que el tratamiento por estos hemoparasitos puede oscilar entre 300.000 y 350.000 pesos, sin contar las pérdidas asociadas a la producción.

## 5. CON CLUSIONES

- La infección por miembros de la familia Anaplasmataceae se encontró en el 76,41% de los bovinos analizados pertenecientes al municipio de Ovejas, Sucre.
- El 30,73% de los animales evaluados en el municipio de Ovejas presenta infección con *A. marginale*.

- La infección con *A. marginale* está relacionada con la pérdida de peso, sin embargo no se encontró diferencia estadística en cuanto al sexo, la edad, presencia de vectores y presencia de signos clínicos de la enfermedad (mucosas palidas, debilidad e inapetencia)
- En ausencia de relación entre la infección con *A. marginale* y la presencia de vectores, se plantea que la transmisión mecánica realizada accidentalmente en los programas de vacunación, puede ser el principal mecanismo de transmisión de las bacterias responsables de la anaplasmosis bovina en el municipio de Ovejas, Sucre.

## 6. RECOMENDACIONES

- Con el conocimiento obtenido sobre la prevalencia, distribución y factores asociados a la prevalencia de la anaplasmosis bovina, se sugiere a las entidades y agremiaciones ganaderas que dediquen esfuerzos y recursos para diseñar, evaluar e implementar programas de control de la enfermedad, tendientes a reducir los costos generados por esta enfermedad.
- Realizar mediciones del impacto y carga económica que esta y otras hemoparasitosis pueden tener sobre la producción ganadera, con el fin de tener datos sólidos que faciliten la toma de decisiones.
- Realizar estudios en otras regiones del Departamento que permitan mejorar el conocimiento de la distribución y prevalencia la enfermedad en hatos ganaderos.

## 7. REFERENCIAS

- Abramson, J. (2010). Programs for epidemiologists-Windows version (WinPepi)[Computer software].
- Aguilera, M. (2005). La economía del departamento de Sucre: Ganadería y sector público: BANCO DE LA REPÚBLICA-ECONOMÍA REGIONAL.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Ashuma, S. A., Singla, L. D., Kaur, P., Bal, M. S., Batth, B. K., & Juyal, P. D. (2013). Prevalence and haemato-biochemical profile of *Anaplasma marginale* infection in dairy animals of Punjab (India). *Asian Pac. J. Trop. Med*, 6(2), 139-144.
- Aubry, P., & Geale, D. (2011). A review of bovine anaplasmosis. *Transboundary and emerging diseases*, 58(1), 1-30.
- Ávila Pulgarín, L. S., Acevedo Restrepo, A., Jurado Guevara, J. A., Polanco Echeverry, D., Velásquez Vélez, R., & Zapata Salas, R. (2013). Infección por hemoparásitos en caprinos y ovinos de apriscos de cinco municipios del norte y nororiente de Antioquia. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 8(1).
- Awad, H., Antunes, S., Galindo, R. C., do Rosário, V. E., De la Fuente, J., Domingos, A., & El Hussein, A. M. (2011). Prevalence and genetic diversity of *Babesia* and *Anaplasma* species in cattle in Sudan. *Veterinary parasitology*, 181(2), 146-152.
- Baldacchino, F., Muenworn, V., Desquesnes, M., Desoli, F., Charoenviriyaphap, T., & Duvallet, G. (2013a). Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. *Parasite*, 20, 26.
- Baldacchino, F., Muenworn, V., Desquesnes, M., Desoli, F., Charoenviriyaphap, T., & Duvallet, G. (2013b). Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. *Parasite*, 20.
- Baldridge, G. D., Scoles, G. A., Burkhardt, N. Y., Schloeder, B., Kurtti, T. J., & Munderloh, U. G. (2009). Transovarial transmission of Francisella-like endosymbionts and *Anaplasma phagocytophilum* variants in *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae). *Journal of medical entomology*, 46(3), 625-632.
- Barbet, A. F. (1995). Recent developments in the molecular biology of anaplasmosis. *Veterinary parasitology*, 57(1), 43-49.
- Benavides, E. (1996). Diseño de planes racionales de control de parásitos internos de los rumiantes con base en los resultados de investigaciones sobre su dinámica poblacional. *Epidemiología, Diagnóstico Y Control de Enfermedades Parasitarias en Bovinos*, 1983.
- Benavides, E. (2001). Control de las pérdidas ocasionadas por los parásitos del ganado. Anexo coleccionable "Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades en explotaciones ganaderas, 6, 52-63

- Benavides, E., Palencia, N., Gerdt, O., & Hurtado, Ó. (2012). Criterios y protocolos para el diagnóstico de hemoparásitos en bovinos. *Revista Ciencia Animal*(5), 31-49.
- Benavides, E., Vizcaino, O., Britto, C. M., Romero, A., & Rubio, A. (2000). Attenuated trivalent vaccine against babesiosis and anaplasmosis in Colombia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916(1), 613-616.
- Betancourt, A. (1995). Situación actual de las garrapatas en Colombia. *APROVET. Foro Regional del Magdalena Medio sobre "La Situación Actual de las garrapatas y las moscas en la ganadería*, 5, 19-20.
- Bevan, L. (1912). Anaplasmosis of sheep. *Vet. J*, 68, 400-401.
- Blouin, E. F., Saliki, J. T., de la Fuente, J., Garcia-Garcia, J. C., & Kocan, K. M. (2003). Antibodies to Anaplasma marginale major surface proteins 1a and 1b inhibit infectivity for cultured tick cells. *Veterinary parasitology*, 111(2), 247-260.
- Bram, R. A., & Roby, T. O. (1970). Attempts to Transmit Bovine Anaplasmosis with Anopheles Quadrimaculatus Say (Diptera: Culicidae) and Dermacentor Andersoni Stiles (Acarina: Ixodidae). *Journal of medical entomology*, 7(4), 481-484.
- Calderón, A., Cardona, J., & Vergara, Ó. (2013). FREQUENCY OF Babesia spp. IN HORSES OF MONTERIA, CORDOBA (COLOMBIA). *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 16(2), 451-458.
- Calderón, A., Martínez, N., & Iguarán, H. (2016). Frecuencia de hematozoarios en bovinos de una región del caribe colombiano. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 19(1), 131-138.
- Camacho-Nuez, M., de Lourdes Muñoz, M., Suarez, C. E., McGuire, T. C., Brown, W. C., & Palmer, G. H. (2000). Expression of polymorphic msp1β genes during acute Anaplasma marginale rickettsemia. *Infection and immunity*, 68(4), 1946-1952.
- Cardona Álvarez, J., Ensuncho Hoyos, C., & Vergara Garay, O. (2012). Frecuencia de hematótricos en tres explotaciones de búfalos (Bubalus bubalis) del departamento de Córdoba, Colombia. *Revista Científica*, 22(006).
- Corpoica. (2008). Formulación proyecto "Modelización del efecto del cambio climático sobre la distribución de la garrapata Rhipicephalus (Boophilus) microplus en el trópico alto colombiano. C.I. Tibaitatá. Mosquera, Cundinamarca. 61 pp.
- del Rosario Rodicio, M., & del Carmen Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(4), 238-245.
- Díaz, D., Valera, Z., De Andrade, E., Parra, O., Escalona, F., & Ramírez, R. (2003). Prevalencia de Anaplasma marginale en bovinos del sector La Piñata, municipio La Cañada de Urdaneta, estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica*, 13(3), 193-198.
- Donatien, A., & Lestoquard, F. (1936). Rickettsia bovis, nouvelle espece pathogene pour le boeuf. *Bull Soc Pathol Exot*, 29, 1057-1061.

- Doudier, B., Olano, J., Parola, P., & Brouqui, P. (2010). Factors contributing to emergence of Ehrlichia and Anaplasma spp. as human pathogens. *Veterinary parasitology*, 167(2), 149-154.
- Dumitrache, M. O., Matei, I. A., Ionică, A. M., Kalmár, Z., D'Amico, G., Sikó-Barabási, S., . . . Mihalca, A. D. (2015). Molecular detection of Anaplasma phagocytophilum and Borrelia burgdorferi sensu lato genospecies in red foxes (Vulpes vulpes) from Romania. *Parasit Vectors*, 8(1), 514.
- Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., . . . Rurangirwa, F. R. (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and'HGE agent'as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(6), 2145-2165.
- Dumler, J. S., Madigan, J. E., Pusterla, N., & Bakken, J. S. (2007). Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clinical infectious diseases*, 45(Supplement 1), S45-S51.
- Eleizalde, M. C., & Reyna-Bello, A. (2014). Mecanismos de Variación antigénica en Anaplasma marginale. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 55(2), 112-123.
- Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J.-L., Guglielmone, A., Horak, I., Jongejan, F., . . . Walker, A. (2006). The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus Boophilus (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Experimental and Applied Acarology*, 38(2), 219-235.
- Fedegan. (2013). Federacion Colombiana de Ganaderos
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 783-791.
- Figuroa, J., Chieves, L., Johnson, G., & Buening, G. (1993). Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of Babesia bigemina, Babesia bovis and Anaplasma marginale DNA in bovine blood. *Veterinary parasitology*, 50(1-2), 69-81.
- Futse, J. E., Brayton, K. A., Nydam, S. D., & Palmer, G. H. (2009). Generation of antigenic variants via gene conversion: Evidence for recombination fitness selection at the locus level in Anaplasma marginale. *Infection and immunity*, 77(8), 3181-3187.
- Futse, J. E., Ueti, M. W., Knowles, D. P., & Palmer, G. H. (2003). Transmission of Anaplasma marginale by Boophilus microplus: retention of vector competence in the absence of vector-pathogen interaction. *Journal of clinical microbiology*, 41(8), 3829-3834.
- Gale, K., Dimmock, C., Gartside, M., & Leatch, G. (1996). Anaplasma marginale: detection of carrier cattle by PCR-ELISA. *International journal for parasitology*, 26(10), 1103-1109.
- González, B. C., Obregón, D., Alemán, Y., Alfonso, P., Vega, E., Díaz, A., & Martínez, S. (2014). Tendencias en el diagnóstico de la anaplasmosis bovina. *Revista de Salud Animal*, 36(2), 73-79.

- Gordon, W., Brownlee, A., & Wilson, D. (1940). *Studies in louping-ill, tick-borne fever and scrapie*. Paper presented at the Proceedings: 3rd International Congress of Microbiology.
- Guglielmone, A. A. (1995). Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary parasitology*, 57(1-3), 109-119.
- Guglielmone, A. A., Peña, A. E., Keirans, J. E., & Robbins, R. G. (2003). *Ticks (Acari: Ixodida) of the neotropical zoogeographic region*: Atalanta; ICTTD-2.
- Gupta, R. S. (1995). Evolution of the chaperonin families (HSP60, HSP 10 and TCP-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells. *Molecular microbiology*, 15(1), 1-11.
- Gutiérrez, J. (2006). Identificación de órganos blanco en garrapatas de la especie *Boophilus microplus* para anticuerpos antigarrapata de bovinos inducidos por el inmunógeno Tick-Vac MK® del laboratorio Limor de Colombia SA mediante métodos de inmunoperoxidasa.[Pregrado]. *Bogotá, DC Pontificia Universidad Javeriana*.
- Harvey, J. W., Simpson, C. F., & Gaskin, J. M. (1978). Cyclic thrombocytopenia induced by a Rickettsia-like agent in dogs. *Journal of Infectious Diseases*, 137(2), 182-188.
- Hernandez-Ayazo, H., & Marien-Clarete, S. (2013). Entendiendo las ehrlichiosis humanas y destacando a un agente causal: anaplasma phagocytophilum. *Revista Ciencias Biomedicas*, 4(1).
- Herrera, M., Soto, Á., Urrego, V., Rivera, G., Zapata, M., & Rios, L. (2008). Frecuencia de hemoparásitos en bovinos del bajo Cauca y alto San Jorge, 2000-2005. *Revista MVZ Córdoba*, 13(3), 1486-1494.
- ICA. (2016). Instituto Colombiano de Agricultura - Censo Pecuario Nacional 2016. Instituto Colombiano de Agricultura (ICA), Bogotá, Colombia.
- Inokuma, H., Terada, Y., Kamio, T., Raoult, D., & Brouqui, P. (2001). Analysis of the 16S rRNA gene sequence of *Anaplasma centrale* and its phylogenetic relatedness to other ehrlichiae. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 8(2), 241-244.
- Jaimes-Dueñez, J., Triana-Chávez, O., & Mejía-Jaramillo, A. M. (2016). Parasitological and molecular surveys reveal high rates of infection with vector-borne pathogens and clinical anemia signs associated with infection in cattle from two important livestock areas in Colombia. *Ticks Tick Borne Dis*.
- Jimenez, A., Garcia, A., Angulo, C., & Gómez, J. (2013). Detección por pcr de *Anaplasma* spp. en caprinos del municipio de Los Santos, Santander-Colombia. *Spei Domus*, 9(19), 11-16.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. i., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research*, 30(14), 3059-3066.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., . . . Duran, C. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.

- Kocan, K. M., Blouin, E. F., & Barbet, A. F. (2000). Anaplasmosis control: past, present, and future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916(1), 501-509.
- Kocan, K. M., De La Fuente, J., Blouin, E., & Garcia-Garcia, J. (2004). *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host–pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*, 129(S1), S285-S300.
- Kocan, K. M., De la Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., & Ewing, S. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary parasitology*, 167(2), 95-107.
- Kocan, K. M., De La Fuente, J., & Cabezas-Cruz, A. (2015). The genus *Anaplasma*: new challenges after reclassification. *Rev Sci Tech*, 34(2), 577-586.
- 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. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(4), 698-712.
- Kocan, K. M., Goff, W., Stiller, D., Claypool, P., Edwards, W., Ewing, S., . . . Barron, S. J. (1992b). Persistence of *Anaplasma marginale*(Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni*(Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible calves. *Journal of medical entomology*, 29(4), 657-668.
- Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *biometrics*, 159-174.
- Lefort, V., Longueville, J.-E., & Gascuel, O. (2017). SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Molecular biology and evolution*.
- Lew, A. E., Gale, K. R., Minchin, C. M., Shkap, V., & de Waal, D. T. (2003). Phylogenetic analysis of the erythrocytic *Anaplasma* species based on 16S rDNA and GroEL (HSP60) sequences of *A. marginale*, *A. centrale*, and *A. ovis* and the specific detection of *A. centrale* vaccine strain. *Veterinary microbiology*, 92(1), 145-160.
- Márquez-Quivera, N. (2000). Principales enfermedades del bovino en Venezuela y su control preventivo. *Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay*, 1-12.
- Martínez, R. B., Álvarez, J. C., & Vilorio, M. V. (2015). Prevalencia de parásitos hematópicos endoglobulares en bovinos gyr puros en Córdoba, Colombia. *Revista Medicina Veterinaria*(31), 67-74.
- Martínez Sierra, J. C. (2010). *Incidencia de los hemoparasitos en la producción ovina en condiciones de pastoreo extensivo en el municipio de Tolviejo, Sucre*.
- Meldonado, J., Coronado, A., Kowalski, A., & Medina, J. (2013). Molecular evidence of transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in zebu neonatal calves of Venezuela.
- Montenegro, V. M., Bonilla, M. C., Kaminsky, D., Romero-Zúñiga, J. J., Siebert, S., & Krämer, F. (2017). Serological detection of antibodies to *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* and of *Dirofilaria immitis* antigen in dogs from Costa Rica. *Veterinary parasitology*, 236, 97-107.

- Noaman, V., & Shayan, P. (2010). Comparison of microscopy and PCR-RFLP for detection of *Anaplasma marginale* in carrier cattle. *Iranian journal of microbiology*, 2(2), 89.
- Ocampo, R. J., Camarillo, S. D. R., Cruz, R. R., Vega, L. E. O., & de la Fuente, J. (2012). *Anaplasma marginale*: análisis de las secuencias del fragmento variable del gen msp1alpha, y del gen msp4 de cuatro nuevas cepas mexicanas. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 46(1), 69-78.
- Orjuela, J., González, P., Patiño, A., Díaz, O., & Ortiz, J. (2010). Informe Técnico: Sistema de Información y Vigilancia Epidemiológica 2010. Subgerencia de Protección y Regulación Pecuaria, ICA.[Internet]. Colombia.[Citado julio 9 de 2012].
- Orjuela, J., González, P., Patiño, A., Díaz, O., Ortiz, J., & Monroy, W. (2009). Informe Técnico: Sistema de Información y Vigilancia Epidemiológica 2008. Subgerencia de Protección y Regulación Pecuaria, ICA.[Internet]. Colombia.[Citado julio 9 de 2011].
- Ortiz, M. Á. G., De la Torre, J. F. P., Ramírez, E. E. R., Ortiz, R. H., Mendoza, F. A., & Camarillo, S. D. R. (2014). TRANSMISIÓN TRANSOVÁRICA DE ANAPLASMA MARGINALE POR GARRAPATAS BOOPHILUS MICROPLUS.
- OVEJAS, A. d., Preliminar Plan De Desarrollo Municipal 2012 – 2015 “Confianza Y Compromiso Social”. 2012, Colombia Departamento De Sucre Municipio De Ovejas: Alcandía de ovejas. 1-122.
- Palmer, G. H., Brown, W. C., & Rurangirwa, F. R. (2000). Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Microbes and infection*, 2(2), 167-176.
- Palmer, G. H., Futse, J. E., Knowles, D. P., & Brayton, K. A. (2006). Insights into mechanisms of bacterial antigenic variation derived from the complete genome sequence of *Anaplasma marginale*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078(1), 15-25.
- Palmer, G. H., & McElwain, T. F. (1995). Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Veterinary parasitology*, 57(1), 233-253.
- Parola, P., Cornet, J.-P., Sanogo, Y. O., Miller, R. S., Van Thien, H., Gonzalez, J.-P., . . . Wongsrichanalai, C. (2003). Detection of Ehrlichia spp., Anaplasma spp., Rickettsia spp., and other eubacteria in ticks from the Thai-Myanmar border and Vietnam. *Journal of clinical microbiology*, 41(4), 1600-1608.
- Psaroulaki, A., Chochlakis, D., Sandalakis, V., Vranakis, I., Ioannou, I., & Tselentis, Y. (2009). Phylogentic analysis of *Anaplasma ovis* strains isolated from sheep and goats using groEL and mps4 genes. *Veterinary microbiology*, 138(3), 394-400.
- Puglla, C., & Vicente, S. (2013). Determinación de la prevalencia de la anaplasmosis bovina en el cantón Yantzaza de la provincia de Zamora Chinchipe.
- Pulido-Herrera, L. A., Rudas-LI, A., Betancourt, J. A., Grant, W. E., & Vilchez, S. J. (2015). Distribución inusual y potencial de la garrapata común del ganado, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, en zonas tropicales de alta montaña de los Andes colombianos. *Biota Colombiana*, 16(2), 75-95.

- Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., & Constable, P. D. (2006). *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*: Elsevier Health Sciences.
- Reinbold, J. B., Coetzee, J. F., Hollis, L. C., Nickell, J. S., Riegel, C. M., Christopher, J. A., & Ganta, R. R. (2010). Comparison of iatrogenic transmission of *Anaplasma marginale* in Holstein steers via needle and needle-free injection techniques. *American journal of veterinary research*, 71(10), 1178-1188.
- Rikihisa, Y. (1991). The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(3), 286-308.
- Rivero, M. (2003). Identificación de *Leishmania chagasi* en *Canis familiaris* en un foco de los Montes de María (tesis). *Sincelejo: Universidad de Sucre*.
- Rodak, B. F., & Carr, J. H. (2014). *Atlas de hematología clínica: MédicaPanamericana*.
- Rodríguez Camarillo, S., García Ortiz, M., Aboytes Torres, R., Cantó Alarcón, G., & Barigye, R. (2003). Inmunología e Inmunoprofilaxis de la Anaplasmosis Bovina. *Ciencia Veterinaria*, 9, 124-164.
- Scholar, E. M., & Pratt, W. B. (2000). *The antimicrobial drugs*: Oxford University Press, USA.
- Scoles, G. A., Broce, A. B., Lysyk, T. J., & Palmer, G. H. (2005). Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Journal of medical entomology*, 42(4), 668-675.
- Scoles, G. A., Miller, J. A., & Foil, L. D. (2008). Comparison of the efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: Ixodidae) with mechanical transmission by the horse fly, *Tabanus fuscicostatus* Hine (Diptera: Muscidae). *Journal of medical entomology*, 45(1), 109-114.
- 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. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1026(1), 95-102.
- Soto, K. (2010). Determinación de la prevalencia de anaplasmosis en el ganado bovino faenado en la empresa metropolitana de Rastro de Quito (EMRQ) mediante la aplicación de las técnicas de diagnóstico: microscopía de frotis sanguíneos, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ensayo inmunoenzimático competitivo (cELISA). *Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí*.
- Suarez, C. E., & Noh, S. (2011). Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary parasitology*, 180(1), 109-125.
- Sumner, J. W., Nicholson, W. L., & Massung, R. F. (1997). PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the groESL heat shock operon of *Ehrlichia* species. *Journal of clinical microbiology*, 35(8), 2087-2092.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.

- Tavares, M. L. M., Núñez, C., Rey, V. C., & Reyna, B. A. (2010). Evidencia serológica de Anaplasma spp. en pequeños rumiantes de Venezuela utilizando MSP5 recombinante en ensayos inmunoenzimáticos. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 20(5), 506-512.
- Team, R. C. (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013.
- Theiler, A. (1910). Anaplasma marginale (gen. and spec. nov.): the marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease: Pretoria: Government Printing and Stationary Office.
- Theiler, A. (1911). Further investigations into anaplasmosis of South African cattle: Pretoria: Government Printer and Stationery Office.
- Thioulouse, J., & Dray, S. (2007). Interactive multivariate data analysis in R with the ade4 and ade4TkGUI packages. *Journal of Statistical Software*, 22(5), 1-14.
- Trueblood, S., & Palmer, G. (1998). *Anaplasmosis: A Review of Diagnostic Techniques*. Paper presented at the 8th National Veterinary hemoparasite Disease Conference.
- Tutar, L., & Tutar, Y. (2010). Heat shock proteins; an overview. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(2), 216-222.
- Vecino, J. A. C., Echeverri, J. A. B., Cárdenas, J. A., & Herrera, L. A. P. (2013). Distribución de garrapatas Rhipicephalus (Boophilus) microplus en bovinos y fincas del Altiplano cundiboyacense (Colombia). *Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(1), 73-84.
- 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(1), 45-53.
- Yousefi, A., Rahbari, S., Shayan, P., Sadeghi-dehkordi, Z., & Bahonar, A. (2017). Molecular detection of Anaplasma marginale and Anaplasma ovis in sheep and goat in west highland pasture of Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(5), 455-459.
- Zhou, W., Rousset, F., & O'Neill, S. (1998). Phylogeny and PCR-based classification of Wolbachia strains using wsp gene sequences. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 265(1395), 509-515.

## ANEXOS

### Anexo 1. ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA

Fecha \_\_\_\_ \_\_\_\_ \_\_\_\_

DD MM AAAA

## ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA

**Proyecto: Incriminación de reservorios de *Leishmania* spp. en un foco urbano de leishmaniasis cutánea de los Montes de María, Costa Caribe Colombiana"**

Nombre del jefe de hogar o cónyuge: \_\_\_\_\_

Ocupación: \_\_\_\_\_ Tel: \_\_\_\_\_ # personas/vivienda: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Municipio: \_\_\_\_\_ Barrio: \_\_\_\_\_

Residencia en la zona (años): 0-3  3-10  10-20  Más de 20**1. Características de la Vivienda****1.1 Materiales de construcción, servicios básicos y sanitarios**

- Paredes: Prefabricadas Artesanal  Combinados
- Pisos: Tierra  Prefabricados  Artesanal  Combinados
- Techo: Prefabricados  Artesanal  Combinados
- Servicios públicos: Agua  Gas natural  Energía Alcantarillado
- Todos  Ninguno
- Disposición de Basuras: Campo abierto  Encerradas  Quemar  Empresa
- Disposición de excretas: Aire libre  Baño  Fosa séptica

**1.2 Patios**

- Presencia de arbustos: SI  NO
- Presencia de árboles: SI  NO
- Árboles caídos: SI  NO
- Hojarasca: SI  NO
- Gramíneas: SI  NO
- Suelo: Tierra  Pavimento

### 1.3 Entorno

- Zona boscosa cerca de la vivienda SI NO
- Distancia de la vivienda a zona boscosa o cultivos (mts): 1-10 10-100 > 100
- Con que frecuencia ingresa a estos sitios: Diario Semanal Mensual No va

### 2. Conocimiento sobre la enfermedad y el vector

- Conoce la leishmaniasis: SI NO
- Manifestación clínica más conocida: LC LMC LV
- Conoce el tratamiento de la enfermedad: SI NO
- Insecto que la transmite: Pito Aludo Capotillo Ejen Mosquito No sabe
- Momento que pica el insecto: MañanaTarde Noche Siempre No sabe
- Sitio de la vivienda donde pican: Interior Peridomicilio Extradomicilio No sabe
- Los insectos abundan en: Sequía Lluvia Siempre No sabe
- Control de plagas: Insecticidas Toldillos Ventilador

### 3. Presencia de otros animales domésticos

- Perros: SI Cuántos: [ ] NO  
Cazadores: [ ]
- Gatos: SI Cuántos: [ ] NO
- Dormitorio de los animales: Intra Peri Extra
- Aves de corral: SI Cuántas: [ ] NO

### 4. Animales silvestres

- Avistamiento de animales silvestres: SI NO
- Avistamientos frecuentes: Perezoso Zarigüeya Otro \_\_\_\_\_
- Presencia de roedores: SI NO
- Los roedores visitan: Intra Peri Extra Ninguno

## 5. Datos demográficos y antecedentes de la enfermedad

- Migración de las personas a lugares enzoóticos: SI NO
- Frecuencia con la que viaja: 0-3 meses 3-12 meses >12meses
- Sitio donde residía anteriormente: \_\_\_\_\_
- Casos anteriores de leishmaniasis: SI LC [ ] NO  
LMC [ ]  
LV [ ]
- Número de Personas Infectadas: [ ]
- Lugar de infección \_\_\_\_\_ Ocupación \_\_\_\_\_
- Diagnóstico \_\_\_\_\_ Tratamiento \_\_\_\_\_
- Casos bovinos de babesiosis: SI \_\_\_ NO \_\_\_ cuantos \_\_\_\_\_
- Casos bovinos de anaplasmosis: SI \_\_\_ NO \_\_\_ cuantos \_\_\_\_\_
- Casos bovinos de Tripanosomiasis: SI \_\_\_ NO \_\_\_ cuantos \_\_\_\_\_

## 6. Especie bovina

- Razas: Cebú Brahmán Holstein Normando Jersey
- Sexo: Macho Hembra Castrado
- Edad: < 1 1-6 7-12 13-30 años
- Fin de zootécnico de explotación: Carne Leche Doble propósito
- Condición corporal: Flacas Moderadas Gordas
- Lugar donde procede o compra el ganado: Ovejas Otro \_\_\_\_\_.
- Vacunanas: \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_

### 6.1 Entorno de la especie.

- Área de la finca o rancho: < 1 2-5 6-10 >20 hectáreas
- Cuantos metros se encuentra corral de la vivienda : < 1 1-6 7-12 mts
- Cuantos metros reposa el animal de la vivienda: < 1 1-6 7-12 mts
- Realiza labor de ordeño: Si No
- Cobertura arbórea presente: Cerca viva Arboles dispersos Solo pastos

- Donde pasta el ganado en época de sequía (Trashumancia): Bosque Orillas de carreteras Otros\_\_\_\_\_.
- Cuánto tiempo lleva esta labor: < 1 2-3 4-5 Horas
- Ha observado la presencia del vector (Aludo) en el ganado: Si No
- Sabe quién trasmite la leishmaniasis\_\_\_\_\_
- Ha observado la presencia garrapatas en el ganado: Si No
- Sabe que es la babesiosis o ranilla roja\_\_\_\_\_ Quién la trasmite\_\_\_\_\_
- Sabe que es la anaplasmosis ranilla blanca \_\_\_\_\_ Quién la trasmite\_\_\_\_\_
- Ha observado la presencia moscas o tábanos en el ganado: Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_
- Sabe que es la Tripanosomiasis\_\_\_\_\_ Quién la trasmite\_\_\_\_\_

## 6.2 Estado clínico de la especie

- Presencia de garrapatas\_\_\_\_\_, época del año\_\_\_\_\_
- Presencia de moscas \_\_\_\_\_ época del año\_\_\_\_\_
- Tratamiento: Ivermectina\_\_\_ garrapaticidas\_\_\_ extractos naturales:
- Regularidad de la aplicación\_\_\_\_\_.
- Vacunas\_\_\_\_\_
- Uso de antibióticos\_\_\_\_\_ Finalidad\_\_\_\_\_ medicado \_\_\_criterio propio\_\_\_\_\_
- Presenta lesiones cutáneas: Si N
- Número de lesiones cutáneas: 1-2 3-4 5-10
- Ubicación de la lesión: cabeza orejas cuello patas escroto
- Había presentado lesiones cutáneas antes: Si No donde\_\_\_\_\_
- Que tratamiento aplica\_\_\_\_\_.
- Presencia de ectoparásitos: Si  No
- Número de partos\_\_\_\_\_
- Deshidratación\_\_\_\_\_
- Disminución de la producción \_\_\_\_ Fiebre\_\_\_\_\_ Ictericia\_\_\_\_\_ hemoglobinurea\_\_\_\_\_
- Hemoglobinemia \_\_\_\_\_ mucosa pálida\_\_\_ taquicardia \_\_\_\_\_ taquipnea \_\_\_\_\_
- Inapetencia\_\_\_\_\_ Pérdida de peso\_\_\_\_\_, debilidad \_\_\_\_\_ anemia\_\_\_\_\_
- Estreñimiento\_\_\_\_\_ Cólicos\_\_\_\_\_, enteritis (intestino)\_\_\_\_\_, laminitis (dermatitis cascos) \_\_\_\_\_neumonía \_\_\_\_\_ infertilidad\_\_\_\_\_ Abortos \_\_\_\_\_, Cuantos\_\_\_\_\_

- temblor muscular\_\_\_\_\_ ataxia (falta de movimiento en los músculos de la panza)\_\_\_\_\_
- Frecuencia cardiaca ↑ (110 a 140/min.)(normal 36 a 40)\_\_\_\_\_
- Frecuencia respiratoria ↑ (80 a 90/min.)(normal 10 a 30)\_\_\_\_\_
- Observaciones\_\_\_\_\_.

Encargado de la encuesta: \_\_\_\_\_

## Anexo 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Proyecto: Incriminación de reservorios de *Leishmania* spp. en un foco urbano de leishmaniasis cutánea de los Montes de María, Costa Caribe Colombiana”**

### TOMA DE MUESTRA EQUINOS-BOVINOS

Fecha:

#### Identificación del Animal:

Nombre:

N° de Especímenes:

Dirección:

Barrio/ vereda:

Municipio:

Yo, \_\_\_\_\_ propietario de los animales bovinos/ Equino, certifico que he recibido la información concerniente a los objetivos que persigue el proyecto, los procedimientos, consecuencias y posibles beneficios que recibiré y autorizo a los investigadores para que tomen muestras necesarias para el estudio.

**FIRMA.**

### Anexo 3. Formato de utilizado para evaluar factores demográficos de bovinos

**Nombre del proyecto:** “Incrimación de reservorios de *Leishmania* spp. en un foco urbano de leishmaniasis cutánea de los Montes de María, Costa Caribe Colombiana” **Código:** 112956934732

Zona de estudio			Datos	Nombre					Picaduras por ectoparásitos y dípteros						
Localidad	Zona	predio	ID	Nombre	Edad	Raza	Sexo	# de crias	Garrapata	EpK	Moscas Tabano	EpK	Alú	EpK	Productos usados para el control
Datos	Vacunas														
ID	Vacuna mixta triple Carbunclo Sintomatico Hemoglobinuri Edema maligno	Brucela Aftosa	IBR-DVB. Rinotraqueitis Diarrea Viral Parainfluenza	Parainfluenza bovina	Matitis y diarreas en terneros	Enterotoxemia	Queratoconjuntivitis infecciosa bovina	Otra cual?							

Datos		Signos clínicos															
ID	Deshi	Baja produc	Fiebre	masti	icter	Sangre/orina	Mucosas palidas	Freq card	Freq resp	inape	Perdida de peso	debilidad	estreñi	diarrea	Colicos	Tembusc	laminitis
Est reprod			Uso de antibióticos				Lesiones cutáneas					Observaciones					
ID	Prob infet	Usa antib	Para q enfermedad	No. Lesiones	Ubicación	Causa proble											



#### Anexo 4. Informe de resultados finales

##### Informe de resultados Proyecto: **Búsqueda de homoparásitos en población bovina del municipio de Ovejes, Sucre.**

Nombre del propietario del predio:

Cordial y atento saludo.

Mediante la presente agradecemos formalmente, su participación e invaluable ayuda en el desarrollo de las actividades del Proyecto “**Búsqueda de homoparásitos en población bovina del municipio de Ovejes, Sucre**”, en este proyecto, los bovinos fueron evaluados en búsqueda de infección con parásitos del género *Babesia* y bacterias del género *Anaplasma*, causantes de la babesiosis y la anaplasmosis bovina, respectivamente.

Estas enfermedades producen cuadros febriles, los animales pierden el apetito, pueden separarse del resto, se debilitan, se deprimen y rehúsan a moverse. Las membranas mucosas se presentan pálidas y aumenta la frecuencia respiratoria y cardíaca. Generalmente, se desarrolla anemia con rapidez, que suele estar acompañada por hemoglobinuria y hemoglobinemia (hemoglobina y sangre en la orina). En los casos subagudos puede presentarse ictericia (la parte blanca de los ojos se torna de color amarillo). También se puede observar diarrea o estreñimiento y puede manifestarse un síndrome de insuficiencia respiratoria con disnea (dificultad respiratoria que se suele traducir en falta de aire) en animales afectados gravemente. La fiebre puede producir abortos en vacas preñadas y los toros a veces presentan una disminución temporal de la fertilidad.

En total en su predio se analizaron 5 animales, todos fueron positivos para infección con *Anaplasma*, no se encontró infección con parásitos causantes de babesiosis. La identidad de los animales y los resultados se detallan en la siguiente tabla

## RESULTADOS FINALES

Nombre del Bovino	<i>Babesia</i> Spp.	<i>Anaplasma</i> Spp.
-------------------	---------------------	-----------------------

De acuerdo a estos resultados se recomienda:

1. Notificar los resultados del trabajo a la federación de ganaderos de Sucre (FEDEGAN) y Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), con el fin de notificar la presencia de estos patógenos; solicitar las pruebas de diagnóstico oficial confirmatoria, con el fin de elaborar, evaluar e implementar medidas de control tendientes a prevenir la enfermedad (programa de vacunación) y control de los vectores.
2. Solicitar apoyo veterinario para el manejo y tratamiento de animales infectados y el control de garrapatas.

---

### **Alveiro José Pérez Doria**

C.C. 92532712 de Sincelejo, Sucre  
B.Sc, M.Sc. en Microbiología Tropical  
Estudiante de Ph.D en Medicina Tropical  
Universidad de Sucre  
Tel: 300 839 51 76

