



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**DETECCIÓN MOLECULAR DE *ANAPLASMA*
SP EN OVINOS DEL MUNICIPIO DE
MONTELÍBANO DEPARTAMENTO DE
CÓRDOBA-COLOMBIA.**

Luz Dary Nieves Barreto

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias.

Bogotá, Colombia

2018

DETECCIÓN MOLECULAR DE *ANAPLASMA* *SP* EN OVINOS DEL MUNICIPIO DE MONTELÍBANO DEPARTAMENTO DE CÓRDOBA-COLOMBIA

Luz Dary Nieves Barreto.

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencias-Microbiología

Director:

MV, Ph.D., Jimmy Jolman Vargas Duarte

Línea de Investigación:

Biología molecular de agentes infecciosos

Grupo de Investigación:

Control Genético en Salud Animal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Bogotá D.C, Colombia

2018

A mi hija Ana Sofía, quien con su apoyo y cariño incondicional me dio la fuerza y la voluntad necesarias para continuar en el camino a pesar de las dificultades.

Te amo.

Agradecimientos

A Dios por darme la salud y la fuerza necesarias para alcanzar esta meta.

A mi familia por el apoyo y la paciencia en este camino, especialmente a mi hija Ana Sofía, mi hermana Nelcy que siempre estuvieron ahí para apoyarme y a mis abuelitos Adán y Maria por ser un ejemplo de vida.

A Sebastián Beltrán porque sin su apoyo incondicional no hubiese sido posible culminar esta etapa de mi vida.

Al Dr. Jimmy Jolman Vargas Duarte, por acogerme en su grupo de investigación y darme la confianza y la guía necesaria para llevar a cabo este trabajo. A la Dra. Gloria Ramírez y el Dr. Víctor Vera porque durante el camino me ayudaron a formarme como persona y como profesional.

A mis amigos Yaneth Gómez, Oscar Infante, Patricia Torres, Angélica Saineda y Angie Díaz porque su apoyo fue de vital importancia durante este proceso, especialmente a Luis Carvajal quien fue pieza fundamental en la consecución de la muestras.

A Magda Beltrán porque más que mi amiga fue una co-tutora y sin su conocimiento y ayuda no hubiese sido posible tener los resultados obtenidos.

A todas las personas del Posgrado en Ciencias-Microbiología, especialmente al Dr. Daniel Uribe por las enseñanzas a nivel profesional y a Socorro Prieto por ser la excelente persona que es y por el apoyo incondicional brindado, a todos ustedes mil gracias.

Resumen

La anaplasmosis es una enfermedad de gran importancia en las regiones tropicales y subtropicales al rededor del mundo, que genera significativas pérdidas económicas en la producción ganadera mundial. Es una infección causada por bacterias del género *Anaplasma* y afecta una amplia variedad de hospederos, incluidos bovinos, ovinos, caninos y humanos. En Colombia, son escasos los reportes sobre la presencia de *Anaplasma* en pequeños rumiantes, las técnicas de diagnóstico utilizadas para la identificación incluyen historia, signos clínicos, microscopía y solo un estudio de tipo molecular, llevado a cabo en caprinos del departamento de Santander, sin embargo, estos reportes no han permitido identificar las especies de *Anaplasma* presentes en la población ovina del país.

La detección de *Anaplasma sp.*, se realizó utilizando muestras de sangre tomadas de ovinos clínicamente sanos en el municipio de Montelíbano, Córdoba, se evaluaron frotis sanguíneos mediante microscopia directa y se hicieron análisis moleculares inicialmente mediante PCR para el gen *msp4* de *Anaplasma spp*, posteriormente los animales positivos fueron evaluados para detectar *Anaplasma marginale* y *Anaplasma ovis* empleando también PCR para el gen *msp4*. Los productos se purificaron y se secuenciaron para caracterizar las especies de *Anaplasma* presentes y las secuencias obtenidas fueron empleadas en la construcción de un árbol filogenético para determinar la diversidad genética de las especies encontradas.

Se encontró que el 9.58% (16/167) de los individuos fueron positivos al examen microscópico directo mientras que el 35,33% (59/167), fueron inicialmente positivos a *Anaplasma spp* y posteriormente tipificados en su totalidad como *Anaplasma marginale*. El análisis BLASTn de las secuencias de los aislamientos mostró que no existe una gran variabilidad entre ellos, sin embargo, el estudio filogenético permitió determinar la presencia de dos genotipos dentro de la población, que se agrupaban en clados junto a aislamientos de Norte y Latino América respectivamente.

Palabras clave: Anaplasmosis, Ovinos, Colombia, Detección molecular.

Abstract

Anaplasmosis is a disease of great importance in tropical and subtropical regions around the world, which generates significant economic losses in world livestock production. It is an infection caused by bacteria of the genus *Anaplasma* and affects a wide variety of hosts, including cattle, sheep, dogs and humans. In Colombia, there are few reports on the presence of *Anaplasma* in small ruminants, the diagnostic techniques used for identification include history, clinical signs, microscopy and only one molecular study, carried out in goats of the Department of Santander, however, these reports have not allowed to identify the *Anaplasma* species present in the country's sheep population.

The detection of *Anaplasma sp.*, was carried out using blood samples taken from clinically healthy sheep in the municipality of Montelíbano, Córdoba, blood smears were evaluated by direct microscopy and molecular analyzes were initially made by PCR for the *msp4* gene of *Anaplasma spp*, subsequently the positive animals were evaluated to detect *Anaplasma marginale* and *Anaplasma ovis* also using PCR for the *msp4* gene. The products were purified and sequenced to characterize the *Anaplasma* species present and the sequences obtained were used in the construction of a phylogenetic tree to determine the genetic diversity of the species found.

It was found that 9.58% (16/167) of the individuals were positive to the direct microscopic examination while 35.33% (59/167) were initially positive to *Anaplasma spp* and later typified in its entirety as *Anaplasma marginale*. The BLASTn analysis of the sequences of the isolates showed that there is no great variability among them, however, the phylogenetic study allowed to determine the presence of two genotypes within the population, which were grouped in clades with isolates from North and Latin America respectively.

Key words: Anaplasmosis, Sheep, Colombia, Molecular detection.

Contenido	Pag.
Resumen.....	VII
Lista de figuras.....	XII
Lista de tablas	XIII
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XIV
Introducción	1
1. Marco teorico.....	5
1.1. Generalidades Anaplasmosis	5
1.1.1. Clasificación Taxonómica.....	6
1.1.2. Morfología	7
1.1.3. Genoma y proyeinas de superficie	7
1.2. Epidemiología.....	10
1.3. Transmision.....	13
1.4. Cuadro clinico	15
1.5. Diagnóstico.....	16
1.5.1. Examen Microscópico Directo.....	17
1.5.2. Diagnóstico Serológico.....	18
1.5.3. Diagnóstico Molecular.....	19
1.6 Anaplasmosis en Pequeños Rumiantes.....	19
1.7 Anaplasmosis ovina en Colombia.....	21
2. Materiales y metodos	23
2.1. Área de estudio.....	24
2.2. Población objeto de estudio	25
2.3. Muestreo	25
2.4. Examen Microscópico Directo.....	26
2.5. Extracción de ADN.....	26
2.6. Amplificación de ADN	27
2.7. Secuenciacion	28
2.8. Análisis filogenético.....	29
2.9. Análisis Estadístico.....	29
3. Resultados.....	30
3.1. Muestreo	30
3.2. Examen Microscópico Directo.....	32
3.3. Análisis Molecular.....	34
3.4. Análisis Filogenético	37
3.5. Análisis Estadístico.....	39
4. Discusión.....	40
5. Conclusiones y recomendaciones.....	44
Anexos.....	46
Bibliografía.....	51

Lista de Figuras	Pág.
Figura 1-1: Mapa del genoma de <i>Anaplasma marginale</i> cepa St. Maries.....	9
Figura 1-2: Hospederos de <i>Anaplasma spp.</i>	12
Figura 1-3: Representación Gráfica de la Transmisión Biológica.....	14
Figura 1-4: Ubicación del municipio de Montelíbano, Córdoba.....	24
Figura 1-5: Distribución por edad y sexo de los ovinos muestreados.....	30
Figura 1-6: Distribución por raza de los ovinos muestreados.....	31
Figura 1-7: Microscopía de frotis sanguíneo con tinción Giemsa.100X.....	32
Figura 1-8: Distribución de resultados obtenidos mediante Microscopia de frotis.....	33
Figura 1-9: Amplificación del gen msp4 de <i>Anaplasma spp.</i>	34
Figura1-10: Amplificación del gen msp4 de <i>Anaplasma Marginale.</i>	35
Figura1-11: Amplificación del gen msp4 de <i>Anaplasma ovis.</i>	35
Figura 1-12: Distribución de resultados obtenidos mediante PCR.....	36
Figura 1-13: Análisis filogenético del gen msp4 de <i>Anaplasma marginale.</i>	38

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1: Primer empleados para amplificación de *Anaplasma spp.*.....28

Tabla 1-2: Resultados obtenidos con Microscopía de frotis sanguíneo y PCR.....31

Tabla 1-3 Resultados obtenidos en el análisis estadístico.....39

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>ELISA</i>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<i>SDS-PAGE</i>	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<i>PCR</i>	Polymerase Chain Reaction
<i>RFLP</i>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<i>ICA</i>	Instituto Colombiano Agropecuario
<i>PBS</i>	Phosphate-buffered saline
<i>AND</i>	Ácido Desoxi Ribonucleico
Mm	Micrometro
μL	Microlitro
Ng	Nanogramo
mM	Milimol
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado
<i>m_{sp1α}</i>	Proteína mayor de superficie 1 alfa
<i>m_{sp1β}</i>	Proteína mayor de superficie 1 beta
<i>m_{sp2}</i>	Proteína mayor de superficie 2
<i>m_{sp3}</i>	Proteína mayor de superficie 3
<i>m_{sp4}</i>	Proteína mayor de superficie 4
<i>m_{sp5}</i>	Proteína mayor de superficie 5
kDa	Kilo Dalton

Introducción

La anaplasmosis es una enfermedad causada por *Anaplasma spp*, un microorganismo intracelular obligado transmitido por garrapatas. Se sabe que las especies de *Anaplasma* infectan células hematopoyéticas de una gran variedad de hospederos mamíferos que incluyen ganado bovino, ovino, caprino, rumiantes salvajes y humanos. El género *Anaplasma* comprende seis especies entre ellas *Anaplasma marginale* como la especie típica, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma marginale subespecies centrale* (*A. centrale*), *Anaplasma bovis* y *Anaplasma ovis* (Dumler et al., 2001; OIE, 2015)

A. marginale infecta principalmente al ganado bovino, aunque también se ha reportado en una amplia variedad de rumiantes silvestres (Kuttler, 1984) y recientemente se ha encontrado en pequeños rumiantes (Jalali et al., 2013; Yousefi et al., 2017). *Anaplasma marginale subespecies centrale* (*A. centrale*) causa una forma leve de anaplasmosis en el ganado y se ha usado como vacuna contra *A. marginale*. *A. phagocytophilum* afecta principalmente humanos, caninos y equinos, mientras que *A. platys*, causa trombocitopenia cíclica en caninos y *A. bovis* infecta leucocitos de rumiantes domésticos y silvestres (Aubry & Geale, 2011) finalmente *A. ovis* infecta principalmente a ovejas y cabras, sin embargo ha sido identificado en rumiantes silvestres (de la Fuente et al., 2006; de la Fuente et al., 2004; Hornok et al., 2007)

Los principales signos clínicos de anaplasmosis incluyen; anemia e ictericia que se observan como una coloración amarillenta de las membranas mucosas de los ojos y las encías, además los animales pueden presentar movimientos descoordinados, dificultad para respirar, abortos, disminución en la producción de la leche y muerte en algunos casos (Aubry & Geale, 2011; Kocan et al., 2010). La Anaplasmosis además de ser un problema de salud para los animales, genera pérdidas económicas a los productores, ya sea de forma directa por la presentación de cuadros clínicos o de forma indirecta por los gastos ocasionados por ejemplo en el control de los vectores que intervienen en el ciclo de infección (Ortiz, Palencia, Gerdtts, & Hurtado, 2012).

Los métodos de diagnóstico convencional incluyen la historia, signos clínicos, lesiones postmortem, evaluación por microscopia directa y pruebas serológicas, sin embargo dichas técnicas tienen diversas desventajas en términos de sensibilidad y especificidad, por ejemplo, el examen microscópico directo de frotis sanguíneos en busca de estructuras compatibles con *Anaplasma* no proporciona información relacionada con diferencias entre los agentes que afectan a los ovinos, así mismo estas pruebas tienen poca sensibilidad debido a la posibilidad de malinterpretar los resultados con eventos de granulación tóxica, diversas inclusiones citoplasmáticas y manchas de artefactos en el portaobjetos (Schotthoefer et al., 2013).

Técnicas basadas en ADN han sido desarrolladas y validadas para identificación, caracterización y estudio de este tipo de patógenos, permitiendo la identificación del microorganismo a niveles de detección muy por debajo frente a las técnicas microscópicas comúnmente utilizadas (Salih, El Hussein, & Singla, 2015), ya que tienden a tener un mayor grado de sensibilidad durante la fase aguda de la enfermedad y ofrecen la posibilidad de detectar co-infecciones cuando se realizan por ejemplo, PCR de tipo multiplex. En particular, las técnicas moleculares representan una alternativa atractiva frente a la serología y el análisis de frotis de sangre para el diagnóstico clínico debido a su capacidad para detectar y diferenciar entre especies, por lo tanto, en áreas donde las distribuciones de estos organismos pueden superponerse, el uso de esta prueba puede mejorar el tiempo y precisión al diagnóstico (Schotthoefer et al., 2013).

Se han realizado varios estudios en diversas partes del mundo para identificar y caracterizar los organismos *Anaplasma* que afectan a los ovinos, generado una variedad

de información que ha facilitado la comprensión de la epidemiología molecular de estos patógenos en otras regiones. Sin embargo, en el país son escasos los reportes sobre la presencia de *Anaplasma* en pequeños rumiantes que además no indican la especie implicada (Avila et al., 2013; Jimenez, Garcia, Angulo, & Gómez, 2013), esto genera una importante brecha en el conocimiento de esta enfermedad en el país y hace necesaria la identificación de las especies circulantes en la población ovina Colombiana.

El presente estudio se realizó con el fin de identificar y caracterizar las especies de *Anaplasma* presentes en ovinos del municipio de Montelíbano, Córdoba-Colombia, por lo tanto, proporciona valiosos hallazgos sobre las especies de *Anaplasma* presentes en esta población y puede ayudar a la comprensión de la epidemiología de las infecciones por *Anaplasma* en ovinos del municipio.

1. Marco Teórico.

1.1 Generalidades Anaplasmosis

El orden *Rickettsiales* agrupa a las familias *Anaplasmataceae* y *Rickettsiaceae*, dentro de la primera las especies de *Anaplasma spp.*, *Ehrlichia spp.*, y *Neorickettsia spp.*, son patógenos de gran impacto en humanos y animales. En general, los miembros del género *Anaplasma* y *Ehrlichia*, se replican en vacuolas citoplasmáticas de las células hematopoyéticas del hospedador mamífero y a su vez tienen como vector a las garrapatas (Aubry & Geale, 2011; Quiroz Romero, Figueroa Castillo, Ibarra Velarde, & Lopez Arellano, 2011)

El género *Anaplasma*, fue descubierto en 1910 por Sir Arnold Theiler e incluye patógenos que afectan la salud humana y animal, generando importantes pérdidas económicas (Kocan et al., 2010), no solo por las muertes que ocasionan sino por el deterioro de las condiciones físicas de los animales que las padecen, la disminución de las tasas de producción y el aumento de los costos, asociados a el control de las cargas parasitarias o al tratamiento de animales enfermos (Herrera et al., 2008). Se sabe que las especies de *Anaplasma* infectan células sanguíneas de una gran variedad de hospederos mamíferos que incluyen al ganado bovino, ovino, caprino, rumiantes salvajes y humanos.

El género *Anaplasma* comprende varias especies entre ellas *Anaplasma marginale* como la especie típica, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma marginale*

subespecies centrale (*A. centrale*), *Anaplasma bovis* y *Anaplasma ovis* (Dumler et al., 2001; OIE, 2015)

1.1.1 Clasificación Taxonómica

Anaplasma es una bacteria que se clasifican dentro del orden *Rickettsiales*, familia *Anaplasmataceae*, género *Anaplasma* (Kuttler, 1984). Las especies de *Anaplasma* se consideraron en principio protozoos parasitarios, pero la investigación posterior reveló que no poseían atributos que justificaran esta descripción. Desde la última revisión aceptada de la taxonomía, en 2001, la familia *Anaplasmataceae* consta ahora de cuatro géneros: *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* y *Wolbachia* (OIE, 2015). Esta nueva designación se hizo mediante el análisis filogenético, empleando los genes 16S rRNA, groEL y los genes de proteínas de superficie que indicaron que las designaciones de taxones existentes eran defectuosas, por lo tanto, se incluyeron todos los miembros de las familias *Ehrlichieae* y *Wolbachieae* en la familia *Anaplasmataceae* y se eliminó de la estructura de la familia *Rickettsiaceae* (Dumler et al., 2001),

Adicionalmente, el género se modificó para incluir a *Anaplasma phagocytophilum* (antes *Ehrlichia phagocytophilum*), *Anaplasma bovis* (antes *Ehrlichia bovis*). y *Anaplasma platys* (antes *Ehrlichia platys*), esta nueva clasificación demandó la enmienda de la descripción de los miembros de la familia *Anaplasmataceae* para especificarlos como microorganismos que desarrollan la infección dentro de vacuolas citoplasmáticas en células del hospedero que incluyen eritrocitos, células reticuloendoteliales, células fagocíticas derivadas de médula ósea, células endoteliales y células de tejidos reproductivos de insectos, helmintos y artrópodos (Dumler et al., 2001). El género *Aegyptianella* se mantiene dentro de la familia *Anaplasmataceae* como género *incertae sedis* (OIE, 2015).

1.1.2 Morfología

Los integrantes del género *Anaplasma* se definen como microorganismos Gram-Negativos, pequeños, a menudo pleomórficos, cocoides a elipsoidales, no móviles que residen dentro de vacuolas citoplasmáticas, ya sea solos o en forma de inclusiones compactas presentes en células hematopoyéticas maduras o inmaduras, particularmente células mieloides y neutrófilos, incluyendo eritrocitos de hospederos mamíferos (Aubry & Geale, 2011). Se consideran agentes etiológicos de enfermedades en diferentes hospederos mamíferos entre ellos perros, humanos y rumiantes como ganado, cabras, ovejas además de una gran variedad de mamíferos silvestres (Dumler et al., 2001; Quiroz Romero et al., 2011).

1.1.3 Genoma y proteínas de superficie

Estudios realizados empleando análisis con enzimas de restricción y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), determinaron que *Anaplasma marginale* presenta un ADN circular de entre 1200 y 1250 Kpb y mediante análisis espectral del ADN se encontró un contenido de G+C de 56 % en moles (Allemans, Kamper, Viseshakul, & Barbet, 1993). Se han identificado seis genes (*msp1 α* , *msp1 β* , *msp2*, *msp3*, *msp4* y *msp5*) que codifican para las proteínas principales de superficie, las cuales desempeñan un papel crucial en la interacción de *Anaplasma* con las células del hospedero (Kocan, de la Fuente, Guglielmone, & Melendez, 2003).

Los genes *msp1 α* , *msp4* y *msp5* son individuales, mientras que *msp1 β* , *msp2* y *msp3*, pertenecen a familias de multigenes y pueden variar antigénicamente dentro de las cepas de *Anaplasma* (Allemans et al., 1993; Kocan et al., 2003). La secuenciación del genoma completo de la cepa St. Maries, permitió determinar que la superficie celular está dominada por la superfamilia *msp2* y la superfamilia *msp1* (Figura 1-1) que contienen proteínas inmunodominantes, además que el genoma contiene pseudogenes funcionales inusuales

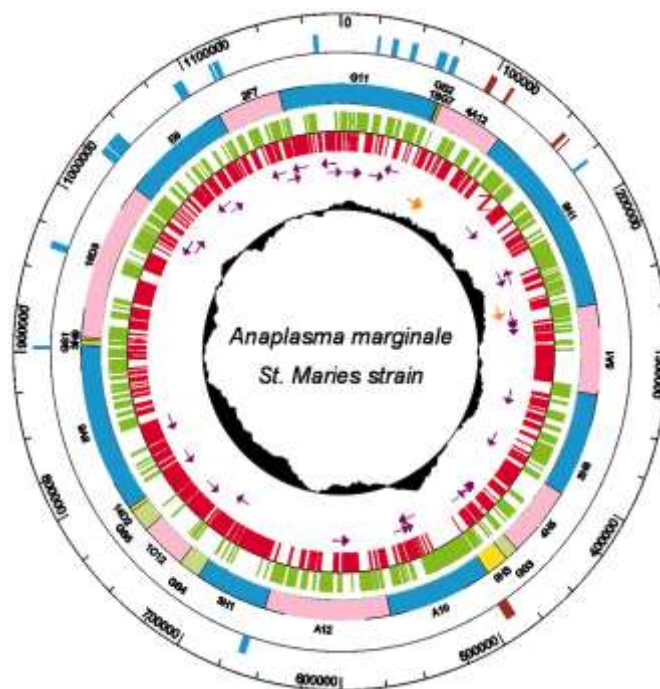
(pertenecientes a la superfamilia *mSP2*) que desempeñan un papel fundamental en la variación antigénica del revestimiento superficial (Brayton et al., 2005).

El gen *mSP1 α* presenta una sola copia en el genoma que codifica la proteína de superficie MSP1a, una adhesina para eritrocitos bovinos y células marcadoras que está regulada diferencialmente y afecta la infección y transmisión de *A. marginale* por garrapatas. Este gen presenta un alto polimorfismo entre los aislamientos de distintas regiones geográficas, debido a que posee secuencias de oligonucleótidos repetidas en tándem, lo que ha permitido que se emplee como marcador genético para la detección específica de diversos aislamientos (J. de la Fuente, Van Den Bussche, Prado, & Kocan, 2003). Por otro lado, el gen *mSP1 β* está formado por una familia de multigenes con por menos cuatro copias en el genoma, al igual que *mSP1 α* este gen presenta secuencias repetidas, aunque de menor extensión y se considera que esta familia de genes es polimórfica entre cepas de diferentes regiones geográficas (Bowie, de la Fuente, Kocan, Blouin, & Barbet, 2002). El complejo proteico MSP1 está compuesto por un heterodímero de dos moléculas sin relación estructural el polipéptido MSP1a, codificado por el gen *mSP1 α* y MSP1b codificado por *mSP1 β* (Battilani, De Arcangeli, Balboni, & Dondi, 2017). MSP1a solo ha sido identificado en *A. marginale* a pesar de los intentos de clonar este gen de *A. centrale*, *A. ovis* y *A. phagocytophilum* (de la Fuente, Lew, et al., 2007). El peso molecular de este polipéptido es variable entre aislamientos geográficos debido a un número variable repeticiones en tándem de aminoácidos en la porción amino-terminal de la proteína (de la Fuente et al., 2003; Kocan et al., 2003).

El gen *mSP2* está formado por una familia multigénica en *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis* mientras que en *A. phagocytophilum* está codificado por un solo gen, *mSP2* presenta alta variabilidad principalmente en el extremo 5' y codifica para la proteína MSP2 que experimenta variación y selección antigénica en bovinos y garrapatas, contribuyendo así al mantenimiento de infecciones persistentes (Palmer, Abbott, French, & McElwain, 1998). El gen *mSP3* también forma parte de una familia multigénica, cuyas copias se encuentran distribuidas a través del cromosoma (Palmer, Barbet, Kuttler, & Mcguire, 1986). MSP2 y MSP3 son las proteínas inmunodominantes en *A. marginale*, la primera

es una proteína de membrana externa detectada en todas las especies de *Anaplasma* y es la proteína mejor caracterizada de la superfamilia MSP2. La variación antigénica de MSP2 ocurre durante infecciones persistentes en el ganado y garrapatas, permitiéndole evadir la respuesta inmune y contribuir al mantenimiento de la infección, mientras que la proteína MSP3 codificada por el *msp3* varía en propiedades antigénicas y estructurales entre aislamientos geográficos de *A. marginale* (Alleman et al., 1997; Barbet et al., 2001; Kocan et al., 2003)

Figura1-1: Mapa del genoma de *Anaplasma marginale* cepa St. Maries.



Tomado de Brayton et al., 2005

El gen *msp4* se encuentra en una sola copia en el genoma y codifica MSP4 una proteína de 31 kDa altamente conservada en todas las especies de *Anaplasma*. Sin embargo su función es desconocida. Los estudios filogenéticos de aislamientos utilizando *msp4* y *msp1α* proporcionan información valiosa sobre la biogeografía y la evolución de los genotipos de *Anaplasma*, sin embargo, los análisis usando *msp1α* son de gran utilidad sólo si se comparan un amplio número de aislamientos de un área geográfica

determinada (José de la Fuente, Atkinson, et al., 2007; Palmer et al., 1986). Finalmente, el gen *msp5* se presenta también en una sola copia dentro del genoma y se ha descrito que es un gen altamente conservado entre cepas. La presencia de este gen en todas las especies de *Anaplasma* sugiere que es esencial en el ciclo de vida del microorganismo (Kocan, de la Fuente, Blouin, & Garcia-Garcia, 2004). La proteína MSP5 es una proteína inmunodominante identificada en *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis* y *A. phagocytophilum*, esta se conserva y es altamente estable en el género *Anaplasma*, aunque su función es desconocida.

1.2 Epidemiología.

La anaplasmosis se produce en áreas tropicales y subtropicales en todo el mundo, convirtiéndose en una limitante importante en la producción de muchos países, se considera endémica en África, Asia y América Latina, en los Estados Unidos ha sido reportada en casi todos los estados, siendo enzoótica en los estados del Atlántico Sur, de la Costa del Golfo y en algunos estados del Oeste (Kocan et al., 2010). La transmisión de la enfermedad se da de forma biológica, mecánica y vertical, estas dependen a su vez de la presencia de vectores (biológicos y mecánicos), la existencia de animales susceptibles y de condiciones ecológicas favorables para el desarrollo de la infección (Brayton, 2012; Kocan et al., 2004).

Se reporta que *Anaplasma* es transmitida de forma biológica por al menos 19 especies de garrapatas, dentro de las cuales se encuentran garrapatas blandas y duras, principalmente las del género *Rhipicephalus spp.*, (Incluidas las ex *Boophilus*), *Dermacentor spp.*, *Ixodes sp.* y *Hyalomma spp* (OIE, 2015). La distribución geográfica de las garrapatas y la variación en su población está determinada por varios factores como el clima, la configuración del paisaje y los movimientos de sus hospederos, en los últimos años se ha sugerido que *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ha aumentado su distribución altitudinal, de acuerdo con el aumento de la temperatura de los últimos años y se espera que la distribución de la anaplasmosis continúe cambiando, como resultado del calentamiento global (Cortés-vecino, 2011). En Colombia, se han descrito áreas potenciales de distribución de la

garrapata en el altiplano cundiboyacense, una región donde naturalmente no existe presencia de las mismas, encontrando que la región nororiental del altiplano presenta zonas potencialmente óptimas para el establecimiento de esta especie (Pulido-Herrera, Rudas, Betancourt, Grant, & Vilchez, 2015).

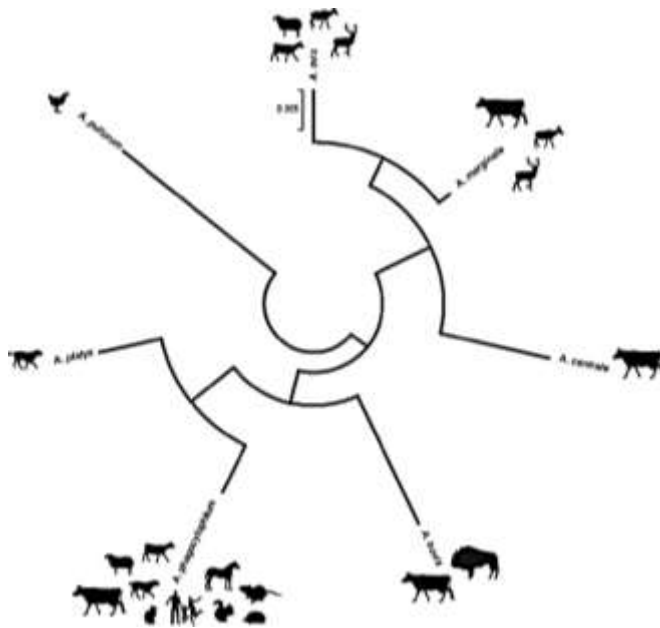
Anaplasma marginale es endémica en todo el mundo en áreas tropicales y subtropicales, generando enfermedad hemolítica de leve a severa, afectando principalmente a los bovinos, sin embargo, recientemente se ha encontrado en ovejas y cabras (Yousefi et al., 2017). Además se ha reportado en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*), venados de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), venados de cola negra (*Odocoileus hemionus columbianus*), muflón canadiense (*Ovis canadensis*), Alces de las Montañas Rocosas (*Cervus elaphus nelsoni*), gnu negro (*Connochaetes gnu*), entre otros y se han observado *Anaplasmas* sin identificar la especie en Búfalos (*Syncerus caffer*), jirafas (*Giraffa camelopardalis*), Gacelas (*Gazella thompsonii*) y antílopes (*Hippotragus niger*), con evidencia serológicas de infección en una gama aún más amplia de especies de rumiantes (Kuttler, 1984).

Anaplasma ovis infecta principalmente ovejas y cabras alrededor del mundo, sin embargo se ha reportado en rumiantes silvestres, entre ellos el venado bura (*Odocoileus hemionus*), el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), el alce (*Cervus elaphus*), el antílope de pronghorn (*Antilocapra americana*) y el borrego cimarrón (*Ovis canadensis*) (José de la Fuente et al., 2006). Este último desarrolla enfermedad clínica cuando se infecta experimentalmente, sugiriendo que las poblaciones silvestres pueden verse afectadas si se exponen al patógeno, sin embargo, se desconoce el papel de estos rumiantes en la epidemiología de *A. ovis* (de la Fuente et al., 2006; Kocan et al., 2010). Se consideran que las garrapatas *Rhipicephalus bursa* y *Dermacentor andersoni* son los principales vectores de la bacteria, sin embargo, *Rhipicephalus sanguineus* y *Melophagus ovinus* también pueden estar involucrados (Hornok et al., 2007).

Por otro lado, *Anaplasma marginale subespecies centrale* (*A. centrale*) causa una forma leve de anaplasmosis en el ganado y se ha usado como vacuna contra *A. marginale*. *A.*

phagocytophilum afecta principalmente humanos, caninos y equinos, produciendo la anaplasmosis granulocítica humana (HGA), la anaplasmosis granulocítica canina y la anaplasmosis granulocítica equina, respectivamente, aunque es un patógeno presente en todo el mundo, parece afectar rumiantes domésticos y salvajes solamente en Europa (Aubry & Geale, 2011). *A. platys*, causa trombocitopenia cíclica en caninos y *A. bovis* infecta los leucocitos de rumiantes domésticos y salvajes (Figura 1-2) (Herndon, Palmer, Shkap, Knowles, & Brayton, 2010; Posada-Zapata et al., 2017).

Figura1-2: Hospederos de *Anaplasma* spp.



Tomado de Battilani et al, 2017

Factores asociados al hospedero pueden modular la infección por *Anaplasma*, la existencia de inmunidad previa, la velocidad de transmisión y la edad en la que ocurre la primo-infección con el microorganismo, determinan en gran medida el efecto clínico que causará la infección en el animal. En zonas endémicas, donde la transmisión del microorganismo presenta un comportamiento dinámico, se genera un estado de equilibrio

entre el proceso infeccioso y la inmunidad del hospedador, definido como estabilidad enzoótica (Aubry & Geale, 2011).

En este proceso, los animales se infectan a una edad temprana, sin manifestar signos clínicos debido a que poseen inmunidad pasiva transferida por la madre, dicha inmunidad perdura durante un periodo de tiempo y una vez transcurrido este lapso se desarrolla en el animal una inmunidad adquirida condicionada a la inoculación de hemoparásitos por la constante presencia del vector en la zona (Avila et al., 2013).

Por otro lado, en regiones donde la población de garrapatas no es constante debido a la implementación de programas de control, el equilibrio enzoótico se rompe y no todos los animales jóvenes se infectan durante los primeros meses de vida, generándose así una proporción de la población que es susceptible a la enfermedad, estos individuos pueden desarrollar la forma clínica aguda de la enfermedad al tener contacto con el microorganismo, de este modo la anaplasmosis presenta un comportamiento periódico que coincide con los períodos de reproducción de las garrapatas, dicha situación se denomina inestabilidad enzoótica y también ocurre cuando animales adultos susceptibles son introducidos desde zonas libres de la enfermedad a regiones con una alta población de vectores donde la enfermedad es endémica (Aubry & Geale, 2011).

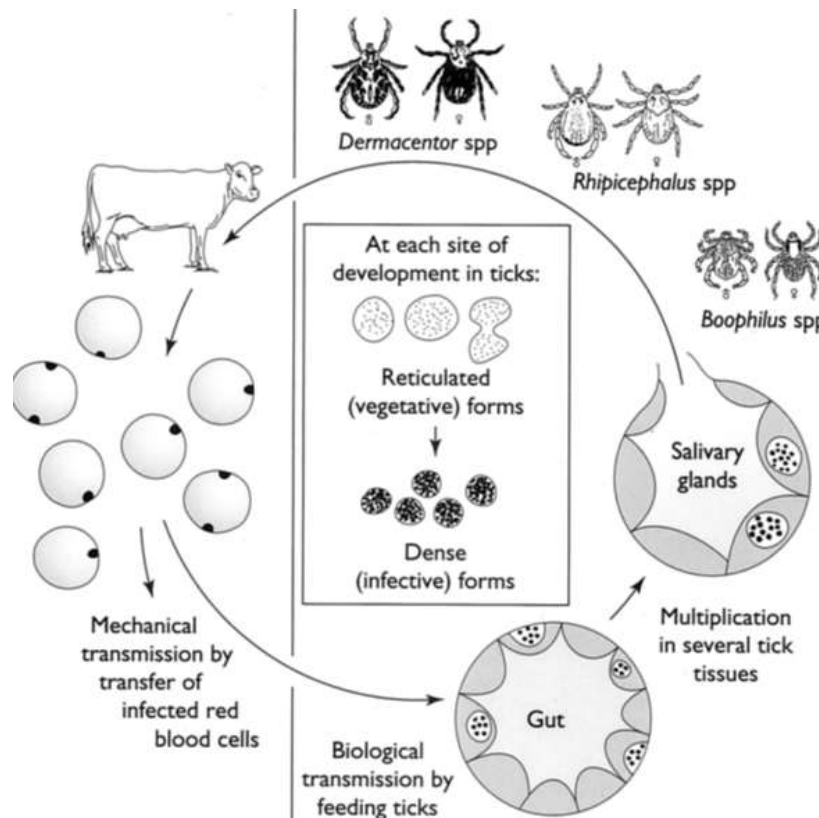
1.3 Transmisión.

La anaplasmosis puede ser transmitida de forma biológica a través de artrópodos hematófagos que incluyen varios géneros de garrapatas dentro de los que se destacan *Boophilus spp.*, y *Dermacentor spp.* (Zaugg, 1986) o de forma mecánica, en la que se introducen directamente eritrocitos infectados, ya sea por inoculación natural por picaduras de moscas y mosquitos o a través de material quirúrgico contaminado (Aubry & Geale, 2011). Además, se ha reportado la transmisión vertical de *A. marginale*, *A. centrale* y

Anaplasma ovis durante el segundo y tercer trimestre de gestación en bovinos y ovinos (Zaugg, 1987)

La transmisión biológica es el modo de transmisión más común en todo el mundo y se logra fundamentalmente por transferencia de garrapatas infectadas a animales susceptibles, en este proceso los machos juegan un papel importante como vector; ya que pueden estar infectados de forma permanente y servir como reservorio para la infección (OIE, 2015). Se sabe que la especie de *Anaplasma* son transmitidas por al menos 19 especies de garrapatas, dentro de las cuales se encuentran incluidas las garrapatas blandas *Argas persicus*, *Ornithodoros lahorensis*, y los géneros de garrapatas duras, *Rhipicephalus spp.*, *Dermacentor spp.*, *Ixodes sp.* y *Hyalomma spp* (de la Fuente et al., 2005).

Figura 1-3: Representación Gráfica de la Transmisión Biológica



Tomada de Kocan, 2003

Después de ingerir eritrocitos infectados, *Anaplasma* se divide dentro del intestino de la garrapata y luego migra a la glándula salival, donde se transmiten a los animales no infectados a través de la saliva después de una picadura de garrapata (Figura 1-3). En cada sitio de desarrollo en la garrapata se multiplica dentro de inclusiones unidas a las membranas, llamadas colonias, cada ciclo involucra dos estadios: una forma reticulada o vegetativa y una forma densa infectiva. En la forma reticulada el organismo se divide por fisión binaria (forma de reproducción asexual) dentro de las colonias, y posteriormente estas se condensan para dar lugar al estado denso capaz de sobrevivir fuera de las células e infectar a otras (Kocan et al., 2003)

La transmisión también puede ocurrir mecánicamente a través de eritrocitos contaminados procedentes de agujas contaminadas, sierras de descornado, pinzas nasales, equipos de tatuaje, dispositivos de marcado de orejas e instrumentos de castración, así como de moscas y mosquitos principalmente e los géneros *Tabanus*, *Stomoxys*, *Culex* y *Aedes* (Katherine M. Kocan et al., 2010). La transmisión vertical de *Anaplasma* ocurre cuando la madre sufre anaplasmosis aguda y los agentes infecciosos cruzan la barrera placentaria e infectan al feto, este fenómeno probablemente no sucede dentro de los eritrocitos, sino como una fase extraeritrocitaria del parásito durante el segundo y tercer trimestre de gestación en bovinos y ovinos (Kocan et al., 2003; Zaugg, 1987)

1.4 Cuadro clínico

Los anaplasmosis se caracteriza por producir principalmente anemia e ictericia, sin embargo, también es frecuente la presentación de fiebre, pérdida de peso, aborto, letargo, anorexia, disminución de la producción de leche, retraso del crecimiento y muerte (Aubry & Geale, 2011; Kocan et al., 2010). Las infecciones con *Anaplasma* causan mortalidades y morbilidades variables generando una reducción en el rendimiento productivo del ganado en regiones tropicales y subtropicales (Kocan et al., 2003) y la gravedad de la enfermedad se asocia principalmente con el grado de anemia que genera en el animal, caracterizada por palidez de las membranas mucosas y aumento de la frecuencia cardíaca y respiratoria.

Luego de la infección, los organismos de *Anaplasma* se multiplican considerablemente provocando crisis hemolíticas, a partir de entonces, el aumento del nivel de eritrocitos infectados provoca que se establezcan procesos de fagocitosis dentro de las células endoteliales, conduciendo a anemia hemolítica e ictericia (Aubry & Geale, 2011). Las alteraciones hematológicas y bioquímicas son indicadores importantes de la gravedad de la enfermedad siendo los hallazgos más comúnmente encontrados trombocitopenia, anemia, aumento en los niveles de enzimas hepáticas y leucopenia con neutropenia marcada (Stuen et al., 2011). La anemia máxima ocurre entre el primero al sexto día después de la infección y persiste incluso por 15 días, en donde se pierden hasta el 75 % de los eritrocitos.

El período de convalecencia en bovinos es de uno a dos meses y está acompañado por aumento en la hematopoyesis, sin embargo, puede presentarse recurrencia de la enfermedad. Aunque los parámetros hematológicos regresan a la normalidad el ganado recuperado puede permanecer infectado persistentemente con bajos niveles de parasitemia, que fluctúan durante largos periodos de tiempo convirtiéndose en portadores asintomáticos de la enfermedad (Kocan et al., 2010), esta forma además de presentarse como secuela de la convalecencia de las infecciones agudas, también puede ser el resultado de una infección inducida con cepas atenuadas (Aubry & Geale, 2011)

1.5 Diagnóstico

El diagnóstico de la anaplasmosis es un tema de alto interés en medicina veterinaria, ya que debido a la dificultad que se tiene para detectar individuos portadores dentro de los rebaños, es considerada una enfermedad de difícil control, esto debido principalmente a que estos animales no presentan signos clínicos y no muestran suficientes cuerpos de inclusión dentro de los glóbulos rojos como para ser detectados por los métodos de diagnóstico tradicional, convirtiéndose en una importante fuente de contaminación para el resto de los animales, por esto es indispensable el desarrollo de pruebas diagnósticas que

permitan identificar de la forma más eficiente y efectiva posible a los portadores de la enfermedad (Alessandra & Santo, 2012; de la Fuente, Lew, et al., 2007; Salih et al., 2015).

La técnica Gold Estándar para la detección de *Anaplasma* spp, es la subinoculación de sangre de un animal sospechoso en un ternero esplenectomizado que es susceptible a la infección (Coetzee et al., 2006a). Si el donante está infectado, se observará estructuras compatibles con *Anaplasma* al examinar el frotis sanguíneo, generalmente dentro 4 semanas, sin embargo, este período puede extenderse hasta 8 semanas. Este método es costoso y plantea problemas de bioética y bienestar animal, ya que los terneros esplenectomizados se ven seriamente afectados después de subinoculación de la sangre y, a menudo, deben ser sometidos a eutanasia (OIE, 2008a). Por estas razones, no es factible usar la subinoculación de terneros esplenectomizados como Gold Estándar para la validación de pruebas diagnósticas (Aubry & Geale, 2011).

Por lo tanto, en la actualidad, el diagnóstico de la anaplasmosis se basa en la historia, los signos clínicos y los hallazgos de la necropsia y la confirmación se realiza mediante pruebas de laboratorio, que incluyen el examen microscópico directo, así como las pruebas de tipo serológico y molecular (Aubry & Geale, 2011; Salih et al., 2015; Schotthoefer et al., 2013).

1.5.1 Examen microscópico directo.

La anaplasmosis aguda se confirma mediante examen microscópico directo preparado a partir de frotis de sangre u órganos, que son teñidos generalmente con Giemsa, Romanowski, Write, Azul toluidina o Naranja de Acridina y posteriormente son examinados al microscópico en busca de estructuras compatibles con el microorganismo. *Anaplasma marginale* se observa como un cuerpo denso, de aproximadamente 0,3–1,0 μm de diámetro, redondeado y muy coloreado dentro de los eritrocitos, la mayoría de estos cuerpos se localizan en el margen del eritrocito o en su proximidad, sin embargo, cuando el individuo es un animal portador no expresa un elevado nivel de parasitemia como para ser detectado por la tinción (Futse, Ueti, Knowles, & Palmer, 2003; OIE, 2015).

La sangre de la yugular u otro gran vaso es apropiada para la realización del frotis, ya que *A. marginale* no genera cambios en la membrana celular del eritrocito, que dan como resultado alteraciones en la forma del mismo y que favorecen su aglutinación en capilares como si lo hace *Babesia* (Schotthoefer et al., 2013; Zheng Li-Yan, 2006). Debido a la morfología poco diferencial de *Anaplasma*, es importante que los frotis sean preparados por personas con experiencia y que estén libres de sustancias extrañas, ya que puede confundir el diagnóstico con eventos de granulación tóxica, diversas inclusiones citoplasmáticas y manchas de artefactos en el portaobjetos (Salih et al., 2015).

1.5.2 Diagnóstico serológico

Las pruebas de tipo serológico son de gran utilidad en estudios epidemiológicos, ya que permiten caracterizar áreas de estabilidad e inestabilidad enzoótica. Varias pruebas serológicas se usan para detectar anticuerpos específicos que permiten la detección de animales portadores entre ellos las pruebas de fijación del complemento, de aglutinación en tarjeta, de inmunofluorescencia indirecta, y diferentes variantes del ELISA como el ELISA indirecto (iELISA), ELISA competitivo (cELISA), y Dot ELISA (Aubry & Geale, 2011; Salih et al., 2015).

El cELISA basado en anticuerpos monoclonales es específico para MSP5 y se ha documentado como una de las pruebas serológicas más sensibles para detectar *Anaplasma* en bovinos (de la Fuente et al., 2005), sin embargo, presenta un problema de reactividad cruzada con las todas especies de *Anaplasma spp*, por lo tanto, no puede usarse para identificar la especie involucrada (De Echaide et al., 2005; OIE, 2015)

1.5.3 Diagnóstico molecular

Las técnicas que usan ácidos nucleicos para la detección del agente son capaces de identificar el microorganismo en niveles de infección mínimos, comparados con las técnicas microscópicas comúnmente utilizadas. Los métodos moleculares incluyen diferentes variaciones de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa(PCR) como son las de tipo convencional, anidada y en tiempo real (qPCR), además se emplean ensayos de hibridación (OIE, 2015). Los genes *msp4* y *msp1a* se han utilizado como marcadores moleculares para la detección de aislamientos de *Anaplasma*, estos marcadores se han utilizado para distinguir específicamente a *A. marginale*, *A. phagocytophilum*, *A. centrale*, *A. platys*, *A. ovis* y *A. bovis* (de la Fuente et al., 2002; de la Fuente, Lew, et al., 2007).

Las principales proteínas de superficie (MSP) juegan un papel crucial en la interacción de *Anaplasma* con células hospedadoras y están sujetas a presiones selectivas ejercidas por el sistema inmune del hospedero (de la Fuente et al., 2003; Kocan et al., 2010). Entre ellas MSP4 es una proteína de membrana externa inmunodominante con ortólogos en todas las especies de *Anaplasma*, por ello el gen *msp4* es utilizado para estudios filogenéticos que proporcionan información sobre la biogeografía y la evolución de *Anaplasma* (de la Fuente, Atkinson, et al., 2007; de la Fuente et al., 2002)

1.6 Anaplasmosis en Pequeños Rumiantes

La anaplasmosis es una enfermedad de gran interés en pequeños rumiantes ya que es considerada un problema importante para la producción eficiente de ovejas y cabras en áreas tropicales y subtropicales. Los principales géneros de garrapatas que se encuentran en ovejas y cabras son *Hyalomma*, *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* y raramente *Dermacentor*. Los estudios indican que solo las garrapatas *Hyalomma* transmiten especies de *Theileria*, pero las otras transmiten *Babesia*, *Anaplasma* y *Eperythrozoon*, además que

los dos últimos pueden transmitirse a través de algunas moscas y medios mecánicos (Hashemi-Fesharki, 1997).

Las ovejas y cabras infectadas con *Anaplasma* generalmente desarrollan enfermedad leve; sin embargo, en presencia de coinfecciones o factores de estrés, estos animales pueden desarrollar una enfermedad clínica severa caracterizada por fiebre, anorexia, depresión, debilidad, membranas mucosas pálidas, menor producción de leche, tos, disnea, rumen atonía, aborto y muerte (Alessandra & Santo, 2012; Anyanwu, Iheanacho, & Adogo, 2016; Renneker et al., 2013), e diagnóstico de la enfermedad se realiza mediante pruebas microscópicas, serológicas y moleculares (Renneker et al., 2013)

En pequeños rumiantes se ha reportado la presencia de varias especies de *Anaplasma* incluidas: *Anaplasma ovis* (Bandehpour, M, 2009; Belkahia et al., 2017; Dahmani et al., 2017; de la Fuente et al., 2005; Han et al., 2017; Hornok et al., 2007; Lee et al., 2018; Liu et al., 2012; Salih Mustafa, 2011; Sitotaw et al., 2012, Regassa, Zeru, & Kahsay; Yang et al., 2018; Yasini et al., 2012; Yousefi et al., 2017; Zhang et al., 2016) *Anaplasma marginale* (Yousefi et al., 2017, Jalali et al., 2013, da Silva NB, 2018), *Anaplasma bovis* (Liu et al., 2012; Yang et al., 2018; Zhang et al., 2016) y *Anaplasma phagocytophilum* (Liu et al., 2012; Yang et al., 2018; Zhang et al., 2016).

La enfermedad en estas especies ha sido reportada principalmente en África, sin embargo, varios estudios evidencian su presencia en Iraq (Ameen, Abdullah, & Abdul-Razaq, 2012; Salih Mustafa, 2011), China (Ge, Yin, Rikihisa, Pan, & Yin, 2016; Han et al., 2017; Liu et al., 2012; Yang et al., 2018; Zhang et al., 2016), Irán (Bandehpour, M, 2009; Noaman, 2013; Yasini et al., 2012; Yousefi et al., 2017), Venezuela (Tavares-Marques, Núñez, Rey-Valeirón, & Reyna-Bello, 2010), Ghana (Bell-Sakyi, Koney, Dogbey, & Walker, 2004), Etiopía (Sitotaw et al., 2012), Hungría (Hornok et al., 2007), Portugal (Pereira et al., 2018), Sudán (Lee et al., 2018), Nigeria (Akinboade, Sadiq, Akinrinmade, Dipeolu, & Nwufor, 1986; Jatau, Abdulganiyu, Lawal, Okubanjo, & Yusuf, 2011), Túnez (Belkahia et al., 2017),

Turquía (Bilgic et al., 2017), Francia (Dahmani et al., 2017), Sicilia (José de la Fuente et al., 2005) e Italia (Alessandra & Santo, 2012).

La detección y caracterización molecular se ha realizado utilizando cebadores específicos que apuntan a fragmentos de marcadores genéticos incluyendo el 18S rRNA, 23S rRNA y 16S rRNA, así como los genes que codifican para las proteínas de superficie principal 1 (*mSP1*), proteína de superficie principal 2 (*mSP2*), proteína de superficie principal 4 (*mSP4*), proteína de superficie principal 5 (*mSP5*) (Adjou Moumouni et al., 2018; El-Ashker et al., 2015; Zhang et al., 2016).

1.7 Anaplasmosis en Ovinos de Colombia

En la actualidad, según cifras de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación la población mundial de ovinos abarca más de mil millones de cabezas y la producción de carne de oveja está ampliamente distribuida en todo el mundo, teniendo que China domina el mercado con una participación del 24% para el 2013, seguido por Australia y Nueva Zelanda con un 8% y 5% respectivamente, después se encuentran Sudán y Turquía, el sexto productor más grande es el Reino Unido, que representa el 3% de la producción mundial. El consumo global de carne de ovino también está muy extendido, para el 2013, el mercado ascendió a un estimado de 8,6 millones de toneladas, lo que sitúa per cápita a 1,2 kg, dado que la población mundial ascendió a casi 7,2 mil millones (Colby, 2015)

En Colombia tenemos que la Ovinocultura ha dejado de ser una actividad meramente artesanal y se ha convertido en una industria que promete y que ha presentado un amplio crecimiento pecuario en el país durante los últimos años. El ovino es una especie que ha estado con el campesino durante mucho tiempo y solo hasta ahora se está empezando a reconocer su valor comercial y su potencial de mercadeo (Garay & Assmus, 2013). Las ovejas y cabras tienen una importante función social para la población rural y comunidades

indígenas del país, ya que proporcionan alimento, ofrecen medios para el mantenimiento cultural y económico, debido a acciones público-privadas adelantadas en los últimos años, se ha convertido en un sector con grandes posibilidades para suplir mercados altamente rentables, sin embargo, la mayoría de los sistemas productivos en el país aún mantienen las tradiciones ancestrales en cuanto a crianza de ovinos, lo que genera un aumento en los factores de riesgo para la transmisión de enfermedades infecciosas dentro del rebaño, a futuro se esperaría la implementación de buenas prácticas de manejo que permitan tecnificar el sistema y mejorar el estatus sanitario de la población.

Actualmente se estima que la ovinocultura y la caprinocultura generan cerca de 160.000 empleos directos en Colombia, produciendo cerca de 20.000 toneladas en promedio al año de carne, de las cuales el 43% corresponde a ovinos y el 57% restante a caprinos, sin embargo, la Organización de Cadena Productiva Ovino-Caprino de Colombia espera que para el largo plazo, el sector sea un renglón líder en la economía del país, que permitirá el desarrollo sustentable de la población rural, ofreciendo productos de excelente calidad y consolidando el sector exportador como un eslabón importante dentro de la cadena, todo esto debido a la implementación de varios programas a nivel nacional que buscan incentivar ampliamente la producción ovi-caprina (Espinal & Covalada, 2006).

La incidencia de enfermedades transmitidas por artrópodos está aumentando en todo el mundo, desafiando el enfoque hacia el diagnóstico, el tratamiento y las opciones de control ya que son enfermedades que siguen siendo desconocidas para los veterinarios de campo, debido a su ubicación tropical, Colombia ofrece condiciones ambientales favorables para la multiplicación de artrópodos vectores importantes de hemoparásitos, causantes entre otras, de una gran variedad de enfermedades rickettsiales entre ellas la anaplasmosis, según el Censo Pecuario Nacional del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), la población ovina en Colombia para el 2017 abarca un total de 1'449.705 ejemplares ovinos, de los cuales el 72,61% se encuentran distribuidos en los departamentos de La Guajira (44,27%), Magdalena (7,41 %), Boyacá (7,30 %), Cesar (6,97 %) y Córdoba (6,66 %), la mayoría de ellos ubicados biogeográficamente en condiciones de trópico bajo (Instituto Colombiano Agropecuario, 2017).

La información epidemiológica sobre Anaplasmosis en el país se ha centrado en la población bovina principalmente, siendo el departamento de Córdoba uno de los epicentros de información sobre el tema en el país, reportándose por ejemplo que durante los años 2000 a 2005 la prevalencia *Anaplasma sp* fue de 64.6% en las regiones del Bajo Cauca Antioqueño y Córdoba además, varios estudios realizados señalan que *A. marginale* es el hemoparásito más frecuente en ésta zona, encontrándose prevalencias hasta del 80.5% en zonas ganaderas de Córdoba (Herrera et al., 2008).

En pequeños rumiantes, la información se limita a los boletines epidemiológicos emitidos por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), sin embargo, solo hasta el 2012 se incluyó la población ovi-caprina como un ítem en la discriminación de Condiciones patológicas diagnosticada por especie, lo que implica que, para los años anteriores no se cuenta con un registro de eventos de interés en el país. Entre los años 2012 y 2014, se reportó la presencia en el país de hemoparásitos en ovinos y caprinos, teniendo para el 2014 el reporte de 3 predios ovinos afectados por *Anaplasma* y 1 predio que reporta hemoparásitos sin determinar el agente específico (ICA, 2014), para el 2013 se presentaron 13 predios ovinos afectados por *Anaplasma* (ICA, 2013) y para el 2012 se reportan 7 predios para *Anaplasma* y 3 para hemoparásitos en pequeños rumiantes (ICA, 2012).

Adicional a lo anterior en pequeños rumiantes solo se reportan dos estudio sobre la prevalencia de *Anaplasma* en el país, el primero realizado en Antioquia en el 2011 que buscaba determinar la infección por hemoparásitos en pequeños rumiantes (Avila et al., 2013). Se evaluaron 95 animales de diferentes razas y edades y se emplearon dos métodos de diagnóstico directo parasitológico, encontrando una prevalencia del 73,7% para *Anaplasma spp.*, sin embargo, no se observaron animales sintomáticos y el nivel de parasitemia fue inferior al 1%. También se observó que los animales menores de 9 meses de edad presentaron 69,2% de infección y el 64,3% de la población positiva a este hemoparásito correspondió a hembras gestantes y lactantes por lo que se estableció una asociación entre la infección por *Anaplasma spp.* y estado fisiológico de los animales y el segundo realizado en Cabras de Santander, en donde se encontró mediante PCR de gen *mSP5* una prevalencia de 7,1% y 4% por observación directa para *Anaplasma spp* (Jimenez et al., 2013).

2. Materiales y Métodos

2.1. Área de estudio.

El estudio se realizó en el Municipio de Montelíbano, que se encuentra ubicado en el extremo suroriental del departamento de Córdoba, sobre la margen derecha del río San Jorge (Figura.1-4). La temperatura promedio es de 28 °C y el área urbana se encuentra en la zona de bosque húmedo tropical (bh-T), con una superficie de 1.897 km se ubica entre 7°58'16" latitud Norte y 75°25'05" latitud Oeste.

Figura1-4: Ubicación del municipio de Montelíbano, Córdoba¹



¹Localización de Montelíbano en Córdoba (Colombia) By Shadowxfox [CC BY-SA 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>)], from Wikimedia Commons

2.2. Población de estudio.

El tamaño de la muestra se calculó teniendo en cuenta que según el Censo Agropecuario Nacional emitido por el Instituto Colombiano Agropecuario la población de ovinos para el 2017 en el municipio de Montelíbano fue de 3.249 ejemplares, empleando la ecuación 1-1 se obtuvo como n muestral un total de 133 ovinos, sin embargo, el número de muestras se incrementó en un 25% considerando un margen de error asociado a pérdidas durante la recolección, transporte y/o procesamiento, para un total final de 167 muestras. En el muestreo se incluyeron de forma aleatoria animales machos y hembras entre los 3 meses y los 2 años de razas Africana (Sudán, Etíope y Abisinio), Katahdin, Dorper, Pelibuey, Cruces y otras.

$$n = \frac{N \cdot Z_{\alpha}^2 \cdot P \cdot (1-P)}{e^2 \cdot (N-1) + Z_{\alpha}^2 \cdot P \cdot (1-P)} \quad (1-1)$$

Donde:

N= 3.249 ovinos, población de ovinos del municipio.

Z α =1,96 a un nivel de confianza del 95%

e= 5%, margen de error admitido

P= 10%, prevalencia esperada.

El tamaño de la muestra obtenido fue de 133 ovinos

2.3. Muestreo

Se recolectaron muestras de sangre en tubos vacutainer con anticoagulante mediante venopunción de la vena yugular, de acuerdo con el protocolo de toma de muestra de sangre en la especie ovina del Centro de Investigación Desarrollo y Extensión Ovino (CIDTEO) y se mantuvieron a 4 °C hasta la llegada al laboratorio de Control Genético en Salud Animal del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia. La sangre fue utilizada en la preparación de frotis de sangre para el examen microscópico y en la extracción de ADN para el análisis molecular. Adicionalmente se tomaron datos de sexo, edad y raza de cada uno de los animales.

2.4. Examen Microscópico Directo.

Los frotis sanguíneos se realizaron mediante el extendido de una gota de sangre sobre una lámina portaobjetos, la cual fue secada al aire y posteriormente fijada con metanol durante 5 minutos, posteriormente los frotis fueron teñidos con Giemsa en una dilución de 10% durante 30 minutos. Las láminas fueron examinadas a 100X para determinar la presencia de estructuras compatibles con *Anaplasma* por microscopía. Los frotis de sangre se registraron como negativos después de analizar 100 campos.

2.5. Extracción de ADN

El ADN genómico fue extraído de muestras de sangre con EDTA utilizando el estuche comercial Wizard (R) para purificación de ADN genómico (Promega, Cat No. A1125) siguiendo las recomendaciones del fabricante como se explica a continuación. Inicialmente se tomaron 300 µl de volumen de muestra y se agregaron 900 µl de solución de lisis celular a un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 ml. Luego se mezcló por inversión 5-6 veces hasta que se homogenizó el contenido, después se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para lisar los glóbulos rojos. Posteriormente se centrifugó a 16,000 x g durante 20 segundos a temperatura ambiente. Una vez terminado se retiró y descartó la mayor cantidad posible de sobrenadante sin perturbar el sedimento blanco visible. A continuación, se dio Vortex al tubo vigorosamente hasta que los glóbulos blancos se resuspendieron (10-15 segundos) y se agregaron 300µ de solución de lisis. Luego de pipeteo la solución 5-6 veces para lisar los glóbulos blancos y se agregaron 1.5µl de solución de RNasa. Se mezcló por inversión 5 veces y se incubó a 37°C durante 60 minutos. Después se agregaron 100µl de solución de precipitación de proteínas y se dio Vortex vigorosamente durante 10-20 segundos, se centrifugó a 16,000 x g durante 3 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml que contenía 300µl de isopropanol, se mezcló suavemente la solución por inversión hasta que las hebras blancas de ADN formaron una masa visible y se centrifugó a 16,000 x g durante 1 minuto, en este punto el ADN fue visible

como un pequeño punto blanco en el fondo del tubo. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 300µl de etanol al 70% a temperatura ambiente y se centrifugo nuevamente a 16,000 × g durante 1 minuto. Se descartó el sobrenadante obtenido y se invirtió el tubo sobre papel absorbente dejando secar el pellet durante toda la noche. EL ADN de cada muestra se eluyó en 50 µl de agua ultrapura y se incubaron a 65 °C durante 1 hora. Las muestras se cuantificaron en un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington, EE. UU.) y luego se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

2.6. Amplificación del ADN

Para los estudios moleculares se utilizó una análisis inicial mediante PCR convencional para la detección el gen *msp4* de *Anaplasma spp*, aquellas muestras que resultaron positivas se tipificaron por especie también mediante la detección de gen *msp4* de *Anaplasma marginale* y *Anaplasma ovis*, los primers empleados en cada ensayo se detallan en la tabla 1-1. Para la detección inicial se emplearon como volumen final de reacción 15 µL que contenían 30-60 ng de ADN genómico, 10X PCR Buffer (Invitrogen™, Carlsbad, CA), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs y 0.5 µM de cada primer y 0.25 U de Taq Polimerasa (Invitrogen™, Carlsbad, CA). Las condiciones de la PCR fueron: una denaturación inicial de 95°C por 5 minutos y 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, alineamiento a 55°C por 30 segundos, extensión a 72°C durante 45 segundos y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Las muestras que resultaron positivas fueron empleadas para la posterior detección de *A marginale* y *A ovis*, empleando para cada reacción 15 µL como volumen final que contenían 30-60 ng de ADN genómico, 10X PCR Buffer (Invitrogen™, Carlsbad, CA), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0.4 µM de cada primer y 0.25 U de Taq Polimerasa (Invitrogen™, Carlsbad, CA). Los perfiles térmicos empleados fueron: una denaturación inicial de 95°C por 5 minutos y 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, alineamiento a 60°C para *A marginale* y a 62°C para *A ovis* por 30 segundos, extensión a 72°C durante 30 segundos y una extensión final a 72°C por 5 minutos. Para cada corrida se empleó como control negativo

agua ultrapura libre de RNasas, DNasas y pirógenos y como control positivo se empleó DNA de *Anaplasma marginale* y *Anaplasma ovis* suministrado por la Universidad de Washington. Los productos amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 1,5% para *Anaplasma spp* y 2% para *A. marginale* y *A. ovis* en TBE 0,5X (100 mM Tris, 90 mM Borato, 2,5mM EDTA; pH 8,0) teñidos con SYBR Safe (ThermoFisher, Cat. S33102). Los geles se corrieron durante 60 min a 80 V y los productos fueron visualizados en un transiluminador (Safe Imager™ 2.0 Blue Light Transiluminador). Los tamaños de banda fueron establecidos mediante comparación con un patrón de peso molecular de 1000 pb. (Thermo Scientific, Cat. 15628019).

Blanco	Gen	Secuencia Nucleótidos	Tamaño Amplicon	Referencia.
<i>Anaplasma sp</i>		AnaspFw: TTGTTTACAGGGGGCCTGTC	831 bp	(Bandehpour, M, 2009)
		AnaspRv: GAACAGGAATCTTGCTCCAAG		
<i>Anaplasma marginale</i>	<i>msp4</i>	AmargFw: CTGAAGGGGGAGTAATGGG	344 bp	(Torina et al., 2012)
		AmargRv: GGTAATAGCTGCCAGAGATTCC		
<i>Anaplasma ovis</i>		AovisFw: TGAAGGGAGCGGGGTCATGGG	347 bp	
		AovisRv: GAGTAATTGCAGCCAGGGACTCT		

Tabla 1-1: Primers empleados en la amplificación de *Anaplasma spp*.

2.7. Secuenciación

Los productos positivos en la amplificación fueron purificados a partir de gel de agarosa al 1,5% empleando el kit de Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research, Cat D4008) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se seleccionaron aleatoriamente los fragmentos purificados de 10 muestras y fueron secuenciados unidireccionalmente empleando BigDye Terminator de ABI, los resultados se analizaron con un analizador genético Applied Biosystems 3500 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) según las recomendaciones del fabricante. Las secuencias obtenidas fueron editadas y se compararon con las secuencias depositadas en GenBank usando BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),

posteriormente fueron alineadas usando MUSCLE en MEGA7.0 (Kumar, Stecher, and Tamura 2015).

2.8. Análisis filogenético

El árbol filogenético se construyó a partir de la longitud parcial de la secuencia de los nucleótidos del gen *msp4* de *Anaplasma marginale*, usando MEGA7.0 basados en el método de Neighbor Joining y bootstrap de 1000 réplicas (Saitou N and Nei M, 1987). En la construcción de los árboles se incluyeron secuencias de *Anaplasma marginale* provenientes de ovinos, bovinos y animales silvestres reportadas en el GenBank, así mismo se incluyeron cepas de *Anaplasma ovis*, *Anaplasma centrale* y *Anaplasma phagocytophilum*.

2.9. Análisis Estadístico

Se elaboró una base de datos en Excel 2016, donde se consignó información de las variables de los ovinos evaluados y los resultados obtenidos. Se utilizó estadística descriptiva para observar la distribución de la población y de los resultados obtenidos en cada prueba.

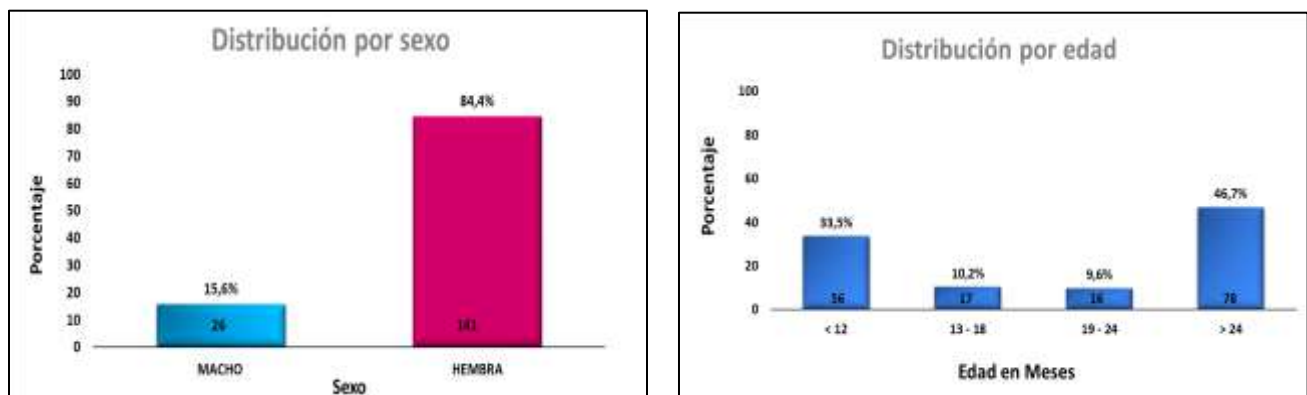
Así mismo se utilizó estadística no paramétrica (prueba de Chi-cuadrado) usando el software estadístico SPSS V21.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) para determinar la relación entre la positividad a la PCR para *Anaplasma spp* y variables como sexo (Machos y hembras), edad (menores a 18 meses y mayores a 18 meses) y raza (criollos e introducidos) de los animales. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron usando el valor $p < 0.05$.

3. Resultados

3.1 Muestreo.

Durante mes de Septiembre del año 2017 se muestrearon 167 ovinos del Municipio de Montelíbano, Córdoba a los cuales se les realizo examen clínico básico encontrando que todos eran animales clínicamente sanos. Del total de ovinos, el 15,6% (26/167) fueron machos y el 84,4% (141/167) hembras. La edad de los animales fue clasificada en cuatro grupos etarios: grupo I, animales entre 0 y 12 meses, grupo II, animales entre 13 y 18 meses, grupo III, animales entre 19 y 24 meses y grupo IV animales mayores de 36 meses de edad. De acuerdo con esto, el 33,5% (56/167) de ovinos pertenecen al grupo I, el 10,2% (17/167) al grupo II, el 9,6% (16/167) al grupo III y 46,7% (78/167) al grupo IV (Figura 1-5)

Figura 1-5: Distribución por edad y sexo de los ovinos muestreados



Los ovinos muestreados pertenecían a 6 razas distribuidas de la siguiente manera, Africana (56%), Katahdin (7%), Dorper (5%), Pelibuey (6%), Cruces (25%) y otras (1%). (Figura 1-6).

Figura 1-6: Distribución por raza de los ovinos muestreados.



Para determinar la presencia de *Anaplasma spp.*, en muestras sanguíneas de 167 ovinos muestreados se utilizaron dos técnicas de diagnóstico: Microscopía de frotis sanguíneo y PCR. En la tabla 1-2 se exponen los resultados obtenidos con las dos técnicas, donde el 9,58% (16/167) de animales fueron positivas por Microscopía de frotis sanguíneo y el 35,33 (59/167) fueron positivas por PCR.

Prueba	Resultado	No. Animales	%
Frotis	Negativo	151	90,42
	Positivo	16	9,58
PCR	Negativo	108	64,67
	Positivo	59	35,33

Tabla 1-2: Resultados obtenidos con Microscopía de frotis sanguíneo y PCR

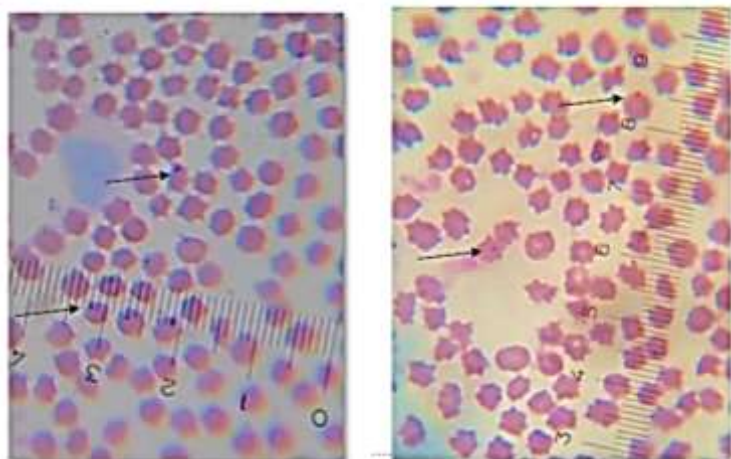
Nuestros resultados mostraron que las estructuras similares a *Anaplasma* solo pudieron ser detectados en el 27.1% (16/59) del total de muestras de sangre positivas mediante la técnica de PCR, esto debido probablemente a la baja cantidad de eritrocitos infectados con *Anaplasma* y/o a la dificultad para diferenciar entre el microorganismo y estructuras como cuerpos de Heinz, cuerpos de Howell-Jolly o artefactos de tinción, a menudo observados

en frotis de sangre teñidos con Giemsa (Schotthoefer et al., 2013). Es importante mencionar que todas las muestras positivas mediante frotis de sangre también se determinaron como positivas por PCR. Falta mencionar si algunas muestras por PCR fueron negativas por el frotis, que creo que así fue.

3.2 Examen Microscópico Directo

Mediante la tinción Giemsa realizadas en frotis sanguíneo se consideró como positivas a *Anaplasma* aquellas muestras que presentaban corpúsculos puntiformes dentro de los glóbulos rojos, como se observa en la Figura 1-7. El análisis por microscopía de frotis sanguíneo mostró que el 9,58% (16/167) de las muestras fueron positivas para cuerpos de inclusión compatibles con *Anaplasma spp*, sin lograr identificar la especie involucrada.

Figura 1-7: Microscopía de frotis sanguíneo con tinción Giemsa 100X.²

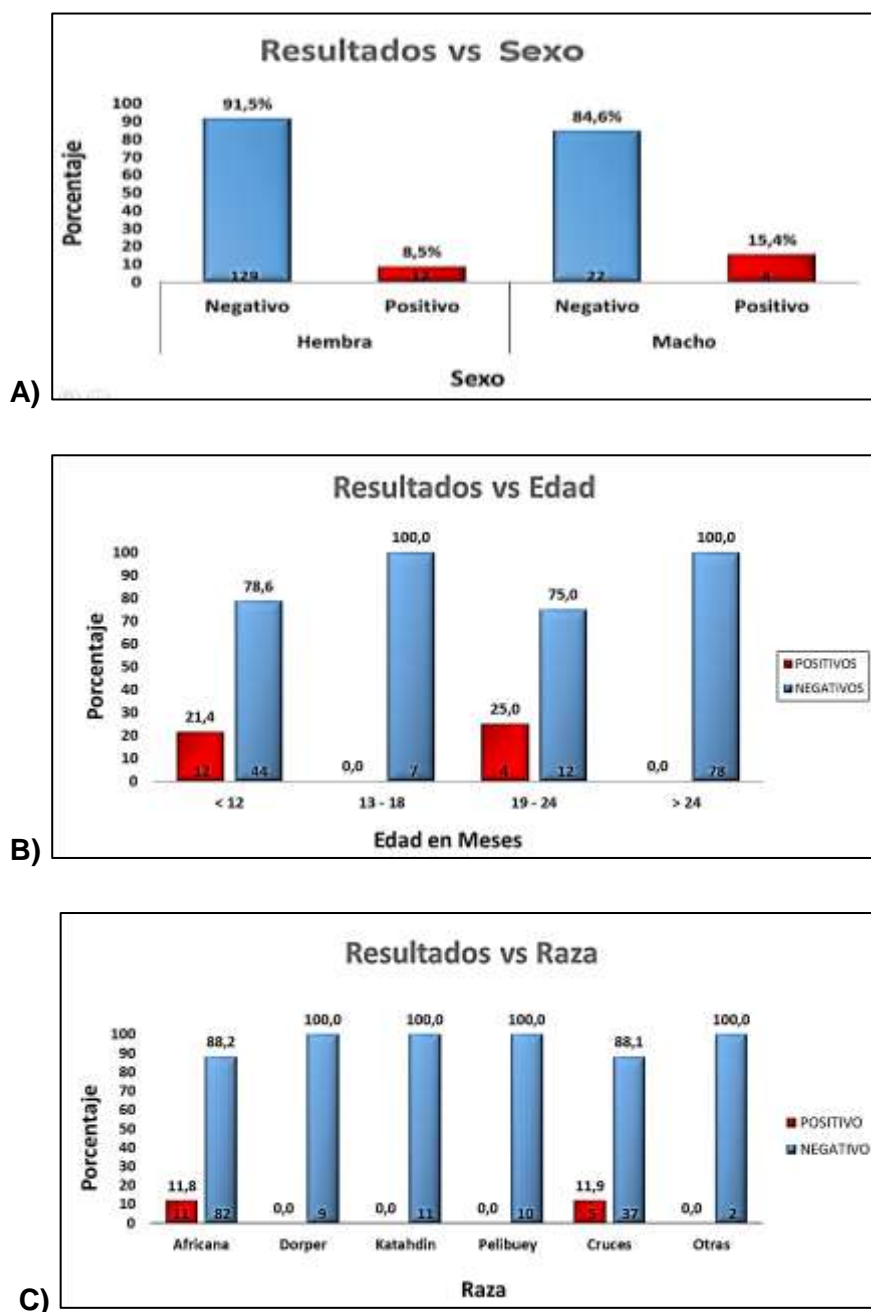


La distribución de *Anaplasma* en los ovinos positivos a través de la microscopía de frotis sanguíneo, según sexo, edad y raza se exponen en la Figura 1-8. Encontrando con respecto al sexo que el 8,5% (12/141) de las hembras y el 15,4% (4/26) de machos fueron positivos. De acuerdo con la edad encontramos que el 21,4% (12/56) y 25% (4/16) de los

² Microscopía de frotis sanguíneo con tinción Giemsa 100X, donde se evidencia la presencia de corpúsculos puntiformes dentro de los glóbulos rojos(Flechas)

animales del grupo etario I y III respectivamente fueron positivos, mientras que el gripo II y IV no presentaron animales con cuerpos de inclusión compatibles con *Anaplasma*. En cuanto a la raza de los ovinos podemos observar que el 11,8% (11/93) de los animales de raza Africana fueron positivos, así como el 11,9% (5/42) de los Cruces también lo fueron, sin embargo, el resto de las razas estudiadas resultaron negativas a la técnica.

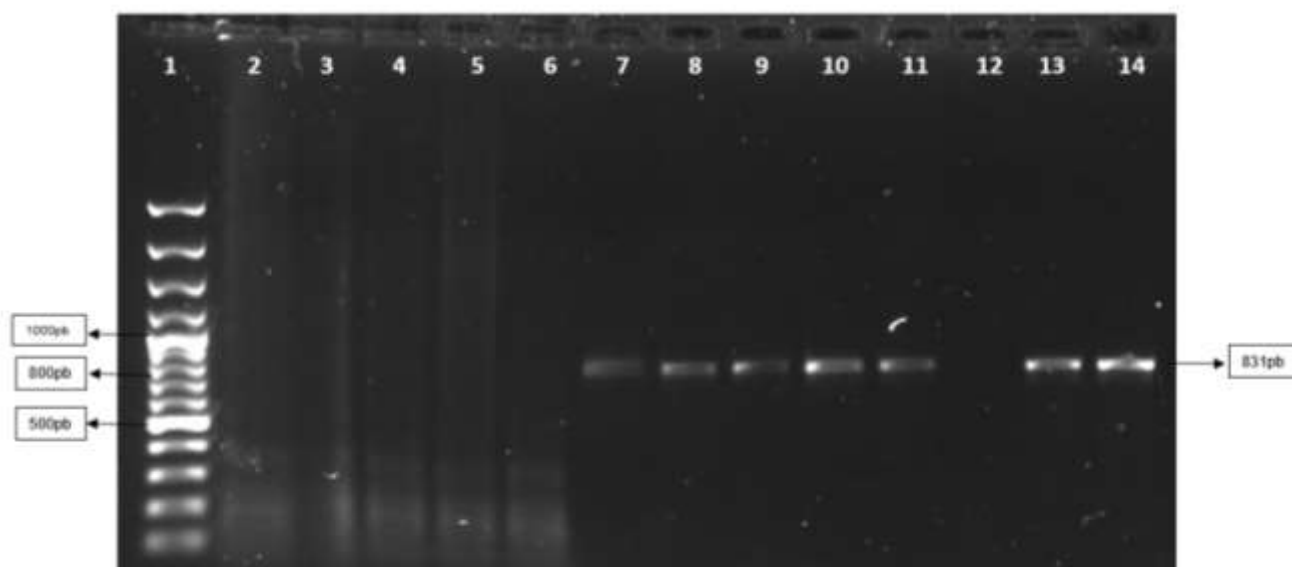
Figura 1-8: Distribución de resultados obtenidos mediante Microscopia Directa (A: Sexo; B: Edad; C: Raza).



3.3 Análisis Molecular

Los análisis de tipo molecular evidenciaron que un total de 59 muestras analizadas para el gen *msp4* resultaron positivas para *Anaplasma spp*, (Figura 1-9), obteniendo amplificados de 831 pb, este resultado corresponde al 35,33% de la población estudiada. De las 59 muestras positivas para *Anaplasma spp*, se encontró que el 100%(59/59) correspondieron a *Anaplasma marginale* (Figura 1-10), con amplificados de 344 pb para el gen *msp4*. Por otro lado, no se pudo demostrar la presencia de *Anaplasma ovis* en las muestras analizadas (Figura1-11).

Figura 1-9: Amplificación del gen *msp4* de *Anaplasma spp*³



³ Productos de PCR del gen *msp4* de *Anaplasma spp*, producto de amplificación de 831 pb.
Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb. Carriles 2-6: muestras negativas, Carriles 7-11: Muestras positivas. Carril: 11: Control negativo, Carril 12-13: Control Positivo *A. marginale* y *A. ovis* respectivamente

Figura 1-10: Amplificación del gen *msp4* de *Anaplasma marginale*.⁴

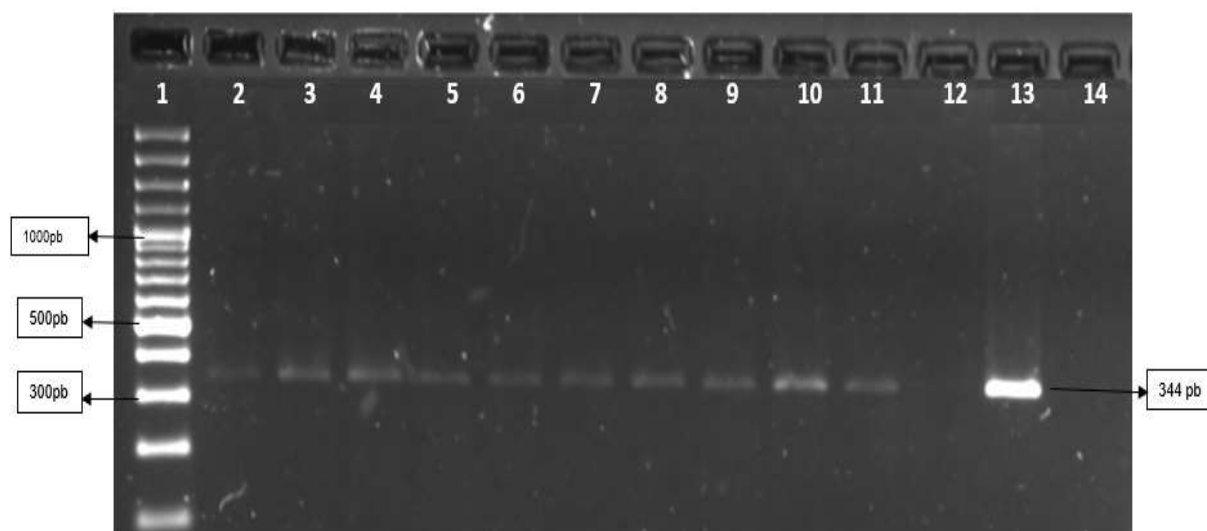
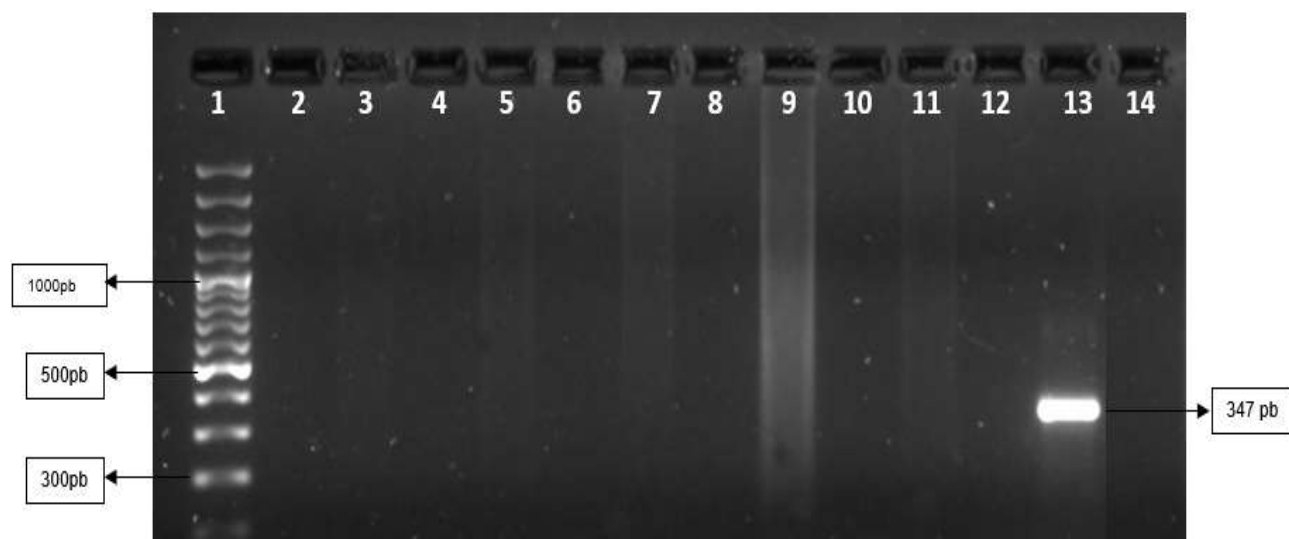


Figura 1-11: Amplificación del gen *msp4* de *Anaplasma ovis*.⁵



⁴ Productos de PCR del gen *msp4* de *Anaplasma marginale*, producto de amplificación de 344 pb.

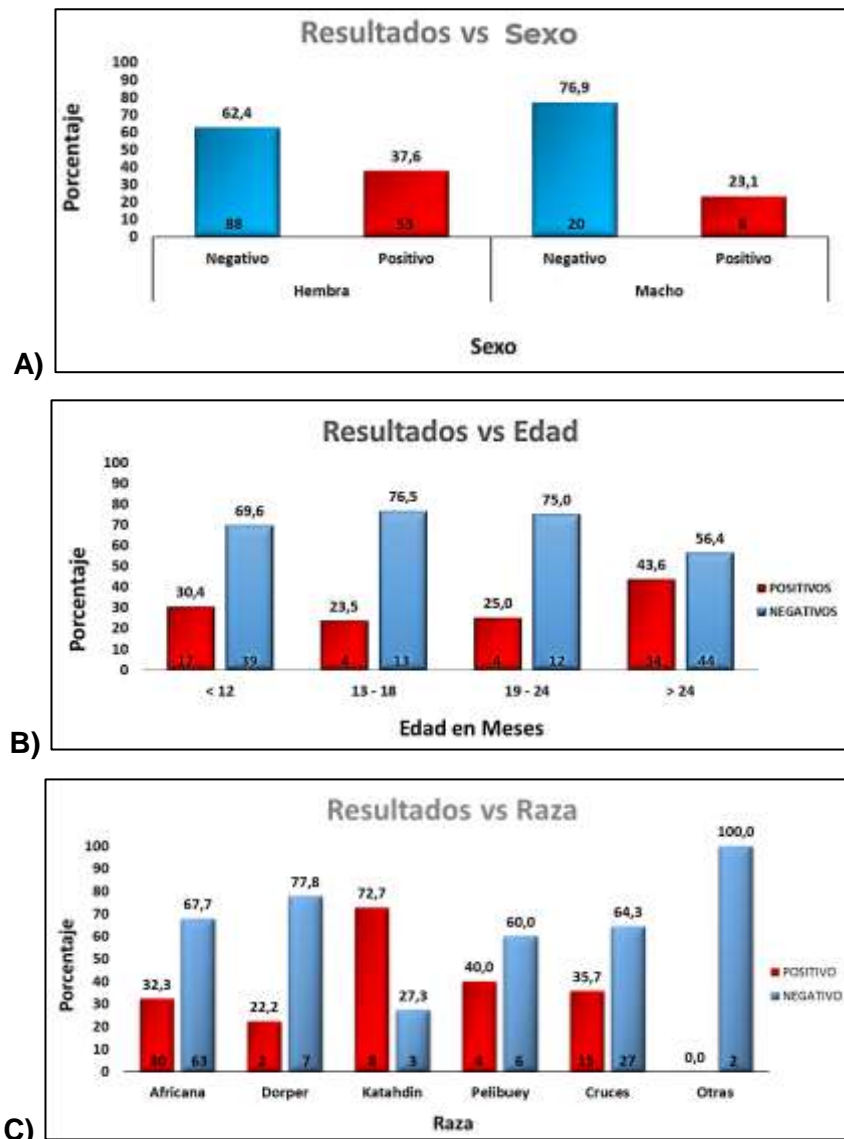
Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb. Carriles 2-11: muestras positivas, Carril 12: Control negativo Agua Ultrapura, Carril 13: Control Positivo *A. marginale*, Carril 14: Control Negativo *A. ovis*.

⁵ Productos de PCR del gen *msp4* de *Anaplasma ovis*, producto de amplificación de 347 pb.

Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb. Carriles 2-11: muestras negativas, Carril 12: Control negativo Agua Ultrapura, Carril 13: Control Positivo *A. ovis*, Carril 14: Control Negativo *A. marginale*

Con respecto al sexo se observa que el 37,6% (53/141) de ovinos hembras y el 23,1% (6/26) machos resultaron positivos, según la edad tenemos que el 30,4% (17/56) de ovinos del Grupo I fueron positivos, el 43,6% (34/78) del Grupo IV, el 23,5% (4/17) del Grupo II y el 25% (4/16) en el grupo III, según. De acuerdo a la raza tenemos que de los animales de raza Africana el 32,3% (30/93) fueron positivos, el 22,2% (2/9) de Dorper, el 72,7% (8/11) de Katahdin, el 40% (4/10) de Pelibuey y el 35,7% (15/42) de los cruces, mientras que las otras razas no presentaron animales positivos (Figura 1-12).

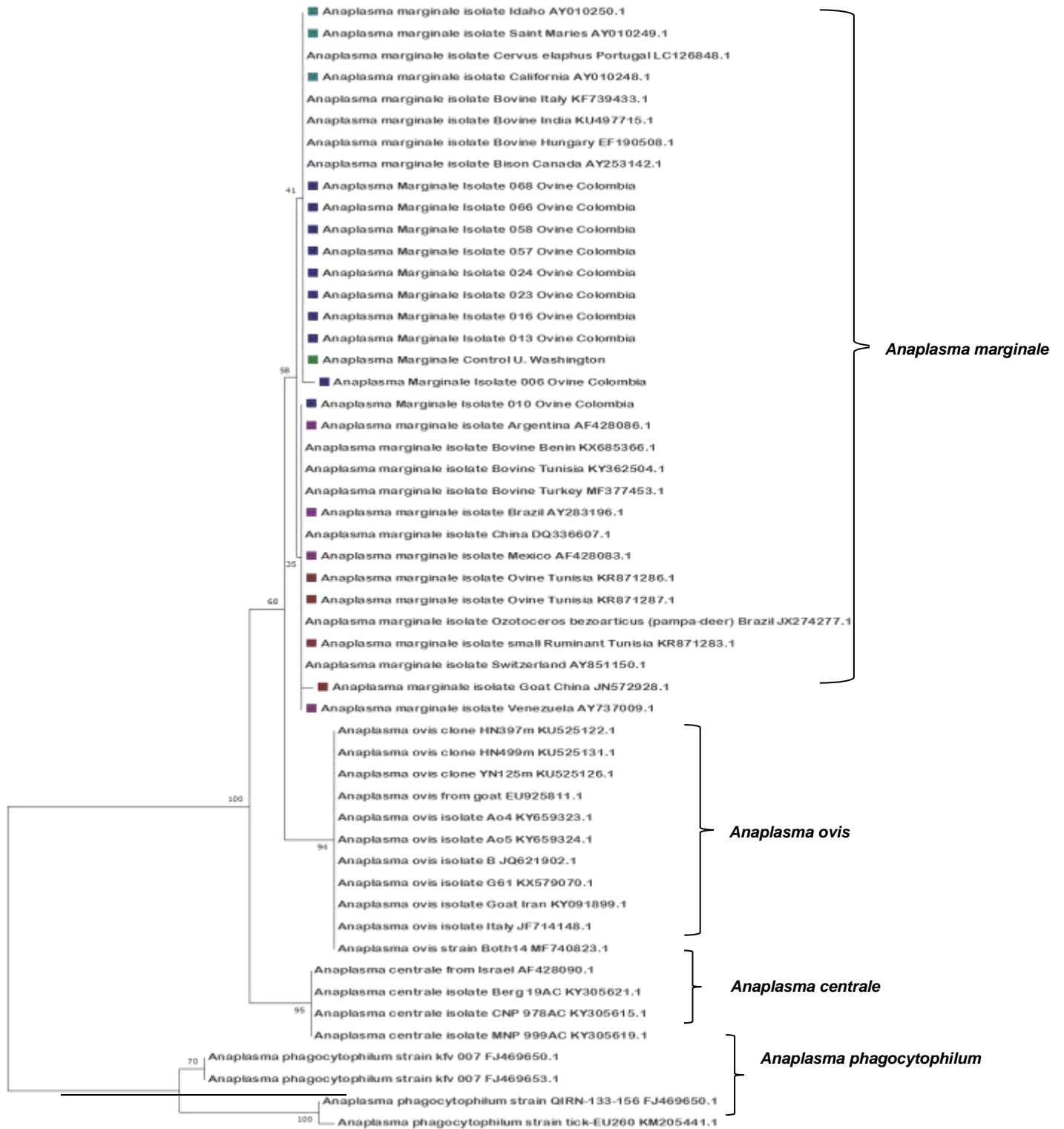
Figura 1-12: Distribución de resultados obtenidos mediante PCR (A: Sexo; B: Edad; C: Raza).



3.4 Análisis Filogenético

Los productos de PCR de 10 muestras positivas se purificaron y se sometieron a análisis de secuencia y BLASTn para la identificación del ADN genómico de los microorganismos, encontrando que los 10 aislamientos fueron muy similares entre sí. El análisis filogenético de las secuencias del gen *msp4* (Figura 3-7), encontró que todas los aislamientos del presente estudio se ubicaron en el clúster correspondiente a cepas de *Anaplasma marginale*, aisladas tanto en bovinos y ovinos como en rumiantes silvestres de diferentes lugares del mundo, encontrándose claramente separadas de los clúster que recogen cepas de *Anaplasma ovis* (KU525122.1, KU525131.1, KU525126.1, EU925811.1, KY659323.1, KY659324.1, JQ621902.1, KX579070.1, KY091899.1, JF714148.1 y MF740823.1), *Anaplasma centrale* (AF428090.1, KY305621.1, KY305615.1, KY305619.1) y *Anaplasma phagocytophilum* (FJ469650.1, FJ469653.1, FJ469650.1 y KM205441.1) específicamente. Además, se observó que las cepas aisladas en Colombia se situaron a su vez en dos clúster diferentes dentro de las correspondientes a *Anaplasma marginale*.

Anaplasma marginale Isolate 010 se encontraba en el mismo clado con varias cepas de América Latina como *Anaplasma marginale* Isolate Argentina (AF428086.1), *Anaplasma marginale* Isolate Venezuela (AY737009.1), *Anaplasma marginale* Isolate Brazil (AY283196.1), *Anaplasma marginale* Isolate México (AF428083.1) provenientes de Bovinos (etiquetadas con un cuadro morado). En el mismo clúster se encontraron también cepas aisladas en Asia y Europa principalmente, dentro de ellos se encuentran *Anaplasma marginale* Isolate Bovine Turkey (MF377453.1), *Anaplasma marginale* Isolate China (DQ336607.1), *Anaplasma marginale* Isolate Switzerland (AY851150.1), *Anaplasma marginale* Isolate Bovine Benin (KX685366.1) y *Anaplasma marginale* Isolate Goat China (JN572928.1), este último aislado en cabras. Es importante destacar que en este clado también se agruparon aislamientos provenientes de bovinos (KY362504.1), pequeños rumiantes (KR871283.1) y ovinos (KR871286.1, KR871287.1) (etiquetadas con un cuadro rojo).

Figura1-13: Análisis filogenético del gen *msp4* de *Anaplasma marginale*.⁶

⁶ Árbol filogenético del gen *msp4* generado por el método de usando el software MEGA7. El árbol se construyó con secuencias representativas de *Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis*, *Anaplasma centrale* y *Anaplasma phagocytophilum*. Los aislamientos del presente estudio están etiquetadas con cuadrados azul

Mientras que los 8 aislamientos restantes y el control positivo empleado (*Anaplasma marginale* Isolate 068, *Anaplasma marginale* Isolate 066, *Anaplasma marginale* Isolate 058, *Anaplasma marginale* Isolate 057, *Anaplasma marginale* Isolate 024, *Anaplasma marginale* Isolate 023, *Anaplasma marginale* Isolate 016, *Anaplasma marginale* Isolate 013, *Anaplasma marginale* Isolate 006: etiquetadas con un cuadro azul) y *Anaplasma marginale* Control (etiquetada con un cuadro verde) se ubicaron junto a cepas de *Anaplasma marginale* reportadas en bovinos principalmente, es importante mencionar que la mayoría de ellas provienen de Norte América como *Anaplasma marginale* Isolate Idaho (AY010250.), *Anaplasma marginale* Isolate Saint Maries (AY010249.1), *Anaplasma marginale* Isolate California (AY010248.1) (etiquetadas con un cuadro azul marino). En este clúster también parecen aislamientos de Bovinos de Europa y Asia, como *Anaplasma marginale* Isolate Bovine Italy (KF739433.1), *Anaplasma marginale* Isolate Bovine India (KU497715.1), *Anaplasma marginale* Isolate Bovine Hungary (EF190508.1) y *Anaplasma marginale* *Anaplasma marginale* Isolate Cervus elaphus Portugal (LC126848.1), destacando que este último pertenece a un aislamiento en una especie silvestre.

3.5 Análisis Estadístico.

Mediante el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre las variables evaluadas (sexo, edad, raza) y el resultado a la PCR para *Anaplasma spp*, los datos obtenidos se muestran en la tabla 1-3.

	Variable	Positivos	Negativos	p-value
Sexo	Hembra	53	88	0.1549
	Macho	6	20	
Edad	<18 meses	21	51	0.1469
	>18 meses	38	57	
Raza	Criollos	45	90	0.2676
	Introducidos	14	18	

Tabla1-3: Resultados obtenidos en el análisis estadístico.

4. Discusión

Para determinar la presencia de *Anaplasma* se muestrearon 167 ovinos, de los cuales se recopiló información de edad, sexo y raza. Para realizar el diagnóstico se utilizaron dos técnicas: microscopía de frotis sanguíneo y PCR, determinando la prevalencia con cada técnica y obteniendo a su vez datos según la edad, sexo y raza de los ovinos.

La microscopía de frotis sanguíneo con tinción de Giemsa es el método más común para identificar *Anaplasma* en animales con infección clínica, esta técnica permite diagnosticar principalmente a los animales en fase aguda (OIE, 2015), sin embargo, cuando el animal está en la fase crónica no expresa un elevado nivel de bacteriemia como para ser detectado por la tinción. En el estado de portador es difícil la observación de los organismos en un frotis sanguíneo, por lo que se hace necesario el empleo de técnicas más precisas y sensibles, tales como PCR (Aubry & Geale, 2011). En los frotis, *Anaplasma marginale* aparece dentro de los glóbulos rojos como cuerpos densos y redondeados de 0.3-1.0 μm de diámetro, la mayor parte de ellos situados en la zona marginal del glóbulo rojo o en su proximidad (OIE, 2015).

Mediante la tinción de Giemsa realizada en frotis sanguíneo se consideró como positivas aquellas muestras que presentaban corpúsculos puntiformes en la periferia de los glóbulos rojos, determinando que de 167 animales el 9,58% (16/167) fueron positivos, en Colombia, son limitados los datos sobre prevalencia de *Anaplasma* en ovinos, sin embargo, un

estudio realizado en el 2013 en el departamento de Antioquia se encontró un 73,7% de prevalencia para *Anaplasma spp.*, en ovinos y caprinos (Avila et al., 2013), para el mismo año se reporta una prevalencia del 4% en caprinos de Santander (Jiménez et al., 2013), ambos datos obtenidos mediante microcopia directa. La variación en los datos obtenidos en los trabajos realizados en el país están en concordancia con lo encontrado en estudios realizados en diferentes partes del mundo, encontrando por ejemplo que en Iraq la prevalencia fue de 4,8% (Salih Mustafa, 2011), en Irán del 22,3% (Bandehpour, M, 2009) y en Nigeria donde se reportó el 27% de prevalencia en ovinos (Akinboade et al., 1986).

La PCR es una técnica molecular de alta sensibilidad y especificidad. La amplificación del ADN de la bacteria tiene ventajas sobre otros métodos para la detección en animales persistentemente infectados con *A. marginale* porque es difícil de detectar por los métodos de diagnóstico convencionales cuando el animal tiene bajos niveles de parasitemia (Salih et al., 2015). La utilización del PCR en el diagnóstico de *Anaplasma* permite avances significativos no solo en el diagnóstico de la enfermedad sino también abre la puerta al desarrollo de estudios eco-epidemiológicos que permitan entender mejor la dinámica de la enfermedad (Schotthoefer et al., 2013).

El análisis molecular mediante PCR realizado en el presente estudio mostro que la prevalencia de anaplasmosis en los ovinos muestreados fue del 35,33% (59/167), que correspondió en su totalidad a la especie *Anaplasma marginale*. Esta especie es frecuente en los bovinos y los datos sobre su identificación en pequeños rumiantes es escasa, en Colombia se reporta solo un estudio de tipo molecular para la evaluación de *Anaplasma* en caprinos, realizado en el departamento de Santander en el que se reportó que el 7,1% de la población evaluada fue positiva a *Anaplasma*, mediante diagnostico por PCR para el gen *msp5*, sin embargo no se determinó la especie involucrada (Jimenez et al., 2013). En Brasil recientemente se llevó a cabo la identificación de *Anaplasma marginale* en cabras, encontrando una prevalencia del 2,73% mediante PCR para el gen *msp4* (da Silva NB, 2018). En poblaciones ovinas específicamente solo se reportan a dos estudios realizados en Irán, en donde se encontraron prevalencias del 0.54% (Yousefi et al., 2017) y 43,7% (Jalali, et al., 2013) de positividad para *Anaplasma marginale*, la variación en los resultados

obtenidos podría deberse a diferencias geográficas y climáticas, el papel de diferentes vectores y la metodología empleada en las investigaciones (Herrera et al., 2008). En el presente estudio, ninguna de las muestras fue positiva para *A. ovis* basado en la amplificación del gen *msp4*, sin embargo, es posible que se necesiten más estudios para definir la prevalencia de la infección por esta especie en la población ovina de Colombia.

El análisis de secuencia basado en el gen *msp4* de *Anaplasma marginale*, se usó para inferir las relaciones filogenéticas entre aislamientos obtenidos y los reportados tanto en ovinos, bovinos y rumiantes silvestres alrededor del mundo, entre ellas cepas aisladas Argentina, Brasil, México, Venezuela y Estados Unidos, además se incluyeron tres taxones externos (*A. centrale*, *A. ovis* y *A. phagocytophilum*). Los resultados indicaron la presencia de dos genotipos de *Anaplasma marginale* en la población evaluada, uno que se encuentra en el mismo clado con varias cepas de América Latina (AF428086.1, AY737009.1, AY283196.1, AF428083.1) provenientes de Bovinos, mientras que el segundo se ubicaron junto a cepas de *Anaplasma marginale* provenientes de Norte América (AY010250, AY010249.1, AY010248.1). Estos datos son consistentes con lo encontrado por de la Fuente et al., 2002, ya que mediante el análisis del gen *msp4* en aislamientos bovinos de *Anaplasma marginale* encontró una distribución similar a la observada en nuestro estudio, en donde se evidenciaba la presencia de un clado latinoamericano que incluía cepas de México y América del Sur, mientras que los aislamientos provenientes de Estados Unidos se agruparon en dos clados uno denominado del sur en donde se encuentran aislados de Florida, Mississippi y Virginia y otro denominado del oeste central con aislados de California, Idaho, Illinois, Oklahoma y Texas, entre ellos la cepa St. Maries todas ellas aisladas de bovinos (José de la Fuente et al., 2002).

En cuanto a la presencia de los dos genotipos de *Anaplasma marginale* en la población estudiada, se tienen que un estudio realizado por Palmer et al. (2004), encontró 11 cepas únicas presentes en un mismo rebaño y cinco animales con dos cepas de *A. marginale* con genotipos marcadamente distintos, indicando que la sobreinfección puede ocurrir con

distintos genotipos *A. marginale* bovinos (Palmer et al., 2004), estos hallazgos sugieren que eventos de transmisión independientes por movimientos de ganado infectado en lugar de movimiento del vector podrían explicar la presencia de diferentes genotipos de *A. marginale* en un mismo rebaño de un área endémica (José de la Fuente et al., 2003).

Se obtuvieron 16 ovinos diagnosticados como positivos para *A. marginale* por microscopía directa como por PCR (27.1%), estos animales probablemente presentaban altos niveles de la bacteria en sangre, de tal forma que pudieron ser visualizados al microscopio, mientras que 43 de las muestras resultaron positivas por PCR y negativas a la microscopía, esto podría deberse a que estos ovinos presentaron porcentajes muy bajos de glóbulos rojos infectados para poder ser detectados, es importante mencionar que mediante el análisis de los frotis sanguíneos no fue posible determinar la especie involucrada, situaciones similares se reportan en la literatura, por ejemplo el estudio realizado por Jalali et al, 2013, en ovinos de Irán determino que el análisis de frotis sanguíneo solo detecto el 38.4% de los individuos que detecto la técnica de PCR (Jalali, et al., 2013), mientras que Schotthoefer et al., 2013, encontró una detección del 56% de los individuos positivos en un estudio realizado en Estados Unidos (Schotthoefer et al., 2013), en ambos casos sin la posibilidad de identificar la especie encontrada, por ello el uso de pruebas de diagnóstico basadas en técnicas de tipo molecular representan una alternativa atractiva frente a la serología y el examen microscópico directo, debido a su capacidad para detectar y diferenciar entre especies, por lo tanto, en áreas donde las distribuciones de estos organismos pueden superponerse, el uso de esta prueba puede mejorar el tiempo y precisión al diagnóstico (Schotthoefer et al., 2013).

En cuanto al análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre resultado a la PCR para *Anaplasma spp* y variables como raza, edad y sexo de los ovinos evaluados, esta situación coincide por lo encontrado por Yousefi et al., 2017 y Jalali, et al., 2013 en estudios realizados también en ovejas de Irán, lo que sugiere que estos factores no predisponen o determinan la presencia o ausencia de la enfermedad en los ovinos.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

La prevalencia de anaplasmosis en los ovinos muestreados en el municipio de Montelíbano, Córdoba por microscopía y PCR fue de 9,6% y 35,3 % respectivamente.

El presente estudio es el primer informe de base molecular de la presencia de *Anaplasma marginale* en ovinos en Colombia; sin embargo, no fue posible determinar la presencia de *Anaplasma ovis* en la población de estudio.

No se detectaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos en la PCR para *Anaplasma spp* y las variables evaluadas (edad, sexo, raza), por lo cual se podría sugerir que estos factores no predisponen o determinan la presencia o ausencia de la enfermedad en los ovinos.

Se confirmó por medio del análisis filogenético que los aislamientos evaluados pertenecen a la especie *Anaplasma marginale*, encontrando dos genotipos relacionados biogeográficamente con aislamientos provenientes de América Latina y Estados Unidos respectivamente.

Nuestros resultados sugieren que la PCR usando como blanco el gen *mSP4* podría ser un método útil para la detección de *A. marginale* en ovejas, ya que detectó mayor positividad en los animales analizados con respecto a la prueba de microscopía.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda el desarrollo de estudios sobre epidemiología molecular de la enfermedad en importantes áreas de producción ovina en Colombia, como son los departamentos de La Guajira, Magdalena, Boyacá y Cesar, además de ampliar el alcance a los demás municipios de Córdoba.

Se requieren estudios adicionales que determinen la presencia de otras especies de *Anaplasma* en la población ovina del país y que permitan dilucidar la ecoepidemiología y capacidad de los agentes aislados de causar enfermedades en los ovinos.

Adicionalmente, se sugiere el desarrollo de investigaciones que permitan entender el papel que las ovejas desempeñan en el ciclo natural de la anaplasmosis bovina en el ecosistema del bajo trópico Colombiano, teniendo en cuenta que los sistemas de manejo de tipo mixto son bastante frecuentes en nuestro país.

6. Anexos

Anexo 1. Tabla resumen resultados.

ID	Edad	Sexo	Raza	Microscopia	PCR <i>Anaplasma</i> <i>spp</i>	PCR <i>Anaplasma</i> <i>marginale</i>	PCR <i>Anaplasma</i> <i>ovis</i>
1	<12	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	<12	Macho	Africana	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
3	>24	Hembra	Africana	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
4	>24	Hembra	Cruces	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
5	>24	Hembra	Cruces	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
6	>24	Hembra	Africana	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
7	13 - 18	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8	>24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9	13 - 18	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
10	13 - 18	Hembra	Africana	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
11	13 - 18	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
12	>24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
13	19 - 24	Hembra	Africana	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
14	>24	Hembra	Cruces	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
15	19 - 24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
16	<12	Hembra	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
17	<12	Hembra	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
18	<12	Hembra	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
19	<12	Hembra	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20	<12	Macho	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
21	<12	Macho	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
22	<12	Hembra	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

23	<12	Hembra	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
24	<12	Hembra	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
25	<12	Hembra	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
26	<12	Hembra	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
27	<12	Hembra	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
28	<12	Macho	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
29	>24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
30	<12	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
31	>24	Macho	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
32	19 - 24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
33	19 - 24	Hembra	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
34	>24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
35	13 - 18	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
36	<12	Macho	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
37	13 - 18	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
38	<12	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
39	13 - 18	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40	>24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41	<12	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
42	19 - 24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
43	>24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
44	19 - 24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
45	13 - 18	Hembra	Africana	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
46	<12	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
47	19 - 24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48	<12	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
49	<12	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
50	>24	Macho	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
51	>24	Hembra	Pelibuey	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
52	>24	Hembra	Pelibuey	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
53	>24	Hembra	Pelibuey	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
54	>24	Hembra	Pelibuey	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
55	>24	Hembra	Pelibuey	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
56	>24	Macho	Pelibuey	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
57	>24	Hembra	Katahdin	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
58	>24	Hembra	Pelibuey	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
59	>24	Hembra	Pelibuey	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
60	>24	Hembra	Katahdin	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
61	>24	Hembra	Katahdin	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo

**DETECCIÓN MOLECULAR DE ANAPLASMA SP EN OVINOS DEL MUNICIPIO DE
MONTELÍBANO DEPARTAMENTO DE CÓRDOBA-COLOMBIA**

62	>24	Hembra	Katahdin	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
63	>24	Macho	Katahdin	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
64	>24	Hembra	Katahdin	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
65	>24	Hembra	Katahdin	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
66	>24	Hembra	Katahdin	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
67	>24	Hembra	Katahdin	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
68	>24	Hembra	Katahdin	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
69	>24	Macho	Katahdin	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
70	>24	Hembra	Africana	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
71	<12	Hembra	Africana	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
72	>24	Hembra	Africana	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
73	13 - 18	Hembra	Africana	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
74	>24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
75	<12	Hembra	Africana	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
76	<12	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
77	>24	Hembra	Africana	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
78	<12	Hembra	Africana	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
79	19 - 24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
80	13 - 18	Hembra	Africana	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
81	>24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
82	>24	Hembra	Africana	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
83	>24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
84	>24	Hembra	Africana	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
85	13 - 18	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
86	>24	Hembra	Africana	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
87	>24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
88	19 - 24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
89	13 - 18	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
90	<12	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
91	<12	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
92	<12	Macho	Africana	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
93	>24	Macho	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
94	>24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
95	>24	Hembra	Africana	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
96	>24	Hembra	Africana	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
97	<12	Macho	Africana	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
98	>24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
99	>24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
100	>24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

101	>24	Hembra	Pelibuey	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
102	>24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
103	19 - 24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
104	>24	Hembra	Africana	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
105	>24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
106	19 - 24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
107	>24	Hembra	Africana	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
108	<12	Macho	Africana	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
109	<12	Hembra	Africana	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
110	<12	Hembra	Africana	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
111	13 - 18	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
112	13 - 18	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
113	<12	Hembra	Africana	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
114	<12	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
115	<12	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
116	<12	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
117	<12	Hembra	Africana	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
118	<12	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
119	<12	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
120	<12	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
121	<12	Macho	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
122	<12	Macho	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
123	<12	Hembra	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
124	<12	Hembra	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
125	<12	Hembra	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
126	<12	Macho	Cruces	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
127	<12	Hembra	Cruces	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
128	<12	Macho	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
129	<12	Hembra	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
130	<12	Hembra	Cruces	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
131	<12	Hembra	Cruces	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
132	<12	Hembra	Cruces	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
133	<12	Hembra	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
134	19 - 24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
135	<12	Hembra	Africana	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
136	19 - 24	Macho	Cruces	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
137	>24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
138	>24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
139	19 - 24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

**DETECCIÓN MOLECULAR DE ANAPLASMA SP EN OVINOS DEL MUNICIPIO DE
MONTELÍBANO DEPARTAMENTO DE CÓRDOBA-COLOMBIA**

140	13 - 18	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
141	13 - 18	Macho	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
142	>24	Macho	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
143	>24	Hembra	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
144	>24	Hembra	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
145	19 - 24	Hembra	Cruces	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
146	13 - 18	Hembra	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
147	>24	Macho	Cruces	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
148	>24	Hembra	Cruces	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
149	>24	Hembra	Cruces	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
150	>24	Hembra	Cruces	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
151	19 - 24	Hembra	Cruces	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
152	>24	Hembra	Cruces	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
153	>24	Macho	Dorper	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
154	>24	Hembra	Otras	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
155	>24	Hembra	Africana	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
156	>24	Macho	Otras	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
157	<12	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
158	>24	Macho	Dorper	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
159	>24	Hembra	Africana	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
160	>24	Hembra	Dorper	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
161	>24	Hembra	Dorper	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
162	>24	Macho	Dorper	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
163	>24	Hembra	Dorper	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
164	>24	Hembra	Dorper	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
165	>24	Hembra	Pelibuey	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
166	>24	Hembra	Dorper	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
167	>24	Hembra	Dorper	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo

Bibliografía.

- Adjou Moumouni, P. F., Aplogan, G. L., Katahira, H., Gao, Y., Guo, H., A. Xuan, X. (2018). Prevalence, risk factors, and genetic diversity of veterinary important tick-borne pathogens in cattle from *Rhipicephalus microplus* -invaded and non-invaded areas of Benin. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 9(3), 450-464.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.12.015>
- Akinboade, O., Sadiq, N., Akinrinmade, J., Dipeolu, O., & Nwufor, K. (1986). Anaplasmosis of small ruminants in Nigeria: incidence and parasite identification through blood smear and latex agglutination test (LAT). *International Journal of Zoonoses*, 13(3), 210-214.
- Alessandra, T., & Santo, C. (2012). Tick-borne diseases in sheep and goats: Clinical and diagnostic aspects. *Small Ruminant Research*, 106, S6-S11.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.04.026>
- Alleman, R., Palmer, G., McGuire, T., McElwain, T., Perryman, L., & Baebet, A. (1997). *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 3 Is Encoded by a Polymorphic, Multigene Family. *Infection and Immunity*, 65(1), 8.
- Allemans, R., Kamper, S., Viseshakul, N., & Barbet, A. (1993). Analysis of the *Anaplasma marginale* genome by pulsed-field electrophoresis. *Journal of General Microbiology*, 139, 2439-2444.

DETECCIÓN MOLECULAR DE ANAPLASMA SP EN OVINOS DEL MUNICIPIO DE
MONTELÍBANO DEPARTAMENTO DE CÓRDOBA-COLOMBIA

- Ameen, K. A. H., Abdullah, B. A., & Abdul-Razaq, R. A. (2012). Seroprevalence of *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* in domestic animals in Erbil, Iraq, 26, 6.
- Anyanwu, N., Iheanacho, C., & Adogo, L. (2016). Parasitological Screening of Haemo-Parasites of Small Ruminants in Karu Local Government Area of Nasarawa State, Nigeria. *British Microbiology Research Journal*, 11(6), 1-8.
<https://doi.org/10.9734/BMRJ/2016/22358>
- Araújo, F. R., Madruga, C. R., Soares, C. O., & Kessler, R. H. (2003). Progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 23(4), 139-148. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2003000400001>
- Aubry, P., & Geale, D. W. (2011). A Review of Bovine Anaplasmosis: Review of Bovine Anaplasmosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58(1), 1-30.
<https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x>
- Avila, L., Acevedo, A., Jurado, A., Polanco, D., Velásquez, R., & Zapata, R. (2013). Hemoparasite infection in goats and sheep at five municipalities in north and northeastern Antioquia (Colombia). *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 8(1), 4-24.
- Bandehpour, M, A.-H., M. (2009). Molecular identification of anaplasmosis in goats using a new PCR-RFLP method. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 10(4), 367-372.
- Barbet, A. F., Yi, J., Lundgren, A., McEwen, B. R., Blouin, E. F., & Kocan, K. M. (2001). Antigenic Variation of *Anaplasma marginale*: Major Surface Protein 2 Diversity during Cyclic Transmission between Ticks and Cattle. *Infection and Immunity*, 69(5), 3057-3066. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.3057-3066.2001>

- Battilani, M., De Arcangeli, S., Balboni, A., & Dondi, F. (2017). Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. *Infection, Genetics and Evolution*, *49*, 195-211. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.01.021>
- Belkahia, H., Ben Said, M., El Mabrouk, N., Saidani, M., Cherni, C., Ben Hassen, M., ... Messadi, L. (2017). Seasonal dynamics, spatial distribution and genetic analysis of *Anaplasma* species infecting small ruminants from Northern Tunisia. *Infection, Genetics and Evolution*, *54*, 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.016>
- Bell-Sakyi, L., Koney, E. B. M., Dogbey, O., & Walker, A. R. (2004). Incidence and prevalence of tick-borne haemoparasites in domestic ruminants in Ghana. *Veterinary Parasitology*, *124*(1-2), 25-42. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.05.027>
- Bilgic, H. B., Bakirci, S., Kose, O., Unlu, A. H., Hacilarlioglu, S., Eren, H., Karagenc, T. (2017). Prevalence of tick-borne haemoparasites in small ruminants in Turkey and diagnostic sensitivity of single-PCR and RLB. *Parasites & Vectors*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2151-3>
- Bowie, M. V., de la Fuente, J., Kocan, K. M., Blouin, E. F., & Barbet, A. F. (2002). Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. *Gene*, *282*(1-2), 95-102. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00845-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00845-9)
- Brayton, K. A., Kappmeyer, L. S., Herndon, D. R., Dark, M. J., Tibbals, D. L., Palmer, G. H., Knowles, D. P. (2005). Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(3), 844-849. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406656102>
- Colby, L., Beef & Lamb (Great Britain). (2015). *World sheep meat market to 2025*.

DETECCIÓN MOLECULAR DE ANAPLASMA SP EN OVINOS DEL MUNICIPIO DE
MONTELÍBANO DEPARTAMENTO DE CÓRDOBA-COLOMBIA

Cortés-vecino, J. A. (2011). Garrapatas : estado actual y perspectivas. *Biomedica*, 31, 3-315.

Da Silva NB., Taus NS., Johnson WC., Mira A., Schnittger L., Valente JDM., Vidotto O., Masterson HE., Vieira TSWJ., Ueti MW & Vieira RFC1. First report of *Anaplasma marginale* infection in goats, Brazil. *PLoS One*. 2018 Aug 13; 13(8):e0202140. doi: 10.1371/journal.pone.0202140.

Dahmani, M., Davoust, B., Tahir, D., Raoult, D., Fenollar, F., & Mediannikov, O. (2017). Molecular investigation and phylogeny of *Anaplasmataceae* species infecting domestic animals and ticks in Corsica, France. *Parasites & Vectors*, 10(302), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2233-2>

De Echaide, S. T., Bono, M. F., Lugaresi, C., Aguirre, N., Mangold, A., Moretta, R., ... Mondillo, C. (2005). Detection of antibodies against *Anaplasma marginale* in milk using a recombinant MSP5 indirect ELISA. *Veterinary Microbiology*, 106(3-4), 287-292. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.12.026>

De la Fuente, J., Blouin, E. F., & Kocan, K. M. (2003). Infection Exclusion of the Rickettsial Pathogen *Anaplasma marginale* in the Tick Vector *Dermacentor variabilis*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 10(1), 182-184. <https://doi.org/10.1128/CDLI.10.1.182-184.2003>

De la Fuente, J., Van Den Bussche, R. A., Prado, T. M., & Kocan, K. M. (2003). *Anaplasma marginale* msp1 Genotypes Evolved under Positive Selection Pressure but Are Not Markers for Geographic Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4), 1609-1616. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1609-1616.2003>

De la Fuente, José, Atkinson, M. W., Hogg, J. T., Miller, D. S., Naranjo, V., Almazán, C., Kocan, K. M. (2006). Genetic Characterization of *Anaplasma ovis* Strains from

- Bighorn Sheep in Montana. *Journal of Wildlife Diseases*, 42(2), 381-385.
<https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.2.381>
- De la Fuente, José, Atkinson, M. W., Naranjo, V., Fernández de Mera, I. G., Mangold, A. J., Keating, K. A., & Kocan, K. M. (2007). Sequence analysis of the msp4 gene of *Anaplasma ovis* strains. *Veterinary Microbiology*, 119(2-4), 375-381.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.09.011>
- De la Fuente, José, Lew, A., Lutz, H., Meli, M. L., Hofmann-Lehmann, R., Shkap, V., Kocan, K. M. (2007). Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. *Animal Health Research Reviews*, 6, 75-89.
<https://doi.org/10.1079/ahr2005104>
- De la Fuente, José, Torina, A., Caracappa, S., Tumino, G., Furlá, R., Almazán, C., & Kocan, K. M. (2005). Serologic and molecular characterization of *Anaplasma* species infection in farm animals and ticks from Sicily. *Veterinary Parasitology*, 133(4), 357-362. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.063>
- De la Fuente, José, Van Den Bussche, R. A., Garcia-Garcia, J. C., Rodríguez, S. D., García, M. A., Guglielmonne, A. A., ... Kocan, K. M. (2002). Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. *Veterinary Microbiology*, 88(3), 275-285.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00122-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00122-0)
- De la fuente, J., Vicente, J., Hofle, U., Ruizfons, F., Fernandezdemera, I., Vandebussche, R., Gortazar, C. (2004). Infection in free-ranging Iberian red deer in the region of Castilla-La Mancha, Spain. *Veterinary Microbiology*, 100(3-4), 163-173. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.02.007>
- Demessie, Y., & Derso, S. (2015). Tick Borne Hemoparasitic Diseases of Ruminants: A Review, 15.

DETECCIÓN MOLECULAR DE ANAPLASMA SP EN OVINOS DEL MUNICIPIO DE
MONTELÍBANO DEPARTAMENTO DE CÓRDOBA-COLOMBIA

Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P. J., 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, 2145–2165.

El-Ashker, M., Hotzel, H., Gwida, M., El-Beskawy, M., Silaghi, C., & Tomaso, H. (2015).

Molecular biological identification of *Babesia*, *Theileria*, and *Anaplasma* species in cattle in Egypt using PCR assays, gene sequence analysis and a novel DNA microarray. *Veterinary Parasitology*, 207(3-4), 329-334.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.025>

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. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.8.3829-3834.2003>

Garay, Á. A., & Assmus, G. C. (2013). Tecnología en la ovinocultura colombiana: estado del arte, 18.

Ge, Y., Yin, H., Rikihisa, Y., Pan, W., & Yin, H. (2016). Molecular Detection of Tick-Borne

Rickettsiales in Goats and Sheep from Southeastern China. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 16(5), 309-316. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1884>

Han, R., Yang, J., Liu, Z., Gao, S., Niu, Q., Hassan, M. A., Yin, H. (2017).

Characterization of *Anaplasma ovis* strains using the major surface protein 1a repeat sequences. *Parasites & Vectors*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2363-6>

- Hashemi-Fesharki, R. (1997). Tick-borne diseases of sheep and goats and their related vectors in Iran. *Parassitologia*, 39(2), 115-117.
- Herndon, D. R., Palmer, G. H., Shkap, V., Knowles, D. P., & Brayton, K. A. (2010). Complete Genome Sequence of *Anaplasma marginale* subsp. *centrale*. *Journal of Bacteriology*, 192(1), 379-380. <https://doi.org/10.1128/JB.01330-09>
- 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). <https://doi.org/10.21897/rmvz.380>
- Hornok, S., Elek, V., de la Fuente, J., Naranjo, V., Farkas, R., Majoros, G., & Földvári, G. (2007). First serological and molecular evidence on the endemicity of *Anaplasma ovis* and *A. marginale* in Hungary. *Veterinary Microbiology*, 122(3-4), 316-322. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.01.024>
- ICA. (2012). Sistema de Información y Vigilancia SANIDAD ANIMAL 2012.
- ICA. (2013). *Sistema de Información y Vigilancia SANIDAD ANIMAL 2013*.
- ICA. (2014). *Sistema de Información y Vigilancia SANIDAD ANIMAL 2014*.
- Instituto Colombiano Agropecuario. (2017). CENSO OVINO 2017.
- Jalali, S. M., Bahrami, S., Rasooli, A., & Hasanvand, S. (2016). E Molecular detection and identification of *Anaplasma* species in sheep from Ahvaz, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, Shiraz University, 2013, Vol. 14, No. 1, Pages 50-56
- Jatau, I., Abdulganiyu, A., Lawal, A., Okubanjo, O., & Yusuf, K. (2011). Gastrointestinal and haemoparasitism of sheep and goats at slaughter in Kano, northern-Nigeria. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, 9(1), 5.
- 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. <https://doi.org/10.16925/sp.v9i19.704>

DETECCIÓN MOLECULAR DE ANAPLASMA SP EN OVINOS DEL MUNICIPIO DE
MONTELÍBANO DEPARTAMENTO DE CÓRDOBA-COLOMBIA

- 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, 285-300.
- Kocan, K. M., de la Fuente, J., Guglielmono, A. A., & Melendez, R. D. (2003). Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(4), 698-712. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.698-712.2003>
- Kocan, K M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., & Ewing, S. A. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, 167(2-4), 95-107. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.012>
- Kuttler, K. L. (1984). *Anaplasma* infections in wild and domestic ruminants: A Review. *Journal of Wildlife Diseases*, 20(1), 12-20. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-20.1.12>
- Lee, S.-H., Mossaad, E., Ibrahim, A. M., Ismail, A. A., Adjou Moumouni, P. F., Liu, M., ... Xuan, X. (2018). Detection and molecular characterization of tick-borne pathogens infecting sheep and goats in Blue Nile and West Kordofan states in Sudan. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 9(3), 598-604. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.01.014>
- Liu, Z., Ma, M., Wang, Z., Wang, J., Peng, Y., Li, Y., Yin, H. (2012). Molecular Survey and Genetic Identification of *Anaplasma* Species in Goats from Central and Southern China. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(2), 464-470. <https://doi.org/10.1128/AEM.06848-11>
- Masake, R., & Musoke, A. (1997). Blood parasitic diseases and specific immune responses. Office International des Epizooties.

- Neimark, H. (2004). *Mycoplasma ovis* comb. nov. (formerly *Eperythrozoon ovis*), an epierythrocytic agent of haemolytic anaemia in sheep and goats. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 54(2), 365-371.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.02858-0>
- Noaman, V. (2013). Discrimination between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma ovis* by PCR-RFLP, 6.
- OIE. (2015). Anaplasmosis Bovina. En *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres* (Octava).
- Ortiz, E. B., Palencia, N. P., Gerdtz, O. V., & Hurtado, Ó. B. (2012). Criterios y protocolos para el diagnóstico de hemoparásitos en bovinos, 20.
- Palmer, G. H., Abbott, J. R., French, D. M., & Mcelwain, T. F. (2004). Persistence of *Anaplasma ovis* Infection and Conservation of the msp-2 and msp-3 Multigene Families within the Genus *Anaplasma*. *Infect. Immun.*, 66, 5.
- Palmer, G. H., Barbet, A. F., Kuttler, K. L., & Mcguire, T. C. (1986). Detection of an *Anaplasma marginale* Common Surface Protein Present in All Stages of Infection, 23, 6.
- Pereira, A., Parreira, R., Cotão, A. J., Nunes, M., Vieira, M. L., Azevedo, F., Maia, C. (2018). Tick-borne bacteria and protozoa detected in ticks collected from domestic animals and wildlife in central and southern Portugal. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 9(2), 225-234. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.09.008>
- Posada-Zapata, J., Cabrera J, A., González–Alvarez, D., Rodas G, J., Monsalve B, S., & Londoño B, A. (2017). Identificación de bacterias de la familia *Anaplasmataceae* en un albergue canino del municipio de Caldas, Antioquia. *Revista MVZ Córdoba*, 22(supl), 6014. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1071>
- Pulido-Herrera, L. A., Rudas, A., Betancourt, J. A., Grant, W., & Vilchez, S. (2015). Unusual and potential distribution of the common cattle tick, *Rhipicephalus*

DETECCIÓN MOLECULAR DE ANAPLASMA SP EN OVINOS DEL MUNICIPIO DE
MONTELÍBANO DEPARTAMENTO DE CÓRDOBA-COLOMBIA

(Boophilus) microplus, in high mountain tropical zones of the Colombian Andes.

Biota Colombiana, 16(2), 75-95.

Quiroz Romero, H., Figueroa Castillo, J. A., Ibarra Velarde, F., & Lopez Arellano, M. E.

(2011). *Epidemiología de Enfermedades Parasitarias en Animales Domésticos*

(1ra Edición). Mexico.

Renneker, S., Abdo, J., Salih, D. E. A., Karagenc, T., Bilgiç, H., Torina, A., ... Seitzer, U.

(2013). Can *Anaplasma ovis* in Small Ruminants be neglected any Longer?

Transboundary and Emerging Diseases, 60, 105-112.

<https://doi.org/10.1111/tbed.12149>

Salih, A., El Hussein, M., & Singla, D. (2015). Diagnostic approaches for tick-borne

haemoparasitic diseases in livestock. *Journal of Veterinary Medicine and Animal*

Health, 7(2), 45-56. <https://doi.org/10.5897/JVMAH2014.0345>

Salih Mustafa, B. (2011). Clinical and hematological study on Ovine Anaplasmosis in

Sulaimani Province- Iraq. *Basrah Journal of Veterinary Research*, 10,(2).

Schotthoefer, A. M., Meece, J. K., Ivacic, L. C., Bertz, P. D., Zhang, K., Weiler, T., ...

Fritsche, T. R. (2013). Comparison of a Real-Time PCR Method with Serology and

Blood Smear Analysis for Diagnosis of Human Anaplasmosis: Importance of

Infection Time Course for Optimal Test Utilization. *Journal of Clinical Microbiology*,

51(7), 2147-2153. <https://doi.org/10.1128/JCM.00347-13>

Sitotaw, T., Regassa, F., Zeru, F., & Kahsay, A. G. (s. f.). Epidemiological significance of

major hemoparasites of ruminants in and around Debre-Zeit, Central Ethiopia, 7.

Stuen, S., Grova, L., Granquist, E. G., Sandstedt, K., Olesen, I., & Steinshamn, H. (2011).

A comparative study of clinical manifestations, haematological and serological

responses after experimental infection with *Anaplasma phagocytophilum* in two

- Norwegian sheep breeds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53(1), 8.
<https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-8>
- Tavares-Marques, L. M., Núñez, C., Rey-Valeirón, C., & Reyna-Bello, A. (2010). Serological evidence of *Anaplasma spp.* in small ruminants from Venezuela using recombinant msp5 in immunoenzymatic assay. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 20(5), 506-511.
- Torina, A., Agnone, A., Blanda, V., Alongi, A., D'Agostino, R., Caracappa, S., de la Fuente, J. (2012). Development and validation of two PCR tests for the detection of and differentiation between *Anaplasma ovis* and *Anaplasma marginale*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 3(5-6), 283-287.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.10.033>
- Yang, J., Han, R., Niu, Q., Liu, Z., Guan, G., Liu, G., ... Yin, H. (2018). Occurrence of four *Anaplasma species* with veterinary and public health significance in sheep, northwestern China. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 9(1), 82-85.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.10.005>
- Yasini, S., Khaki, Z., Rahbari, S., Kazemi, B., Amoli, J. S., Gharabaghi, A., & Jalali, S. (2012). Hematologic and Clinical Aspects of Experimental Ovine Anaplasmosis Caused by *Anaplasma ovis* in Iran, 7, 8.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.017>
- Zaugg, J. L. (1986). Experimental anaplasmosis in American bison: persistence of infections of *Anaplasma marginale* and non-susceptibility to *A. ovis*. *Journal of Wildlife Diseases*, 22(2), 169-172. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-22.2.169>

DETECCIÓN MOLECULAR DE ANAPLASMA SP EN OVINOS DEL MUNICIPIO DE
MONTELÍBANO DEPARTAMENTO DE CÓRDOBA-COLOMBIA

Zaugg, J. L. (1987). Ovine anaplasmosis: in utero transmission as it relates to stage of gestation. *American Journal of Veterinary Research*, 48(1), 100-103.

Zhang, Y., Lv, Y., Zhang, F., Zhang, W., Wang, J., Cui, Y., Ning, C. (2016). Molecular and phylogenetic analysis of *Anaplasma* spp. in sheep and goats from six provinces of China. *Journal of Veterinary Science*, 17(4), 523.

<https://doi.org/10.4142/jvs.2016.17.4.523>