UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

"PREVALENCIA DE *Anaplasma marginale* EN BOVINOS MEDIANTE EL MÉTODO DE ELISA COMPETITIVO"

Trabajo de titulación previo a la obtención

del título de Médica Veterinaria Zootecnista

AUTORA: LILIBETH CAROLINA PIEDRA MOROCHO

TUTOR: ING. MAURICIO XAVIER SALAS RUEDA, Mgst.

Cuenca - Ecuador

2022

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Lilibeth Carolina Piedra Morocho con documento de identificación N° 0107314544 manifiesto que:

Soy la autora y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 23 de mayo del 2022.

Atentamente,

Lilibeth Carolina Piedra Morocho
0107314544

CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

Yo, Lilibeth Carolina Piedra Morocho con documento de identificación No. 0107314544, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos primordiales en virtud de que soy la autora del Trabajo Experimental: "Prevalencia de *Anaplasma marginale* en bovinos mediante el método de ELISA competitivo", el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Médica Veterinaria y Zootecnista, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 23 de mayo del 2022.

Atentamente,

Lilibeth Carolina Piedra Morocho
0107314544

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Mauricio Xavier Salas Rueda con documento de identificación N° 0603329681, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: "PREVALENCIA DE *Anaplasma marginale* EN BOVINOS MEDIANTE EL MÉTODO DE ELISA COMPETITIVO", realizado por Lilibeth Carolina Piedra Morocho con documento de identificación N° 0107314544, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 23 de mayo del 2022.

Atentamente,

_____

Ing. Mauricio Javier Salas Rueda, Mgst.
0603329681

DEDICATORIA.

Quiero dedicar este trabajo de titulación con todo el amor del mundo primeramente a Dios y luego a mis padres Hugo y Lina por su amor, trabajo y sacrificio; quienes me han permitido con su apoyo llegar a cumplir una meta más en mi vida y por inculcarme el ejemplo de esfuerzo y valentía; a mis hermanos Karen y Santiago quienes son el pilar fundamental de mi vida, mi motivación y fuerza en cada momento. A mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento me acompañaron a lo largo de mi carrera universitaria y en mi vida.

A mi tutor de tesis por haberme guiado en la elaboración de este trabajo y brindado el apoyo para desarrollarme profesionalmente; a mis profesores universitarios que con su sabiduría y conocimiento motivaron a desarrollarme como profesional y culminar esta preciada carrera.

Finalmente, quiero dedicar esta tesis a todas las personas que confiaron en mi desde el primer momento en que tome la decisión de estudiar veterinaria, que me abrieron las puertas, compartieron sus conocimientos y extendieron su mano para ayudarme en los momentos difíciles.

AGRADECIMIENTO.

Quiero expresar mi gratitud a Dios por guiarme a lo largo de mi vida; a mis padres quienes son mi mayor inspiración y con su amor, paciencia, buenos valores guían mi camino. A mis hermanos quienes siempre me alentaron a culminar mi carrera universitaria y a la persona que estuvo a mi lado todos estos años por el apoyo mutuo y su lealtad.

Mi profundo agradecimiento a todos los profesores universitarios quienes me transmitieron desinteresadamente sus conocimientos para ser una excelente profesional e incentivaron a ser mejor cada día.

Un agradecimiento especial a mi tutor de tesis por su paciencia, orientación y apoyo en cada paso consiguiendo culminar con éxito este trabajo de titulación.

A la Universidad Politécnica Salesiana por ser mi segundo hogar y sede del conocimiento adquirido durante todos estos años.

ÍNDICE DE CONTENIDO.

RESUMEN. 8

ABSTRACT. 9

1. INTRODUCCIÓN. 10

1.1 Problema. 10

1.2 Delimitación 11

1.2.1 Delimitación temporal. 11

1.2.2 Delimitación espacial. 11

1.2.3 Delimitación académica. 12

1.3 Explicación del problema. 12

1.4. OBJETIVOS. 12

1.4.1. General. 12

1.4.2. Específicos. 12

1.6. Fundamento teórico. 13

2. REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTO. 13

2.1. Generalidades. 13

2.2. Vector. 15

2.2.1. Garrapatas: Clasificación taxonómica. 15

2.2.2. Descripción. 16

2.3. Ciclo biológico. 17

2.4. Anaplasmosis. 19

2.4.1. Etiología. 20

2.4.2. Patogenia. 20

2.4.3. Transmisión 21

2.4.4. Epidemiología. 23

2.4.5. Inmunidad. 24

2.4.6. Signos Clínicos. 25

2.4.7. Diagnóstico. 26

2.4.7.1. Técnicas empleadas 27

2.4.7.2.1. Procedimiento para realizar el ensayo. 31

2.4.8. Tratamiento. 31

2.4.9. Control y prevención. 32

2.4.9.1. Recomendaciones para zonas libres. 33

2.4.9.2. Recomendaciones para zonas endémicas. 33

2.5. RESUMEN DEL ESTADO DEL ARTE DEL ESTUDIO DEL PROBLEMA. 35

3. MATERIALES Y MÉTODOS 37

3.1. Materiales. 37

3.1.1. Materiales físicos de campo. 37

3.1.2. Material biológico de campo. 37

3.1.3. Material de laboratorio. 38

3.1.4. Material químico. 39

3.1.5. Materiales de oficina. 39

3.2. METODOLOGÍA 40

3.3. Proceso de la investigación. 40

3.3.1. Selección de los animales. 40

3.3.2. Recolección de las muestras. 40

3.3.3. Proceso de laboratorio. 41

3.3.3.1. Principios del ensayo para el Kit ELISA competitivo. 41

3.4. Selección y tamaño de la muestra. 42

3.4.1. Toma de muestra. 43

3.4.2. Descripción del procedimiento. 43

3.4.2.1. Toma de muestra de vena coccígena. 43

3.4.2.2. Procedimiento para la deteccion de Anaplasma en ganado bovino. 45

3.4.2.3. Preparación. 46

3.4.2.4. Test de procedimiento. 47

3.4.2.6. Precauciones. 49

3.5. Toma y registro de datos. 49

3.6. DISEÑO ESTADÍSTICO. 50

3.7. OPERALIZACIÓN DE VARIABLES. 50

3.8. PROCEDIMIENTO. 51

3.8. CONSIDERACIONES ÉTICAS. 52

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 55

4.1. Resultados. 55

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 64

5.2. Recomendaciones. 65

6. BIBLIOGRAFIA. 66

7. ANEXOS. 71

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. *Equipos físicos de campo*.....37

Tabla 2. *Equipos biológicos de campo.* 37

Tabla 3. *Equipos físicos de laboratorio*.....38

Tabla 4. *Equipo personal de laboratorio*.....38

Tabla 5. *Material químico de laboratorio*. 39

Tabla 6. *Material biológico de laboratorio.* 39

Tabla 7. *Materiales de oficina.* 39

Tabla 8. *Variables dependientes (bovinos).*.....50

Tabla 9. *Variables independientes (Anaplasmosis).* 51

Tabla 10 *Prevalencia total de la enfermedad en base a la tabulación de datos.* 55

Tabla 11 *Presencia de Anaplasma marginale en bovinos muestreados según la edad mediante la técnica de ELISA*.....56

Tabla 12 *Presencia de Anaplasma marginale en bovinos muestreados según la procedencia mediante el método ELISA.*.....57

Tabla 13 *Presencia de Anaplasma marginale en bovinos muestreados según el sexo mediante el método ELISA.* 58

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 2. Morfología adulta de la garrapata.....17

Figura 3. Ciclo evolutivo de la garrapata.....*19*

Figura 4. Ciclo de desarrollo de Anaplasma Marginale en un bovino.....*22*

Figura 5. Resultados obtenidos mediante la técnica de ELISA competitivo. *55*

RESUMEN.

Las hemoparasitosis en bovinos son enfermedades que generan graves pérdidas al ganadero por las sensibles bajas productivas, merma del desarrollo, y los tratamientos costosos asociadas a las mismas, el Ecuador por su ubicación geográfica es un nicho endémico de los vectores que albergan estos hemoparásitos, en las zonas amazónicas y costeras, se evidencia la presencia de garrapatas, pero el cambio climático ha generado también la presencia de estos artrópodos en zonas subtropicales altas como es la zona de Santa Isabel donde se desarrolla este estudio. El presente trabajo corresponde a un estudio de tipo transversal descriptivo prospectivo, que pretende establecer la prevalencia de *Anaplasma marginale* en el cantón Santa Isabel de la Provincia del Azuay, mediante el análisis serológico con la técnica de ELISA competitivo. Para este estudio se recolecto 188 muestras de bovinos sin discriminar sexo, raza, edad y tipo de explotación. Los resultados de esta investigación arrojaron un 53% (100/188) de muestras positivas para *Anaplasma marginale;* mientras que el 47% (88/188) fueron negativas. Según estudios realizados en el país, la prevalencia de *Anaplasma marginale* mediante técnicas de laboratorio van desde el 7% al 80%, incluido estudios realizados fuera del país, la prevalencia se ajusta entre las cifras descritas por otros autores, tomando en cuenta la edad de los animales en estudio, a mayor edad, mayor será la susceptibilidad.

ABSTRACT.

Hemoparasitosis in bovines are diseases that cause serious losses to the farmer due to the sensitive low production, reduced development, and the costly treatments associated with them. Ecuador, due to its geographical location, is an endemic niche for the vectors that harbor these hemoparasites, in In the Amazonian and coastal areas, the presence of ticks is evident, but climate change has also generated the presence of these arthropods in high subtropical areas such as the Santa Isabel area where this study is carried out. The present work corresponds to a prospective descriptive cross-sectional study, which aims to establish the prevalence of Anaplasma marginale in the Santa Isabel canton of the Province of Azuay, through serological analysis with the competitive ELISA technique. For this study, 188 samples of bovines were collected without discriminating sex, race, age, and type of exploitation. The results of this investigation showed 53% (100/188) of positive samples for *Anaplasma marginale*, while 47% (88/188) were negative. According to studies carried out in the country, the prevalence of Anaplasma marginale through laboratory techniques ranges from 7% to 80%, including studies carried out outside the country, the prevalence is adjusted between the figures described by other authors, considering the age of animals under study, the older, the greater the susceptibility.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Problema.

La anaplasmosis constituye un problema dentro de la ganadería, afectando principalmente la salud de los animales, ya que esta enfermedad es causada por un hemoparásito que utiliza como vector a la garrapata, esta puede afectar de tal manera produciendo graves cuadros anémicos y llevando de manera consecuente a la muerte del ganado. Esta enfermedad se ubica principalmente en las zonas tropicales y subtropicales en la cual afecta a la mayoría de los animales que son susceptibles a ella. Dada la ubicación geográfica de nuestro país, estos hemoparásitos se encuentran ampliamente difundidos en zonas que observan condiciones climatológicas favorables para su desarrollo. (Sanchez, 1984)

Produce importantes pérdidas económicas por disminución en la producción de leche y ganancias de peso en engordas, abortos y muertes y por los costos de tratamientos. El hombre también colabora en su transmisión, al emplear prácticas médico-zootécnicas carentes de higiene en donde se involucre contacto con sangre de bovinos. (Olguin y Bernal, 2007)

(Gutierrez, 2016) Nos habla de los cambios ambientales producto del calentamiento mundial, la explosión demográfica de la población humana, el transporte de los animales de una región a otra, la deforestación y la penetración humana en los nichos ecológicos donde circulan las Ehrlichias, Anaplasmas, Babesias por motivos laborales y recreacionales, son algunos de los factores que modifican la dinámica de la transmisión de las enfermedades causadas por estos parásitos, es entonces imprescindible el conocimiento detallado de los diferentes aspectos que intervienen en su transmisión a fin de implementar las medidas más adecuadas para su control. (p. 653)

1.2 Delimitación

1.2.1 Delimitación temporal.

El proceso investigativo tuvo una duración de 400 horas, distribuidas en el proceso experimental y de redacción final.

1.2.2 Delimitación espacial.

La investigación se realizó en el cantón Santa Isabel y sus alrededores. Santa Isabel es un cantón occidental de la provincia de Azuay en Ecuador, se localiza en la cuenca alta y media del río Jubones, su clima es variado y presenta oscilaciones entre 8 °C y 24 °C, este cantón va desde los 700 msnm en la parroquia; el Carmen de Pijilí hasta los 4125 msnm en la parroquia de Shaglli, lo cual presenta grandes zonas para la biodiversidad.

Su extensión territorial es de 771.42 km² siendo el 9.63% de la provincia del Azuay, está a 62 km de la Ciudad de Cuenca, siguiendo la carretera Cuenca – Girón – Pasaje. Forma parte de la cuenca del río Jubones, río que cruza de norte a sur el valle de Yunguilla y desemboca en el Océano Pacífico. Tienen además los más variados climas, que van desde el cálido seco, y el frío del páramo. Su altitud promedio es de 1.620 msnm, tiene una temperatura de 23°-24° °C. (Gobierno Autónomo Decentralizado de Santa Isabel, 2020).

Figura 1. Mapa del Cantón Santa Isabel.

Fuente: (Gad Santa Isabel, 2020)

1.2.3 Delimitación académica.

La presente investigación cubre un área muy importante dentro de la Medicina Veterinaria la cual se denomina “Parasitología o enfermedades parasitarias en bovinos”, por lo tanto, esta investigación es para beneficio de profesionales, estudiantes y personas afines al tema, fortaleciendo conocimientos a nivel de parasitología y laboratorio clínico.

1.3 Explicación del problema.

La Anaplasmosis es una enfermedad que ocasiona serios problemas en el ganado bovino por tener una alta prevalencia y afectar principalmente a células sanguíneas (eritrocitos, leucocitos y plaquetas), llegando a producir incluso la muerte del animal, es una enfermedad que se da más en zonas tropicales y subtropicales.

El manejo inadecuado de los animales en una producción y en conjunto con la falta de higiene de las instalaciones y la protección entre animal-propietario hacen que esta enfermedad que, a pesar de tener tratamientos efectivos, sea un peligro para las producciones ganaderas cuando carecen de un manejo técnico adecuado teniendo mayor importancia en lugares donde el clima es el medio adecuado para la evolución de esta enfermedad. (De la Sota, 2004)

1.4.OBJETIVOS.

1.4.1. General.

- Determinar la prevalencia de *Anaplasma marginale* en ganado vacuno mediante el método de ELISA competitivo en el cantón Santa Isabel, del Azuay.

1.4.2. Específicos.

- Determinar la presencia de anticuerpos para *Anaplasma marginale* en bovinos mediante el método ELISA.

- Calcular la prevalencia de *Anaplasma Marginale* en bovinos del Cantón Santa Isabel.
- Analizar los resultados obtenidos a partir de la técnica de ELISA en bovinos del cantón Santa Isabel, del Azuay.

1.5.Hipótesis

- Ha: Es alta la prevalencia de *Anaplasma marginale* en ganado bovino del cantón Santa Isabel.
- Ho: Es baja la prevalencia de *Anaplasma marginale* en ganado bovino del cantón Santa Isabel.

1.6.Fundamento teórico.

El presente trabajo experimental está dirigido a la obtención de resultados confiables sobre la prevalencia de Anaplasmosis en ganado bovino en el cantón Santa Isabel y sus alrededores, haciendo énfasis en que la misma es una enfermedad infecciosa cuyo vector son las garrapatas del género Ixódidas que afecta tanto a animales como al ser humano, y que por lo tanto como médicos veterinarios debemos estar preparados para realizar pruebas de diagnóstico y seguir los lineamientos terapéuticos específicos.

2. REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTO.

2.1.Generalidades.

Smith y Kilborne en el año de 1893, en el transcurso de sus investigaciones relacionadas con la Fiebre de la garrapata causada por un hemoparásito conocido como Babesia, realizaron la primera descripción de *Anaplasma marginale* como pequeños corpúsculos puntiformes o en

forma de cocos, dentro de los glóbulos rojos de los animales infectados y los consideraron como representantes de un estadio del ciclo de *Babesia Bigemina*. (Soto, 2010, p.3)

Anaplasma marginale es un microorganismo rickettsial que invade los eritrocitos de rumiantes, causando la enfermedad denominada anaplasmosis. Este microorganismo está ampliamente distribuido en países tropicales y subtropicales de la región. (Díaz, y otros, 2003)

La Anaplasmosis y la Babesiosis, son dos enfermedades producidas por hemoparásitos que afectan al ganado bovino en las zonas tropicales y subtropicales, originando cuadros clínicos de anemias severas en los animales susceptibles, los agentes etiológicos son el *Anaplasma marginale y la Babesia spp*, respectivamente.

Dada la ubicación geográfica de nuestro país, estos hemoparásitos se encuentran ampliamente difundidos en zonas que observan condiciones climatológicas favorables para su desarrollo. (Sanchez, 1984, p.1)

La distribución geográfica de este microorganismo es amplia debido a la gran cantidad de vectores que la transmiten; prácticamente todos los artrópodos hematófagos como mosquitos, moscas y principalmente garrapatas de varios géneros, como *Boophilus, Amblyomma y Dermacentor*. (Olguin y Bernal, 2007, p.2)

Los animales que logran recuperarse de la fase aguda de la enfermedad permanecen persistentemente infectados y se convierten en reservorio para la transmisión de la misma a los animales sanos, por lo que se hace necesario poder contar con técnicas de diagnóstico más sensibles para ser utilizadas en el movimiento internacional de ganado hacia zonas libres de la enfermedad, que permitan la detección de animales portadores, así como para conocer la prevalencia de la enfermedad en las regiones tropicales y subtropicales. El ganado infectado que sobrevive a la anaplasmosis, por lo general se convierten en portadores de por vida y son

reservorios de la enfermedad. (Corona Gonzáles, et al., 2014). Los antibióticos como la tetraciclina son un tratamiento efectivo para la Anaplasmosis bovina. Las enfermedades transmitidas por garrapatas se encuentran en el grupo de enfermedades transmitidas por vectores (ETV). Por su continua y rápida diseminación a nivel mundial son denominadas también enfermedades emergentes. (Olguin y Bernal, 2007)

2.2. Vector.

2.2.1. Garrapatas: Clasificación taxonómica.

Anaplasma marginale se consideró como un protozoo hemático durante mucho tiempo; pertenece:

- Genogrupo II de las Ehrlichias
- Reino: Bacteria
- Filo: apicomplexa
- Clase: Proteobacteria
- Orden: Rickettsiales
- Familia: Anaplasmataceae
- Género: Anaplasma
- Especie: *A. marginale* - *A. centrale*

Anaplasma marginale, agente causal de la anaplasmosis en Bovinos, es transmitido por *Dermacentor andersoni*, *Boophilus microplus, Dermacentor albipictus, D. variabilis y Argas pesicus*. (Quiroz, 1990)

Se ha demostrado que *A. marginale* es transmitida por garrapatas ixódidas, incluyendo *Dermacentor andersoni* y *D. variabilis* en los EE. UU., y siendo quizá *Rhipicephalus*

(Boophilus) microplus, el vector más importante en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. (Brayton, 2012)

2.2.2. Descripción.

Es uno de los parásitos externos más importantes de las zonas tropicales. Afecta a los bovinos, equinos, perros, conejos, y al hombre entre otros. Por otra parte, es Gram negativo como la mayoría de las rickettsias. En los vertebrados se comporta como un organismo intra eritrocitario obligado, *A. marginale* infecta a los rumiantes domésticos y numerosos salvajes. (Kuttler, Zaraza, & Roberts, 1969)

Se reproduce por fisión binaria, el corpúsculo inicial invade el glóbulo rojo y luego se divide varias veces y forma un corpúsculo de inclusión formado por 4-8 corpúsculos iniciales. En la lista de nombres de bacterias reconocidas, publicadas en el *International Journal of Systematic Bacteriology* se incluye solo dos especies de Anaplasma: *A. Marginale*, responsable de la anaplasmosis bovina y *A ovis*, agente causal de la anaplasmosis ovina y caprina. Esta separación está basada en la falta de inmunidad cruzada y diferencias entre los antígenos de superficie. (Palmer , y otros, 1988)

Clínicamente se caracterizan por la presencia de garrapatas sobre la piel de diferentes partes del cuerpo y por la trasmisión de importantes enfermedades causadas por virus, bacterias, protozoarios, rickettsias, etc. (Quiroz, 1990) Además, causan gran impacto económico, derivado tanto de las medidas preventivas para evitar su presencia en áreas libres, como también de las medidas de control y tratamiento en regiones en donde están presentes, las infestaciones masivas de garrapatas provocan grandes daños físicos y económicos.

Las garrapatas se encuentran en dos familias; las de *ixodidae,* se caracterizan por presentar escudo, pequeño en las hembras, grande en los machos y el capítulo se encuentra en posición anterior en todos los estados evolutivos. (Felgueroso Espí, 2011) ; las de la familia

Argasidae que no tienen escudo, el capítulo se encuentra debajo del cuerpo en las ninfas y los adultos, es anterior en las larvas.

Las garrapatas de la familia *Ixodidae* son las llamadas garrapatas duras; estas incluyen a las que tienen escudo. El dimorfismo sexual es manifiesto, en el macho el escudo cubre completamente el dorso, mientras que en la hembra cubre parcialmente el dorso. (Quiroz, 1990)

Figura 1. Morfología adulta de la garrapata.

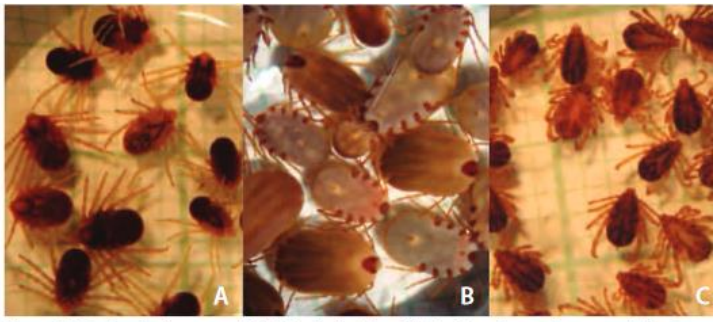


Figura 4. Adultos de la garrapata *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* en diversos estados de desarrollo. A: Hembras recién mudadas. B: Hembras parcialmente ingurgitadas. C: Machos. (Fotos: E. Benavides).

Fuente: (Benavides, Romero, & Villamil, 2016)

2.3.Ciclo biológico.

Las garrapatas tienen cuatro estados evolutivos en su ciclo vital, es decir: el huevo, la larva hexápoda o pinolillo, la ninfa octópoda y los adultos. La transformación entre un estado y otro requiere de una o más mudas. Los cambios evolutivos no están restringidos necesariamente a una estación del año, hay una adaptación de las diferentes especies a la temperatura y humedad, habilidad para llegar para llegar al huésped que influyen en la duración de cada una de las etapas.

Quiroz (1990) Alega que el número de generaciones puede variar de tres o cuatro en las especies de un solo huésped como *Boophilus microplus*, una por año como en el caso de *Otoblus* y otras *Argasidae* y aun una generación cada dos o tres años como en algunas especies de tres huéspedes como *Dermacentor andersoni*.

El desarrollo de las garrapatas ocurre en uno, dos o tres huéspedes por lo que se denominan garrapatas de 1, 2 o 3 huéspedes. En el caso de la garrapata de 3 huéspedes, la larva se alimenta en un primer huésped, cae al suelo y muda al estado de ninfa, esta se alimenta hasta estar repleta, se deja caer al suelo y muda, finalmente el adulto se sube a un tercer huésped en donde se alimenta nuevamente. En general el estado larvario de estas garrapatas ataca al huésped y se alimenta por algunos días, pero el estado adulto y las ninfas normalmente se alimentan de 30 minutos a dos horas, abandonan al huésped y regresan a áreas protegidas.

La copula puede realizarse sobre el huésped o fuera de este, durante o después de la repleción alimentaria. Después de la monta y la repleción alimenticia, las hembras se dejan caer al suelo y buscan un sitio protegido para ovopositar.

En condiciones favorables la postura tarda dos días, pero en climas fríos se prolonga por semanas o meses. *B. microphus* pone aproximadamente 4.500 huevos. El periodo de incubación se determina en gran parte de la temperatura y varia de 2 semanas a 7 meses. (p. 779-781)

Las garrapatas necesitan unas condiciones especiales específicas para su supervivencia y desarrollo. Las más importantes son la temperatura, la humedad, la intensidad de luz y el número de horas de luz al día. La temperatura afecta especialmente a la regulación del ciclo vital (paso de una fase a otra) y la humedad al porcentaje de supervivencia, ya que las garrapatas son muy sensibles a la desecación. El fotoperíodo influye en la actividad de las garrapatas. (Felgueroso Espí, 2011)

Figura 2. Ciclo evolutivo de la garrapata.

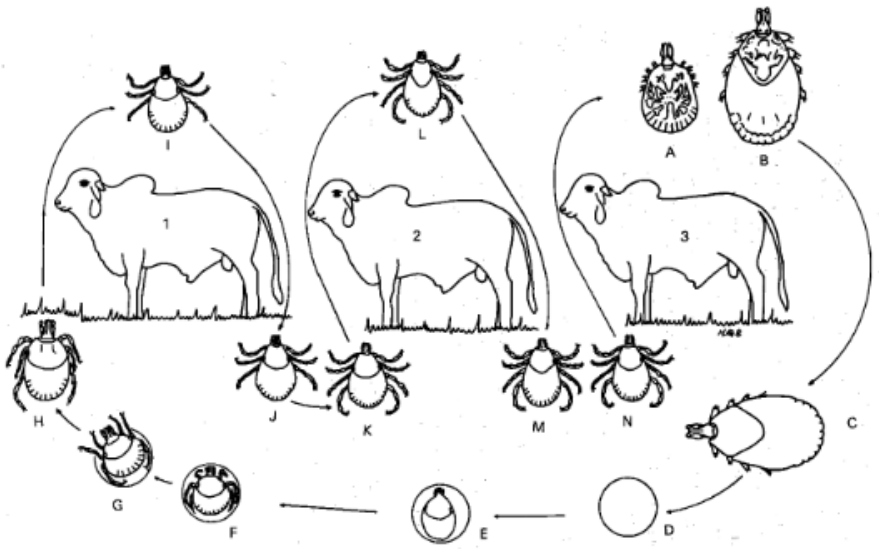


Figura 293. Esquema del ciclo evolutivo de *Amblyomma cajennse* 1. Primer huésped, 2. Segundo huésped, 3. Tercer huésped. A. Macho adulto; B. Hembra adulta; C. Hembra ovígera; D. Huevo; E. Huevo con embrión; F. Huevo con larva; G. Eclosión; H. Larva en ayuno; I. Larva alimentándose; J. Larva en el suelo muda; K. Ninfa; L. Ninfa parásita; M. Muda en la ninfa; N. Adulto en ayuno.

Fuente: (Quiroz, 1990)

2.4. Anaplasmosis.

El género Anaplasma (Rickettsiales: *Anaplasmataceae*) incluye especies importancia médica y veterinaria. *Anaplasma marginale* es la especie más importante que causa anaplasmosis bovina en América del Sur. Esta bacteria se transmite biológicamente por varias especies de garrapatas (principalmente de los géneros *Rhipicephalus, Dermacentor e Ixodes* y mecánicamente por moscas o fómites contaminados con sangre.

El ganado bovino desarrolla infecciones persistentes con esta bacteria, por lo tanto, pueden servir como reservorio de la infección. La gravedad de la enfermedad aumenta con la edad del animal, ya que los terneros son mucho más resistentes al desarrollo de anaplasmosis clínica. En los bovinos de más de dos años, *A. marginale* provoca una enfermedad leve o grave que se caracteriza por fiebre persistente, letargo, ictericia, pérdida de peso, aborto, disminución

del rendimiento de la leche y muerte en más del 50 % de los animales no tratados. (Corona Gonzáles, y otros, 2014)

La anaplasmosis se puede transmitir por varios mecanismos uno de los más comunes es a través de insectos hematófagos como garrapatas del género *Boophilus spp* y *Tabanus spp*, otra forma de transmisión es a través de agujas, jeringas, mochetas y otros instrumentos empleados en las prácticas rurales contaminados que facilitan el pasaje de sangre rápidamente de un bovino infectado a otro susceptible. (Alcaraz, 1999, p.1)

2.4.1. Etiología.

Las enfermedades transmitidas por la garrapata *R. microplus* es una importante causa que limita la productividad del ganado bovino. En general los estudios epidemiológicos has demostrado que estos patógenos frecuentemente ocurren en el ganado bovino y su vector la garrapata. La garrapata *R. microplus* es el vector de la *Babesia bovis, B. bigemina y Anaplasma marginale*. (Duque Campuzano, 2017, p.13)

2.4.2. Patogenia.

El Anaplasma se transmite a través de garrapatas, en éstas la infección puede ser transovárica y puede existir una forma de transmisión mecánica por insectos chupadores de sangre, tales como tábanos, jejenes, moscas de establo. El contagio se da por la inoculación de sangre infectada de animales en la fase aguda de la enfermedad a los animales susceptibles. Otra forma de transmisión es por el uso de instrumental contaminado, para descorne, castración o inyecciones. (Rodriguez, 2014)

Es una bacteria intracelular obligada que una vez dentro del torrente sanguíneo, penetra en los eritrocitos maduros por endocitosis; infectando estos con la formación de una vacuola en donde se multiplica por fisión binaria para formar hasta ocho organismos individuales dentro

de una sola vacuola y luego, nuevos organismos salen del eritrocito, utilizando exocitosis e infectan los eritrocitos aledaños.

Después que el parasito entra al huésped el número de eritrocitos infectados se duplica entre las 24 y 48 horas siguientes. El periodo prepatente durante la incubación de la enfermedad es de dos a tres semanas y la duración depende de la cantidad de organismo infectante. (Sierra, 2013). La mayoría de los eritrocitos son destruidos en el sistema retículo endotelial (bazo, hígado y médula ósea) en este proceso se producen grandes cantidades de bilirrubina por lo que los tejidos y las mucosas se tornan ictéricas. La anemia puede persistir hasta 15 días perdiéndose hasta el 70% de los eritrocitos, posteriormente los animales que sobreviven se recuperan en un período de hasta 2 meses, sin embargo, continúan con el agente en la circulación periférica, quedando como portadores sanos. (Rodriguez, 2014)

2.4.3. Transmisión.

El estudio de la transmisión de *A. marginale* es de fundamental importancia para establecer un control efectivo de la enfermedad. Son amplias y muy variadas las formas en que puede transmitirse el parásito y dependen de la presencia de vectores (biológicos y mecánicos), la existencia de animales susceptibles y de condiciones ecológicas favorables.

(Benavides, Romero, & Villamil, 2016) relata que, en condiciones naturales, se presentan cuando confluyen dos eventos relacionados con las dinámicas de la población ganadera y de las garrapatas. En primera instancia, se requiere de la presencia de larvas de garrapata en las praderas, que se originen de garrapatas que se alimentaron sobre ganado infectado; en segundo lugar, se necesita la presencia de animales adultos susceptibles a los organismos transmitidos por la garrapata. Los animales que ya han tenido contacto con el organismo, y sobreviven a ese desafío, desarrollan algún grado de inmunidad, lo cual les brinda protección contra el desarrollo de la forma clínica aguda de la enfermedad. (p. 22)

2.4.3.1.Trasmisión biológica.

Es a través de las diferentes especies de garrapatas se efectúa de forma transestadial, es decir de una etapa a otra por ejemplo del estado de larvas a ninfas y de ninfas a adultos o intraestadial, es decir dentro de una etapa. Comienza en las células del intestino medio, siguiendo con las células musculares del mismo, después muchos otros tejidos de la garrapata lleguen a ser infectados, incluyendo las glándulas salivales, de donde la rickettsia se transmite al huésped vertebrado durante la alimentación.

Figura 3. Ciclo de desarrollo de *Anaplasma Marginale* en un bovino.

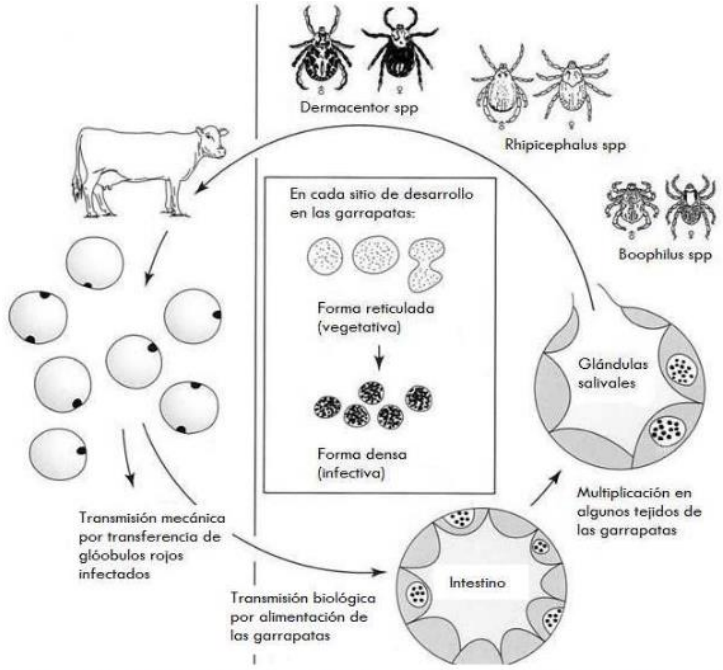


Figura 1.1. Ciclo de desarrollo de *Anaplasma marginale* en bovinos y garrapatas (Kocan *et al.*,

Fuente: (Quiroz, 1990)

El ganado llega a ser infectado con *A. marginale* cuando la forma densa es transmitida durante la alimentación de la garrapata a través de las glándulas salivales.

2.4.3.2.Transmisión Mecánica

La transmisión mecánica con frecuencia se produce por dípteros chupadores de sangre del género *Tabanus spp*, esta forma de transmisión se considera la principal vía de difusión de *A. marginale* en áreas de Centro y Sur América y África, además a través de instrumentos contaminados como agujas, descornadoras, instrumentos de tatuaje o marcación, dispositivo de etiquetado del oído e instrumentos usados en la castración. (Coronado, 2001, p.2)

2.4.4. Epidemiología.

La Anaplasmosis se encuentra ampliamente distribuida en todas las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo donde sus vectores (garrapatas y dípteros hematófagos) encuentran un hábitat ideal dadas las condiciones climáticas que garantizan su evolución durante todas las épocas del año. (Alcaraz, 1999, p.2)

En áreas enzooticas bajo condiciones ideales la sola presencia de *Boophilus-Babesia-Bovino*, conduce a una situación de equilibrio, de manera tal que prácticamente no ocurren brotes de la enfermedad en los animales nativos. La interrelación entre los interrogantes del sistema es compleja y con relativa facilidad puede alterarse este equilibrio. El hombre no está exento de responsabilidades en la ruptura del equilibrio enzootico porque con la intención permanente de incrementar la productividad, suele aplicar medidas de manejo que contribuyen a incrementar aún más el desequilibrio.

2.4.4.1.Aplicación de principios epidemiológicos en el control de la babesiosis y anaplasmosis.

En lugares donde se producen cambios en la población de vectores eventualmente puede producirse inestabilidad enzootica. La aplicación de medidas de control para prevenir la ocurrencia de babesiosis y/o anaplasmosis debe estar sustentada por un estudio del estatus epidemiológico en la población de animales susceptibles.

Si bien se dispone de quimioterápicos de reconocida eficacia para el tratamiento de babesiosis y/o anaplasmosis los mejores resultados se obtienen cuando el animal enfermo es medicado en la faz inicial del proceso, aunque esto no evita que pierda una considerable cantidad de kilos, que según observaciones realizadas en casos de babesiosis alcanza hasta un 12% del peso del animal. La prevención es un medio eficaz para reducir la incidencia de estas dos enfermedades. (Vanzini & Ramirez, 1994)

El organismo tiene una distribución geográfica en todo el mundo y es endémica en las regiones superiores del Medio Oeste, Este, y del noreste de los Estados Unidos, así como las regiones costeras occidentales. Países europeos como el Reino Unido, Noruega, Suecia, Suiza y Alemania también han informado de infecciones en los rumiantes, perros y personas.

La enfermedad se ha reportado con menor frecuencia en Asia y América del Sur. En los Estados Unidos, la mayoría de los brotes de enfermedades son estacionales y coinciden con la aparición de vectores de garrapatas en primavera y principios del verano (mayo y junio) y luego otra vez en el otoño (septiembre).

2.4.5. Inmunidad.

Hay una respuesta inmune del huésped hacia la infestación por garrapatas que se manifiesta de diferentes maneras. La principal expresión del bovino es el rechazo al establecimiento de las larvas en las primeras 24 horas de vida parasitara. El grado de inmunidad contra las garrapatas se manifiesta por la eliminación y no por la destrucción de estas.

El mecanismo inmunológico está relacionado con una enzima identificada en *Boophilus mircoplus* y que es secretada en la piel del huésped de la primera hora de ataque y que es neutralizada por huésped que ha tenido previa infestación. Hay una reacción de hipersensibilidad inmediata en el ganado a la reinfección, con intensa irritación por las larvas, además hay una reacción papular contra las ninfas y los adultos en el ganado “resistente” que

hace que se incrementen los niveles de histamina cuando se encuentra sometido a una infestación.

La saliva de las garrapatas adultas *Boophilus microplus* es capaz de incrementar la permeabilidad capilar, uno de los componentes activos de la saliva es una prostaglandina. Hay dos tipos de respuesta, la primera es física debido a la irritación que causa la picadura y la segunda que es la inhibición de la alimentación; las dos pueden ser manifestaciones de la respuesta inmune. Se ha demostrado que la inmunidad a las garrapatas es humoral pudiendo transferirse, además hay anticuerpos fijadores del complemento. Los linfocitos B son los que más intervienen y en menor grado los T. La concentración de gammaglobulina aumenta después de la infestación con *Boophilus microplus* en el ganado por inmunofluorescencia se demuestran anticuerpos específicos y no específicos en las glándulas salivales de garrapatas hembra.

Los anticuerpos específicos aumentan después de la infestación, se mantienen un tiempo y declinan después de algunos meses de que la infestación ha terminado. Todavía se necesita más información sobre la inmunidad a las garrapatas que permita en un futuro contar con vacunas capaces de proteger contra la infestación. (Quiroz, 1990, p. 789)

2.4.6. Signos Clínicos.

La severidad de los casos clínicos está relacionada con la edad, pero las vacas afectadas agudamente mostraran los siguientes signos:

- Rápida pérdida de la condición corporal
- Fiebre pasajera (40 °C-41 °C en el pico de la infección)
- Debilidad y problemas respiratorios particularmente después del ejercicio.
- Depresión y pérdida del apetito.
- Mucosas pálidas (anemia) y amarilla (ictericia).

- La orina es frecuentemente café debido a los pigmentos biliares en contadas ocasiones puede ser roja como en babesiosis.
- Animales severamente afectados pueden morir. (Benavides, Romero, & Villamil, 2016)

2.4.6.1.Fase aguda.

El primer signo clínico es la fiebre de hasta 41ºC, seguida de anorexia, depresión, debilidad muscular e ictericia.

2.4.6.2.Fase hiperaguda.

En esta fase ocurre una pérdida dramática de peso, presencia de abortos, fallo cardiopulmonar y muerte, debido a que el 90% de los eritrocitos están infectados, > 108 eritrocitos infectados por mL (Keiser, Eriks, & Palmer, 1990).

2.4.6.3.Fase crónica.

Los animales que sobreviven a la fase hiperaguda disminuyen drásticamente la parasitemia, luego de varias semanas los valores hematológicos vuelven a la normalidad. El ganado recuperado puede permanecer infectado persistentemente con bajos niveles de parasitemia, a estos animales se los conoce como “portadores asintomáticos de la enfermedad”, en esta fase es difícil de diagnosticar la enfermedad por los métodos tradicionales. (Coronado, 2001)

2.4.7. Diagnóstico.

El diagnóstico de una infestación en el ganado es relativamente sencillo si la cantidad de parásitos es elevada. Ahora bien, si se desea un diagnóstico cualitativo es necesario recolectar las garrapatas y realizar su identificación morfológica. A nivel general para un veterinario clínico es suficiente con la identificación del género, la identificación especifica requiere generalmente de personal especializado. (Quiroz, 1990, p. 791)

El control de la anaplasmosis, necesita de métodos de diagnóstico que permitan conocer la prevalencia del microorganismo en las diferentes zonas de los países tropicales y subtropicales, además que permitan identificar de forma segura los animales portadores para el movimiento de animales a zonas libres del hemoparásito.

El diagnóstico diferencial de fiebre, anemia hemolítica aguda e *icterus* en el ganado adulto incluye *babesiosis, eperytrozoonosis, theileriosis, leptospirosis,* hemoglobinuria bacilar, hemoglobinuria postparto, toxicidad por plantas y ántrax. La ausencia de hemoglobinuria en caso de anemia aguda, apoyada por la identificación del eritrocito parasitado, diferencia estas otras enfermedades hemolíticas de la anaplasmosis clínica.

El diagnóstico de la anaplasmosis se dificulta debido fundamentalmente a lo difícil de detectar los animales portadores, ya que no hay síntomas clínicos que lo diferencien de los bovinos no infectados, y los cuerpos de inclusión dentro de los glóbulos rojos no son lo suficientemente numerosos como para ser detectados por los métodos tradicionales. (Corona Gonzáles, y otros, 2014)

2.4.7.1.Técnicas empleadas

2.4.7.1.1. Métodos directos.

Estándar de oro: para detección de animales persistentemente infectados, consiste en la subinoculación de eritrocitos infectados con *A. marginale,* en animales susceptibles esplenectomizados. Sin embargo, este procedimiento no es práctico en las pruebas de rutina por la manipulación quirúrgica que conlleva y porque proporciona poca información sobre los niveles de parasitemia.

Visualización al microscopio de frotis de sangre teñidos con Giemsa: Es el método más común para la identificación de *A. marginale* en animales con infección clínica. Sin embargo, cuando el animal está en la fase crónica o en el estadio del portador no expresa un elevado nivel

de parasitemia como para ser detectado por la tinción. Este es un método confiable, barato y capaz de detectar niveles de parasitemia de 0.1 a 0.2 %, o sea, solo puede detectar niveles mayores a 10 eritrocitos infectados por mililitro de sangre, además resulta tedioso, no apropiado para un gran número de muestras e incapaz de discernir con facilidad cuando el eritrocito está invadido por *A. marginale* o por *A. centrale.* (Visser & Ambrosio, 1987)

Hibridación de ácidos nucleicos: constituye una prueba sensible y específica para el diagnóstico. En el diagnóstico de *A. marginale* se han utilizado sondas de ADN genómico y recombinantes, basadas en ADN o ARN, pero en ocasiones la limitada sensibilidad diagnostica de la sonda no permite la detección de portadores sanos con muy bajo nivel de parasitemia. (Shompole, Waghela, Rurangirwa, & McGuire, 1989)

La sensibilidad de este ensayo resulto útil para la detección de niveles de infección en garrapatas y para la identificación de ganado persistentemente infectado, además de determinar la prevalencia e incidencia de garrapatas infectadas en áreas enzooticas. (GoffW, y otros, 1988)

Reacción en cadena de la polimerasa: la sensibilidad y especificad del PCR resultan de gran valor para la identificación de patógenos. Esta permite comprobar la presencia de la rickettsia en muestras de tejido sanguíneo y tisular de bovinos y garrapatas respectivamente. (Corona & Martínez, 2011) realizaron la detección de *Anaplasma marginale* en bovinos sin síntomas clínicos por PCR del gen msp5 de este hemoparásito.

2.4.7.1.2. Métodos indirectos

Ensayos serológicos: son de gran importancia para estudios epidemiológicos con el objetivo de caracterizar áreas de estabilidad e inestabilidad enzootica. La aplicación de etas pruebas resulta relevante en lugares donde se practique el control intensivo de garrapatas, en los centros de inseminación y transferencia de embriones, así como en los lugares donde

se produzcan animales de elite o reproductores puros, relacionados también con la industria lechera.

(Organizacion Mundial de Salud Animal (OIE), 2008) indica que, dentro de un diagnóstico serológico incluye pruebas como: fijación de complemento, aglutinación en tubos capilares, aglutinación rápida en tarjeta, ensayos de IFI, y las pruebas de Dot-ELISA y ELISA. Las pruebas como fijación de complemento y aglutinación en tarjeta, fueron los métodos más comúnmente utilizados para detectar animales infectados con *A. marginale* en el campo y son aceptados para el movimiento de animales a nivel internacional. (p.5)

Algunos de estos ensayos para la detección de anticuerpos utilizan antígenos crudos obtenidos de *A. marginale* parcialmente purificado, lo que provoca que se pierda la sensibilidad y especificidad que se requiere para un diagnóstico eficaz. (Corona Gonzáles, y otros, 2014)

Fijación de complemento: el antígeno consiste en anticuerpos de Anaplasma que se han separado del eritrocito por lisis. Este ha sido uno de los métodos más utilizados para detectar animales infectados con *A. marginale* en el campo. Sin embargo, existen evidencias de que su sensibilidad es baja y tiene errores por su limitada habilidad para detectar bajos niveles de anticuerpos. Puede ser utilizada como prueba de monitoreo, pero no para los programas de erradicación, ya que muchos animales infectados pueden ser diagnosticados como negativos, pero no es capaz de detectar anticuerpos contra A. marginale en animales portadores. (McElwain, 2000)

Existen otras desventajas entre las que se encuentran la complejidad y laboriosidad que requiere y la baja especificidad y sensibilidad diagnostica, sobre todo en países donde hay presente enfermedades hemoprotozoarias. (Palmer GH, Barbet , Kuttler, & McGuirre, 1986)

Pruebas de aglutinación: se ha descrito dos pruebas de aglutinación: en tubos capilares y la aglutinación rápida en placa. Esta técnica puede ser desarrollada en el laboratorio o en el campo, dando el resultado en muy pocos minutos, pero existe un gran problema con las reacciones no específicas. Sn embargo, algunos autores recomiendan la prueba de aglutinación en tarjeta, como un ensayo que todavía tiene utilidad en algunas situaciones debido a su bajo costo, sencillez técnica, y la rapidez de los resultados. (Fosgate , y otros, 2010)

Inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos (IFI): Esta prueba se ha utilizado para el diagnóstico de anaplasmosis y frecuentemente se ha considerado una prueba sensible; sin embargo, por sus características en ocasiones se considera no útil, pues pueden ocurrir reacciones falsas positivas, que se atribuyen al largo periodo de incubación de esta enfermedad.

2.4.7.2. Procedimiento del ensayo empleado: Ensayo de inmuno absorbente ligado a enzimas ELISA.

Es un ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas (ELISA) competitivo para la detección de anticuerpos específicos de Anaplasma en muestras de suero bovino. Está destinado a proporcionar resultados que orienten sobre la presencia de la infección por Anaplasma en especies bovinas. Dicho marcador puede ser un anticuerpo, una hormona, un péptido o una proteína.

El principio de la prueba es el siguiente: Los anticuerpos del suero de muestra contra Anaplasma inhiben la unión de un anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) al antígeno de Anaplasma que recubre los pocillos de plástico. La unión, o la falta de unión, del conjugado de anticuerpo monoclonal marcado con HRP se detecta mediante

la adición de sustrato enzimático y se cuantifica mediante el desarrollo posterior del producto de color.

El desarrollo de un color intenso indica un bloqueo mínimo o nulo de la unión del anticuerpo monoclonal marcado con HRP y, por lo tanto, la ausencia de anticuerpos contra Anaplasma en la muestra de suero.

El desarrollo de color débil o nulo debido a la inhibición de la unión del anticuerpo monoclonal al antígeno en la fase sólida indica la presencia de anticuerpos contra Anaplasma en la muestra de suero. (Veterinary Medical Resarch and Development, 2021)

Aunque el principio básico de los ensayos ELISA es similar al de los Radioinmunoensayos (RIA) y se remonta a 1941 (Coons, Creech y Jones, 1941), en un RIA el antígeno o el anticuerpo de interés se marca con radiactividad, lo cual no ocurre en un ensayo ELISA, donde se utilizan enzimas en lugar de compuestos radiactivos para marcar las moléculas de interés. (Mathieu, 2019)

2.4.7.2.1. Procedimiento para realizar el ensayo.

- Análisis del ganado:
- Obtención de sangre de los animales mediante raspados cutáneos o extracción de sangre periférica.
- Preparación del método para la obtención de la muestra
- Distribución de la población ganadera.

2.4.8. Tratamiento.

Las tetraciclinas son el antibiótico de elección para tratar la enfermedad aguda. En la anaplasmosis aguda es eficaz la oxitetraciclina a dosis de 11mg/kg IV cada 24 horas durante 3

a 5 días. Una o dos administraciones IM de 20mg/kg de oxitetraciclina de acción prolongada a intervalos de 72 horas constituye también un tratamiento eficaz.

Además del tratamiento antibiótico es importante el tratamiento de soporte, si el hematocrito es menor del 12%, puede estar indicada la transfusión de sangre completa para evitar la muerte y acortar el periodo de convalecencia, suelen administrarse 4 a 8 litros de sangre completa a un animal adulto. (Hernández Cordova, 2016, p.21)

Hospedero definitivo: *Anaplasma marginale* ha sido reportado en rumiantes como el búfalo de agua, ciervo de cola blanca, ciervo mulo, ciervo de cola negra y alce de las montañas rocosas, pero siendo más común en ganado bovino. En dichos animales se ha encontrado presencia de *A. marginale* como de *A. ovis* y se ha le da la importancia porque en estos puede perpetuar el ciclo biológico y pasar al ganado por diferentes vías como sangre contaminada, vías mecánicas y biológicas como picadura de garrapatas. (Duque Campuzano, 2017, p.17)

2.4.9. Control y prevención.

A pesar de la severidad de las pérdidas y de la amplia distribución de la enfermedad, no se ha logrado el control de esta, sobre una base sostenible; hasta la fecha no se cuenta con un procedimiento efectivo para el control en muchas áreas, a pesar del incremento de los portadores, animales susceptibles, vectores de transmisión y de las cuantiosas pérdidas económicas que provoca. Las medidas de control para la anaplasmosis no han cambiado marcadamente durante los últimos 50 años e incluyen el control de los artrópodos vectores mediante la aplicación de acaricidas, la quimioprofilaxis y la vacunación. (Soto, 2010, p.29)

La aplicación de acaricidas para eliminar el transmisor la garrapata, no es factible para muchos productores, por su elevado costo y su prolongado uso, crea una población de ganado susceptible, cuando se interrumpe la aplicación del acaricida y ocurre la resistencia a las

garrapatas. La vacuna recombinante Gavac permite una significativa mejora en el control de las poblaciones de garrapatas *Boophilus microplus*, en condiciones de campo, pero no tiene efecto para otras especies como *Amblioma spp*, también transmisoras de Anaplasmosis. (Coronado, 2001, p.3)

2.4.9.1.Recomendaciones para zonas libres.

- Identificar las características del ambiente que repercuten en la existencia de zona libre.
- Cuestionarse si han sucedido en el pasado brotes esporádicos de FG y discutir ¿qué los determinó y cómo se manejó?
- Cuestionarse cómo variables propias del sistema productivo (manejo y raza) hacen vulnerable el sistema de producción.
- Cuestionarse sobre la estabilidad de zona libre, de zona libre con ocurrencia esporádica o el riesgo de pasar a ser una zona de inestabilidad enzootica.
- Reflexionar sobre la cadena de impactos económicos, directos e indirectos, en la eventualidad del ingreso y establecimiento de garrapatas.
- Evaluar la probabilidad de ingreso de animales de áreas endémicas.
- Identificar si eventualmente se traen forrajes o henos de zonas endémicas.
- Cuestionarse si cambios en el clima pueden modificar las condiciones y favorecer el establecimiento de garrapatas, y si fuera así, evaluar probabilidades de ingreso de estas.

2.4.9.2.Recomendaciones para zonas endémicas.

- Determinar las variaciones del clima y definir cómo ellas pueden modificar el ciclo de vida de la garrapata.
- Realizar estudios respecto a la duración del ciclo de vida de la garrapata durante diferentes épocas del año.
- Ajustar las intervenciones de manejo de garrapatas a la duración del ciclo de vida de la garrapata, incorporando las variaciones por estacionalidad climática.

- Identificar las variables favorecedoras del sistema productivo para el establecimiento de garrapatas en exceso.
- Tomar especial atención a los componentes raciales y patrones individuales heredables. Incorporar esta variable en la selección genética.
- Entender el sistema productivo y determinar las variables que favorecen la presentación de FG (raza, edades, primo-exposición, rotación de potreros, sistemas de alimentación).
- Retomar, de forma estratégica, lo trabajado en el punto de partida sobre las estrategias actuales de manejo, así como su efectividad y limitantes. (Benavides, Romero, & Villamil, 2016, p.79)

2.5. RESUMEN DEL ESTADO DEL ARTE DEL ESTUDIO DEL PROBLEMA.

La anaplasmosis bovina es una enfermedad infecciosa, aguda a crónica, caracterizada por presentar anemia, ictericia y fiebre. El agente causante es una *Rickettsia, Anaplasma marginale*, que invade los glóbulos rojos produciendo luego la destrucción de estos. (Alcaraz, 1999)

Esta enfermedad se ubica principalmente en las zonas tropicales y subtropicales en la cual afecta a la mayoría de los animales que son susceptibles a ella. Dada la ubicación geográfica de nuestro país, estos hemoparásitos se encuentran ampliamente difundidos en zonas que observan condiciones climatológicas favorables para su desarrollo. (Sanchez, 1984)

Sano (2017) Nos dice que el ganado infectado que sobrevive a la anaplasmosis, por lo general se convierten en portadores de por vida y los reservorios de la enfermedad. Los antibióticos como la tetraciclina son un tratamiento efectivo para la anaplasmosis bovina.

El género Anaplasma (Rickettsiales: *Anaplasmataceae*) incluye especies importancia médica y veterinaria. *Anaplasma marginale* es la especie más importante que causa anaplasmosis bovina en América del Sur. Esta bacteria se transmite biológicamente por varias especies de garrapatas (principalmente de los géneros *Rhipicephalus, Dermacentor e Ixodes* y mecánicamente por moscas o fómites contaminados con sangre. (Corona Gonzáles, y otros, 2014)

Produce importantes pérdidas económicas por disminución en la producción de leche y ganancias de peso en engordas, abortos y muertes y por los costos de tratamientos. El hombre también colabora en su transmisión, al emplear prácticas médico-zootécnicas carentes de higiene en donde se involucre contacto con sangre de bovinos. (Olguin y Bernal, 2007, p.2)

Benavides, Romero, & Villamil (2016) menciona que el estudio de la transmisión de *A. marginale* es de fundamental importancia para establecer un control efectivo de la enfermedad. Son amplias y muy variadas las formas en que puede transmitirse el parásito y dependen de la presencia de vectores (biológicos y mecánicos), la existencia de animales susceptibles y de condiciones ecológicas favorables.

Si bien se dispone de quimioterápicos de reconocida eficacia para el tratamiento de babesiosis y/o anaplasmosis los mejores resultados se obtienen cuando el animal enfermo es medicado en la faz inicial del proceso, aunque esto no evita que pierda una considerable cantidad de kilos, que según observaciones realizadas en casos de babesiosis alcanza hasta un 12% del peso del animal. La prevención es un medio eficaz para reducir la incidencia de estas dos enfermedades. (Vanzini & Ramirez, 1994)

Por su parte (Quiroz, 1990) señala que el diagnóstico de una infestación en el ganado es relativamente sencillo si la cantidad de parásitos es elevada. Ahora bien, si se desea un diagnóstico cualitativo es necesario recolectar las garrapatas y realizar su identificación morfológica. A nivel general para un veterinario clínico es suficiente con la identificación del género, la identificación especifica requiere generalmente de personal especializado.

Y para la detección de *Anaplasma marginale* (Veterinary Medical Resarch and Development, 2021) El kit de prueba de anticuerpos contra Anaplasma, cELISA, es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (cELISA) competitivo para la detección de anticuerpos específicos de Anaplasma en muestras de suero bovino. Está destinado a proporcionar resultados que orienten sobre la presencia de la infección por Anaplasma en especies bovinas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales.

3.1.1. Materiales físicos de campo.

Tabla 1. *Equipos físicos de campo.*

DESCRIPCÓN	CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA
Bretes	1	Unidad
Narigueras	1	Unidad
Sogas	2	Unidad
Agujas vacutainer 20G	200	Unidad
Guantes	2	Caja
Algodón	1	Caja
Alcohol	1	Litro
Tubos vacutainer –	200	Unidad
Etiquetas	200	Unidad
Cooler	1	Unidad
Overol	1	Unidad

3.1.2. Material biológico de campo.

Tabla 2. *Equipos biológicos de campo.*

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD
Bovinos	188

3.1.3. Material de laboratorio.

Tabla 3. *Equipos físicos de laboratorio.*

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA
Papel	1	Rollo
Tubos eppendorf	1	Caja
Gradilla de laboratorio	3	Unidad
Temporizador	1	Unidad
Botella de lavado	1	Unidad
Pipetas	2	Unidad
Jeringas	1	Unidad
Lector de ELISA	1	Unidad

Tabla 4. *Equipo personal de laboratorio.*

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA
Mandil	1	Unidad
Cofia	1	Unidad
Guantes	2	Caja
Mascarilla	1	Unidad

3.1.4. Material químico.

Tabla 5. *Material químico de laboratorio.*

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA
Kit ELISA	1	Unidad
Alcohol etílico	1	Litro

Tabla 6. *Material biológico de laboratorio.*

DECRIPCIÓN	CANTIDAD
Sangre de bovinos	188

3.1.5. Materiales de oficina.

Tabla 7. *Materiales de oficina.*

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA
Hojas de papel bond	1	Resma
Esferos	1	Unidad
Hojas de registro	1	Unidad
Carpeta	1	Unidad
Cinta adhesiva	1	Unidad
Laptop	1	Unidad
Tinta de impresión	1	Unidad

3.2.METODOLOGÍA

Este trabajo de investigación corresponde a un estudio epidemiológico de tipo descriptivo, prospectivo de corte transversal y causal, ya que en primera instancia se determina la presencia de los anticuerpos para el agente etiológico y luego se calcula la prevalencia en la población de estudio.

El proceso experimental contará con 188 muestras de sangre extraídas de bovinos del cantón Santa Isabel, cuyo proceso analítico se realizará en los laboratorios de ciencias de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana.

3.3.Proceso de la investigación.

3.3.1. Selección de los animales.

Los animales fueron elegidos en fincas de pequeños productores pertenecientes al cantón Santa Isabel de la provincia del Azuay, tomando en consideración la edad, el sexo y el sector al que pertenecen. Los animales seleccionados fueron aquellos que demostraron infestación por garrapatas y signos clínicos que correspondan aparentemente a la presencia de *Anaplasma Marginale.*

3.3.2. Recolección de las muestras.

- Limpieza y desinfección del área.
- Extracción de sangre a través de la vena coccígea/yugular aproximadamente 5 ml por animal con aguja calibre 18G con la ayuda de personal capacitado y personas del lugar.
- Se colocó la muestra en tubos vacutainer sin anticoagulante y posteriormente se dejó a temperatura ambiente hasta la formación del coagulo.
- Se identificó cada muestra con su respetivo número, la edad del animal, sexo y el sector.

- Posteriormente se refrigeró las muestras en un cooler con geles a temperatura de aproximadamente 5°C.

3.3.3. Proceso de laboratorio.

Después de la recolección de muestras, se realizó la centrifugación de estas en los laboratorios pertenecientes al cantón Santa Isabel a 2500 rpm durante aproximadamente 3 minutos hasta la obtención del suero bovino.

A partir de la obtención del suero bovino, las muestras fueron congeladas a una temperatura de aproximadamente -20°C hasta su uso en la prueba comercial de ELISA (*Anaplasma* antibody test kit ELISA v2; VMRD Inc.; Pulman, WA.)

El proceso y diseño experimental se realizó en los laboratorios de ciencias de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana de Cuenca.

3.3.3.1.Principios del ensayo para el Kit ELISA competitivo.

El principio de la prueba es el siguiente: Los anticuerpos del suero de muestra contra Anaplasma inhiben la unión de un anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) al antígeno de Anaplasma que recubre los pocillos de plástico.

La unión, o la falta de unión, del conjugado de anticuerpo monoclonal marcado con HRP se detecta mediante la adición de sustrato enzimático y se cuantifica mediante el desarrollo posterior del producto de color.

El desarrollo de un color intenso indica un bloqueo mínimo o nulo de la unión del anticuerpo monoclonal marcado con HRP y, por lo tanto, la ausencia de anticuerpos contra Anaplasma en la muestra de suero.

El desarrollo de color débil o nulo debido a la inhibición de la unión del anticuerpo monoclonal al antígeno en la fase sólida indica la presencia de anticuerpos contra Anaplasma en la muestra de suero.

3.3.3.2.Almacenamiento y estabilidad del kit.

Se almacenará todos los reactivos a 2-7 °C. No se deberá congelar. Los reactivos permanecerán estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenen según las instrucciones. No usará el kit de prueba después de la fecha de vencimiento impresa en la caja. La preparación, precauciones y todo el protocolo a usar será el descrito por el fabricante.

3.3.3.3.Interpretación de los resultados.

- Las muestras de prueba que tienen <30% de inhibición son negativas
- Las muestras de prueba que tienen ≥ 30% de inhibición son positivas

3.4.Selección y tamaño de la muestra.

El proceso experimental contó con 188 muestras de sangre extraídas de bovinos del cantón Santa Isabel y sus sectores aledaños cuyo proceso analístico se realizó en los laboratorios de ciencias de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana.

Se estableció un muestreo aleatorio simple (MAS), considerando un tamaño mínimo de la muestra (TMM) con un cálculo de prevalencia estimada de un 13% con un margen de error de 5% y un nivel de confianza de 95% en cada uno de los campos respectivos; dándonos como resultado un total de 188 muestras a obtener.

Para el análisis de los resultados se han considerado parámetros tales como: edad, sexo, y sector al cual pertenecían, siendo la información registrada en una ficha de identificación clínica. Para el cálculo de la prevalencia de *Anaplasma Marginale* se utilizó la fórmula de MAS (muestreo aleatorio simple) para poblaciones infinitas o no conocidas:

$$n = \frac{Z^2 p\, q}{d^2} = \frac{(1.96)^2(0.13)(0.87)}{(0.05)^2} = 174$$

Donde:

Z: nivel de confianza 95%: (1.96)2

P: probabilidad de prevalencia 13%: (0.13)

Q: 1-p: (0.87)

D: error estimado 5%: (0.05)

Dentro del cálculo para el TMM el número de animales a evaluar fue de un total de 174 bovinos, para los cuales dentro del rango de estudio y trabajo de investigación se tomó en cuenta la posibilidad de 14 animales más para un muestreo total de 188 animales.

Tuvo una duración de 4 meses: desde la aceptación del proyecto de investigación, dividiendo las mismas en trabajo de campo y de laboratorio.

3.4.1. Toma de muestra.

Se tomó dos muestras de sangre por animal, mediante punción de la vena coccígea; a partir de la cual fueron sometidas a partir del uso del kit ELISA competitivo, mediante la sustracción de suero de sangre bovino.

3.4.2. Descripción del procedimiento.

3.4.2.1.Toma de muestra de vena coccígena.

- Requiere restricción mínima, es posible realizarla sin ayudante y tiene un menor riesgo de accidentes e infecciones.
- Rotular o identificar el tubo.

- Sujetar la cabeza en un brete o corral con una la ayuda de un cabezal, o lazos.
- Lavarse las manos.
- Colocarse los guantes.
- Levantar la cola del animal con suavidad hasta casi colocarla casi en posición vertical, sujetándola en el tercio medio.
- Retirar los residuos de materia fecal y limpiar la zona con papel o algodón.
- Con la mano libre localizar por palpación la vena en la línea media, justo caudal de la inserción de los pliegues de la piel de la cola a nivel del espacio entre las vértebras coccígeas 6 - 7.
- Realizar antisepsia con alcohol 70% o con Yodo povidona al 10%, en una zona de piel de unos 10 cm de diámetro alrededor del sitio de punción. Se comienza por el centro y se irán haciendo círculos concéntricos hacia el exterior. Dejar actuar 1-2 minutos,
- Desinfectar el tapón de goma del tubo con alcohol 70%.
- Empatar la aguja en la funda o camisa.
- Encajar el tubo en la funda o camisa sin perforarlo
- Insertar la aguja craneal a la protuberancia ósea del proceso laminar en la línea media a una profundidad de 8- 12 milímetros en ángulo recto, hasta que la sangre empiece a brotar. Si no es posible obtener la muestra en este sitio, intentar entre Co 5-6.
- Estabilizar la funda y la aguja con la mano, colocar el pulgar de la otra mano en la parte inferior del tubo y los dedos índice y medio en las aletas de la funda.
- Presionando con el pulgar y el dedo índice el uno contra el otro, se forzará al tapón de goma, introduciendo la aguja en el tubo. La sangre fluirá dentro del mismo.
- Mantener la funda estable, hasta consumir todo el vacío y retirar el tubo.
- Sin retirar la aguja, encajar el segundo tubo en la camisa y obtener a segunda muestra.
- Mantener la funda estable, hasta consumir todo el vacío y retirar el tubo.

- Retirar la aguja y ejercer presión sobre la zona de punción con gasa por unos segundos.
- Dejar reposar los tubos con las muestras respectivas de sangrre hasta formar el coagulo.
- Desechar las agujas en el guardián, y el resto de materiales contaminados en la bolsa roja.
- Quitarse los guantes. (Zambrano, 2016)

3.4.2.2.Procedimiento para la deteccion de Anaplasma en ganado bovino.

Materiales:

- Muestra suero de sangre bovina.
- ANAPLASMA ANTIBODY TEST KIT, cELISA v2
- Contenido del kit

Componentes
A Placas recubiertas de antígeno 2 placas
B Control positivo 3,6 ml
C Control negativo 3,6 ml
D 100X Anticuerpo-peroxidasa Conjugado 0,3 ml
E Tampón diluyente de conjugado 30 ml
F 10X Solución de lavado concentrada 120 ml
G Solución de sustrato 30 ml
H Solución de parada 30 ml
Este prospecto

Materiales necesarios, pero no incluidos en el kit de prueba: Pipetas de volumen ajustable de uno o varios canales y puntas de plástico desechables, tubos de ensayo o placas de transferencia no recubiertas de antígeno, espectrofotómetro de absorbancia de microplacas

ELISA con filtro de 620, 630 o 650 nm, desionizado o agua destilada, toallas de papel, cilindro graduado, temporizador, depósitos de pipeta multicanal, botella de lavado, dispositivo de lavado manual multicanal o lavador automático de placas.

3.4.2.3.Preparación.

- Reactivos calientes: Llevar las muestras de suero, los reactivos y las placas a temperatura ambiente (23 ± 2 ° C) antes de comenzar la prueba.
- Preparar los controles y las muestras: Cargar el control positivo (B) por duplicado y el control negativo (C). por triplicado independientemente del número de muestras de suero a analizar. Cuando se utilizan placas enteras, es mejor colocar los controles en pozos en diferentes áreas de la placa. Los controles deben cargarse en cada plato. Las muestras de suero y los controles se analizan sin diluir.
- Preparar las placas: Retire las placas de la (s) bolsa (s) de aluminio (A). Si es aplicable: devolver las tiras sin usar a la bolsa y séllela de manera segura. VMRD ofrece bolsas adicionales y sellador. Colocar las tiras que se utilizarán en el marco y numere la parte superior de cada tira para mantener la orientación. Marque siempre las tiras en caso de que se salgan del marco durante el lavado.
- Preparar el conjugado: Preparar 1X Anticuerpo-Peroxidasa Conjugado diluyendo 1 parte del 100X Anticuerpo- Conjugado de peroxidasa (D) con 99 partes de tampón de dilución de conjugado (E). Ejemplo: Para 96 pocillos, mezcle 60 µl de conjugado de peroxidasa de anticuerpo 100X (D) con 5.940 ml de tampón de dilución de conjugado (E) para obtener 6 ml de conjugado de peroxidasa de anticuerpo 1X. Se necesitan cincuenta microlitros (50 µl) por pocillo.
- Preparar la solución de lavado: Preparar la solución de lavado 1X diluyendo 1 parte del concentrado de solución de lavado 10X (F) con 9 partes de agua desionizada o destilada.

Se necesitan aproximadamente 1,5 ml por pocillo. Dejar una cantidad adicional para depósitos, tubos, pipeteo, etc.

3.4.2.4.Test de procedimiento.

- Cargue los controles y las muestras de suero: Con una pipeta ajustada a 50 µl, transfiera los controles y las muestras de suero a la placa recubierta de antígeno (A). Las muestras de suero y los controles deben cargarse en la placa recubierta de antígeno (A) lo más rápido posible.
- Cuando se procese más de dos tiras, se recomienda que las muestras de suero y los controles se carguen primero en una placa de transferencia y luego se transfieran a la placa recubierta con antígeno (A) utilizando un equipo de pipeteo multicanal.
- El volumen de muestra en la placa de transferencia no debe exceder los 50 µl para transferir 50 µl de ella. Golpee el lateral de la placa de ensayo cargada varias veces para asegurarse de que las muestras cubran el fondo de los pocillos. Tenga cuidado de no derramar muestras de un pozo a otro. Incube la placa 1 hora a temperatura ambiente (23 ± 2 ° C).
- Lavar los pocillos: Después de la incubación de 1 hora, lavar la placa 2 veces: Si se utiliza un lavador automático, coloque la placa en el aparato de lavado y lave la placa 2 veces, llenando los pocillos cada vez con 1X WashSolution.
- Se utiliza, vacíe el contenido del pocillo y retire los sueros y controles restantes golpeando bruscamente la placa invertida 4 veces en una toalla de papel limpia, golpeando un área limpia cada vez.
- Llene inmediatamente cada pocillo con 1XWash Solution utilizando un dispositivo de llenado multicanal o una botella de lavado. Vacíe la solución de lavado de la placa y golpee la placa invertida bruscamente sobre una toalla de papel limpia como se indicó

anteriormente. Llene y vacíe la placa con el mismo método1 tiempo adicional para un total de 2 lavados.

- Añadir conjugado: Añada 50 µl de conjugado de anticuerpo-peroxidasa diluido (1X) a cada pocillo. Golpee el lateral de la placa de ensayo cargada varias veces para asegurarse de que el conjugado cubra el fondo de los pocillos. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente (23 ± 2 ° C) .
- Lavar los pocillos: Después de la incubación de 20 minutos, lavar la placa 4 veces como se describe en el Paso 2
- Añadir solución de sustrato: Añada 50 µl de Solución de sustrato (G) a cada pocillo. Golpear el lateral de la placa de ensayo cargada varias veces para asegurarse de que el sustrato cubra el fondo de los pocillos. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente (23 ± 2 ° C).
- Evitar dejar la placa a la luz solar directa.
- No vaciar los pocillos.
- Añadir solución de parada: Añada 50 µl de solución de parada (H) a cada pocillo. Golpee varias veces el lateral de la placa de ensayo cargada para mezclar la solución de sustrato y la solución de parada. No vacíe los pozos.
- Lea y registre los resultados de la prueba: Inmediatamente después de agregar StopSolution, la placa debe leerse en un espectrofotómetro de absorbancia de microplaca. Establezca la longitud de onda de lectura de densidad óptica (OD) en 620, 630 o 650 nm y lea las placas. Algunos lectores requieren un pocillo vacío en la placa para tapar. En este caso, no se deben agregar reactivos a este pozo.
- Devuelva todos los reactivos restantes del kit a 2-7 ° C para su almacenamiento.

3.4.2.5. Cálculo del% de inhibición (% I):

- % I = 100 [1- (DO de la muestra ÷ DO del control negativo)] Validación de la prueba

- La media de los controles negativos debe tener una densidad óptica> 0,40 y ≤ 2,10.
- La media de os controles positivos deben tener una inhibición ≥ 30%.

3.4.2.6.Precauciones.

Los componentes del kit deben manipularse y desecharse como potencialmente peligrosos. No coma, beba ni fume donde se manipulen las muestras de suero y los reactivos del kit. No pipetear con la boca. Algunos reactivos pueden ser dañinos si se ingieren. Si se ingiere, busque atención médica. No utilice reactivos caducados o contaminados, ni reactivos de otros kits o series. No mezcle reactivos de diferentes series de este mismo producto.

El componente B, control positivo, contiene azida de sodio como conservante; el componente C, control negativo, contiene azida de sodio como conservante; el componente D, conjugado de anticuerpo-peroxidasa 100X, contiene ProClin 300, metilisotiazolona, bromonitrodioxano y timerosal como conservantes, Tampón de dilución conjugado, contiene ProClin 300 como conservante. Componente H, solución de parada, contiene fluoruro de sodio.

3.5.Toma y registro de datos.

Las muestras se obtuvieron en criaderos, haciendas y micro productores ganaderos que se encuentran en las localidades antes mencionadas de las cuales se obtuvieron un total de 188 muestras, estas fueron registradas de acuerdo con su edad, sexo y sector al que pertenecieron.

Estas muestras se obtuvieron mediante la sustracción de sangre a través de la vena coccígea del animal, dichas muestras fueron colocadas en tubos de ensayo sin (EDTA), rotuladas y etiquetadas correctamente con el animal al que perteneció.

Después fueron guardadas correctamente y llevadas al laboratorio de Ciencias de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana en las cuales fueron evaluadas determinando el agente infeccioso, los datos obtenidos de dicha evaluación fueron registrados y finalmente interpretados con la posibilidad de la existencia o no de la incidencia de anaplasmosis bovina.

3.6.DISEÑO ESTADÍSTICO.

En el presente trabajo de investigación, el diseño estadístico empleado fue el análisis descriptivo-prospectivo de corte transversal y causal, el cual fue diseñado para estimar la prevalencia de anaplasmosis en muestras sanguíneas extraídas a través de suero bovino del cantón Santa Isabel y sus alrededores.

3.7.OPERALIZACIÓN DE VARIABLES.

Tabla 8. *Variables independientes (bovinos).*

CONCEPTO	CATEOGORIA	INDICADORES	INDICE
Condiciones de un bovino aparentemente sano.	Biológica	Hembra	Numérico
		Macho	Numérico

Tabla 9. *Variables dependientes (Anaplasmosis).*

CONCEPTO	CATEGORIA	INDICADORES	INDICE
Microorganismo rickettsial que invade los eritrocitos de rumiantes, causando esta enfermedad denominada *Anaplasma Marginale.*	biológica	Identificación mediante kit de enzimoinmuno ensayo de absorción ELISA	Numérico

3.8.PROCEDIMIENTO.

El estudio se realizó en el Cantón Santa Isabel y sus sectores aledaños, donde se sustrajeron 188 muestras de sangre periférica obtenida a través de la vena coccígea de los bovinos.

Sumando a esto el procedimiento de selección fue aleatoria, considerando factores como la edad, el sexo y del sector de donde provenían, con su respectiva ficha clínica con registro de datos y sangre.

Antes de realizar la sustracción de sangre y rotulado, a los animales se los trató con métodos de sujeción evitando estrés en el animal ya que puede conllevar a una alteración de la muestra.

Después de la extracción de sangre, la muestra se guardó correctamente en un cooler refrigerado evitando la alteración y daño de la muestra, para llevarlo con destino final a los

laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana, con el fin de ser evaluados y analizados correctamente.

Para evaluar si existe o no la presencia de la enfermedad se analizó mediante la técnica de ELISA competitivo como prueba de confiabilidad para la detección de la enfermedad.

3.8.CONSIDERACIONES ÉTICAS.

Para el desarrollo de la presente investigación se contempla los siguientes aspectos éticos de Bienestar animal como eje fundamental. Al tratar de encontrar el agente causal de la molestia que presenta el paciente, evitando al máximo el estrés, fatiga u otras acciones que puedan deprimir aún más al paciente.

Ética profesional: la búsqueda constante de nuevas técnicas y actualizaciones en la profesión de Medicina Veterinaria es vital para el mantenimiento de la competencia técnica profesional, la mejora continua de su práctica y bienestar animal.

Asepsia: El lugar en donde se toman las muestras debe contar con las condiciones previstas en el reglamento interno de Establecimientos Clínicos y en todo caso garantizar la asepsia requerida para cualquier procedimiento quirúrgico.

Reglamento general de la ley orgánica de sanidad agropecuaria: Dentro los artículos de bienestar animal aplicados por la Ilustre Municipalidad de Cuenca establecen ciertos puntos de acuerdo con actividades de investigación y bienestar animal.

- Capitulo X del Bienestar Animal.

  SECCIÓN I

  Establecimiento de normas de bienestar animal.

  Art. 242.- Del Establecimiento de Normas y Bienestar Animal. - Para la regulación de los estándares de bienestar animal, la Agencia coordinará con profesionales expertos en el

tema, quienes representarán a las diferentes etapas de la cadena de producción pecuaria, teniendo en cuenta una base científica, los costos y el tiempo que implica ejecutar las mejoras pertinentes y que provendrán de los siguientes sectores:

1. Autoridad Agraria Nacional;

2. Entidades de educación superior;

3. Organizaciones de productores pecuarios, legalmente constituidos;

4. Centros de faenamiento públicos y privados legalmente establecidos;

5. Empresa privada;

6. Asociación de Municipalidades del Ecuador;

7. Consumidores; y,

8. Los demás actores que, en virtud de la temática específica, sean convocados por la Agencia.

SECCION III.

De la regulación para actividades de investigación.

Art. 244.- De la regulación para actividades de investigación, educación, recreación y actividades culturales en el ámbito de bienestar animal. - Para la regulación de la utilización de animales para actividades de investigación, educación, recreación o actividades culturales, la Agencia tomará como base los lineamientos internacionales que en la materia de bienestar animal ha establecido la Organización Mundial de Sanidad Animal.

Art. 245.- De la utilización de animales en actividades de educación e investigación.- La utilización de animales para estos fines tendrá lugar cuando, en virtud de actividades de educación y/o investigación, se busque verificar una hipótesis científica, probar un producto

natural o sintético, producir sustancias de uso médico o biológico, realizar demostraciones docentes, efectuar intervenciones quirúrgicas y, en general, estudiar y conocer el comportamiento de los animales, lo que deberá acogerse a los lineamientos que la Agencia establezca con este fin, los cuales estarán acorde a las normas establecidas por la Organización Mundial de Sanidad Animal.

Art. 246.- De los Estudios de Investigación con Animales Vivos. - Los estudios de investigación con animales vivos deberán llevarse a cabo en instalaciones adecuadas acorde a la finalidad del estudio y por personal calificado entre los cuales deberá participar un médico veterinario que realice la toma de muestras, garantice la salud y el bienestar de los animales.

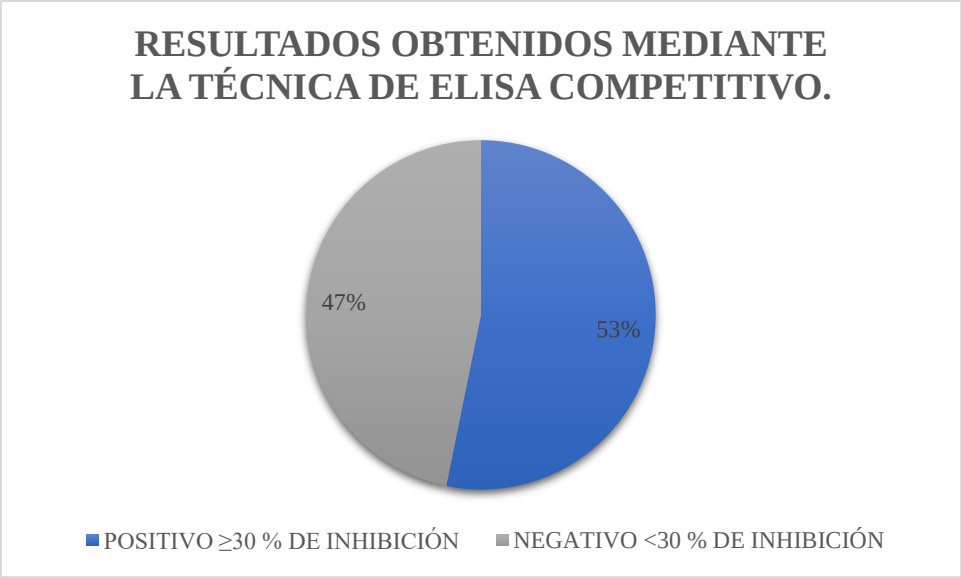
Art. 247.- Del Comité de Ética. - Las instituciones de educación superior y empresas que utilicen animales con fines educativos o de investigación deberán estructurar un comité de ética bajo los lineamientos y requisitos establecidos por la Agencia. Para la utilización de animales con fines de investigación y educación, se deberá contar con la aprobación previa del proyecto de investigación por parte del comité de ética para la investigación y educación con animales.

Art. 248.- Medidas de Bienestar Animal. - Las medidas de bienestar animal implementadas en la investigación y docencia deberán tener como base el manejo correcto según las pautas de comportamiento de la especie animal, bioseguridad y bioética. (LOSA, 2019)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.Resultados.

Figura 4. Resultados obtenidos mediante la técnica de ELISA competitivo.



Los resultados del estudio epidemiológico muestran que en las 188 muestras estudiadas se detectaron los siguientes resultados:

Tabla 10. *Prevalencia total de la enfermedad en base a la tabulación de datos.*

PREVALENCIA TOTAL	Frecuencia	Prevalencia	Límite inferior al 95%	Límite superior al 95%
NEGATIVO	88	46.81%	39.51%	54.21%
POSITIVO	100	53.19%	45.79%	60.49%
TOTAL	188	100,00%		

El umbral de positividad proporcionado por el kit es de ≥30 % de inhibición. Basándose en el estudio realizado mediante el método de ELISA competitivo, los resultados nos indican

que la prevalencia en el cantón Santa Isabel es de un 53.19% (100/188) de muestras positivas a la presencia de la enfermedad y un 46.81% (88/188) muestras negativas.

Tabla 11. *Presencia de Anaplasma marginale en bovinos muestreados según la edad mediante la técnica de ELISA.*

EDAD	Frecuencia	Prevalencia	Límite inferior 95%	Límite superior al 95%
TERNEROS(0-6meses)	1	1,00 %	0,03 %	5,45 %
TORETES(7-12meses)	49	49,00 %	38,86 %	59,20 %
VACAS(>25meses)	30	30,00 %	21,24 %	39,98 %
VACONAS(3-24meses)	20	20,00 %	12,67 %	29,18 %
TOTAL	100	100,00 %		

Para el estudio de la presencia de *Anaplasma marginale* en bovinos se dividieron los grupos de estudio de acuerdo a la edad; de 100 muestras positivas el 1% (1/100) pertenecen al grupo de terneros de 0 a 6 meses, el 49% (49/100) pertenecen al grupo de toretes de 7 a 12 meses de edad, el 20% (20/100) fueron vaconas mayores de 3 a 24 meses de edad y el 30% (30/100) vacas mayores a los 25 meses de edad.

Tabla 12. *Presencia de Anaplasma marginale en bovinos muestreados según la procedencia mediante el método ELISA.*

PROCEDENCIA	Frecuencia	Prevalencia	Límite inferior al 95%	Límite superior al 95%
CAÑARIBAMBA	31	31,00 %	22,13 %	41,03 %
CERCALOMA/YUNGUILLA	36	36,00 %	26,64 %	46,21 %
SULUPALI	24	24,00 %	16,02 %	33,57 %
TABLÓN	9	9,00 %	4,20 %	16,40 %
TOTAL	100	100,00 %		

En la presente tabla se toma en consideración la prevalencia de *Anaplasma marginale* en bovinos de acuerdo a la procedencia; donde se observa que el 31% (31/100) de bovinos positivos pertenecen al sector Cañaribamba, el 36% (36/100) al sector de Cercaloma, el 24% (24/100) al sector de Sulupali y el 9% (9/17) al sector de Tablón.

Según los datos obtenidos se puede observar que la prevalencia del vector es mayor en el sector de Cercaloma seguido por el sector de Cañaribamba; es importante tomar en consideración que en Cercaloma el número de muestras obtenidas es menor en comparación con Cañaribamba sin embargo la prevalencia es mayor debido a que las condiciones climatológicas son más favorables.

Tabla 13. *Presencia de Anaplasma marginale en bovinos muestreados según el sexo mediante el método ELISA.*

SEXO	Frecuencia	Prevalencia	Límite inferior al 95%	Límite superior al 95%
HEMBRA	50	50,00 %	39,83 %	60,17 %
MACHO	50	50,00 %	39,83 %	60,17 %
TOTAL	100	100,00 %		

La prevalencia de la enfermedad de acuerdo al sexo nos indica que el 50% (50/100) de machos bovinos son positivos a la enfermedad, al igual que el 50% (50/100) de hembras; demostrando así que no existe diferencia en la prevalencia del vector de acuerdo al sexo.

4.2. Discusión.

En base al resultado obtenido en el presente trabajo de investigación se determinó que la prevalencia de anaplasmosis en el cantón Santa Isabel es del 53%, dicha prevalencia es independiente del sexo del animal; sin embargo, se puede observar que la prevalencia varia en relación a los diferentes pisos climáticos con los que cuenta el cantón.

El cantón Santa Isabel posee un clima característico, cuya temperatura va desde los 18 a 25°C con pequeñas diferencias altitudinales entre cada sector, por lo que es propicio para el desarrollo de producciones pecuarias y agronómicas, favoreciendo también a la aparición de enfermedades por presencia de vectores como las garrapatas en el ganado bovino.

Otros estudios epidemiológicos revelan que hay prevalencias más elevadas del vector en el litoral ecuatoriano debido a que existen zonas donde la producción bovina es mayor, las

ferias de comercialización son más grandes y la proximidad con las zonas de mayor consumo es más alta.

En general, el Ecuador es un país que cuenta con climas tanto de trópicos como subtrópicos, cálidos o húmedos distribuidos en diferentes zonas que, llevados de la mano con las carencias sanitarias y deficiencia en el manejo técnico como desparasitación y aplicación de medidas de prevención, da como resultado la prevalencia de esta enfermedad, causando así perdidas en la producción ganadera tanto de tipo económicas, como de la propia producción bovina.

Muñoz Guarnizo (2017) habla de que la prevalencia de *A. marginale* que se detectó en Zamora Chinchipe fue elevada (49,5 %); sin embargo, en su estudio no existía diferencias significativas entre los animales de los sectores estudiados ($p< 0.05$) a pesar de que la provincia Zamora Chinchipe presenta pisos altitudinales que van desde los 815 a los 2800 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.), con temperaturas entre 17 ºC y 22 ºC.

El autor (Caroa Caiza, 2020) en su estudio de identificación de hemoparásitos en áreas ganaderas de Morona Santiago, evidencia que los ganaderos conocen la problemática de la Fiebre de Garrapatas y saben que existen productos terapéuticos para su tratamiento; desafortunadamente, no se realiza el diagnóstico diferencial por parte de los ganaderos ni veterinarios cuya consecuencia, en la mayoría de los casos, es la muerte del animal y pérdidas económicas para el productor.

Además, los resultados que se obtuvieron a nivel de fincas, para *Babesia spp. Y Anaplasma marginale* en el estudio de Caroa Caiza fue 42,8% (3/7 fincas), 85,7% (6/7 fincas) respectivamente, mediante observación microscópica. Del mismo modo, las enfermedades detectadas por finca mediante PCR para *B. bovis, B. bigemina y A. marginale* fueron 71,42 % (5/7 fincas), 85,71 % (6/7 fincas) y 85,71 % (6/7 fincas), respectivamente.

En un estudio realizado en los cantones Río Verde, Quinindé y Eloy Alfaro en la provincia de Esmeraldas la prevalencia de anaplasmosis es de 86%; de acuerdo con los estudios verifican una ausencia en asistencia veterinaria y vacunación de sus animales. Hay un uso inadecuado de acaricidas y no llevan un registro de sus animales. (Fernandez Gómes, 2018)

En la provincia de Pastaza se determina una prevalencia de anaplasmosis del 68% obtenidos por la técnica de ELISA, donde establecieron primeramente el punto de corte a través de la Densidad Óptica (DO) para detectar anticuerpos anti MSP5r de A. marginale (DO=0,267) y Trypanosoma spp. (DO=0,245). Estableciendo sus seroprevalencias se consideró como positivos todos aquellos sueros que presentaron DO superiores a sus respectivos puntos de cortes. (Medina Naranjo, y otros, 2017)

La prevalencia de *A. marginale* en el cantón Santa Isabel fue de un 53%, que comparado con estos porcentajes de prevalencias indican un rango elevado de susceptibilidad de la enfermedad, mayormente en fincas y pequeños productores ganaderos de diferentes zonas tanto del cantón como del litoral ecuatoriano.

En el Ecuador la prevalencia varía según el estudio y la región; las prevalencias que se observan en los diferentes estudios están determinadas por el tipo de método diagnóstico usado, ya que varían según su especificidad y sensibilidad.

Para (Corona & Martínez, 2011) la proteína MSP5 de *A. marginale* resulta de gran utilidad en ensayos de formato ELISA, ya que elimina los problemas señalados de los antígenos crudos, utilizados en otras técnicas como la aglutinación en tarjeta. El gen msp5 es de gran utilidad para el diagnóstico molecular, mediante PCR, en animales persistentemente infectados. Este gen y su producto de expresión son recomendados para el monitoreo de

animales durante el movimiento internacional de ganado y en programas de control de la anaplasmosis bovina.

En cuanto a los frotis de sangre teñidos con Giemsa son el Gold estándar para diagnosticar anaplasmosis bovina en individuos, pero es eficaz únicamente en casos donde hay sintomatología clínica. Esto se debe a que animales que están cursando el período prepatente de la enfermedad o presentan enfermedad subclínica (reservorio de la enfermedad) tienen poca cantidad de eritrocitos infectados por lo que no son detectables microscópicamente.

Este es el caso del estudio realizado por (Soto, 2010) donde la prevalencia obtenida en el Camal Metropolitano de Quito con frotis sanguíneo fue del 28,18%, comparada con 91,71% y 91,16% por medio de las técnicas PCR y c-ELISA respectivamente.

Al igual que (Muñoz Guarnizo, 2017) Este método es capaz de detectar niveles de parasitemia de 0,1 a 0,2 %; sin embargo, aunque se sabe que el diagnóstico en animales portadores se dificulta con el uso de esta técnica, en ocasiones se utiliza como una primera herramienta de diagnóstico, ante el desconocimiento de la prevalencia de *A. marginale* en una zona determinada.

A través del análisis estadístico se pudo comprobar que la presencia o ausencia de la enfermedad no tiene relación con la edad, el sexo y la procedencia del ganado. Al igual que (Escobar, y otros, 2015) nos señala que la presencia o ausencia de la enfermedad es independiente del lugar de donde proviene el bovino, determinando también que el grado de contaminación por *A. marginale* en un rebaño puede ser significativo en parentales, como en su progenie en las zonas de prevalencia de la enfermedad.

Para (Muñoz Guarnizo, 2017) La gravedad de la enfermedad aumenta con la edad del animal, ya que los terneros son mucho más resistentes al desarrollo de anaplasmosis clínica. En los bovinos de más de dos años de edad, *A. marginale* provoca una enfermedad leve o grave,

los bovinos jóvenes se consideran más resistentes a los efectos de una infección por *A. marginale*. Con relación a las razas, todas las razas de bovinos son susceptibles, pero *Bos indicus* sufre en forma más leve la infección que *Bos Taurus.*

De igual manera (Soto, 2010) en su trabajo de investigación agrega diferentes discusiones en cuanto a la edad, sexo y procedencia en el que nos dice que, en cuanto a la edad de los bovinos, las diferencias observadas no tuvieron una significancia estadística ($p>0,05$), lo que demuestra que la edad no influyó en la presencia o ausencia de la enfermedad.

Para (Benitez, 2003) y (Arreaga, 2004) todos los animales están predispuestos a la infección sin importar la edad, sin embargo, en el trabajo realizado por (Villafuerte, 2001), la susceptibilidad de los bovinos a Anaplasma tiende a estar asociado con la edad, determinando que, a mayor edad, los animales son más propensos. Con relación al sexo, si se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) indicando que la presencia o ausencia de la enfermedad depende del sexo del bovino.

De similar manera cita que, en el Ecuador tradicionalmente los animales machos son destinados a la producción de carne por lo que son llevados en mayor proporción al faenamiento. Según Arreaga (2004) en un estudio realizado en haciendas de la Provincia del Guayas en animales de doble propósito determinó una prevalencia de 1,3% en machos y 7,7% en hembras, por otra parte, Villamil (2005) reportó prevalencias en machos y hembras de 62% y 65,9% respectivamente, indicando que no existen diferencias estadísticas. Con respecto a la procedencia, los bovinos que ingresan a la EMRQ presentan una guía de movilización que es obligatoria para el faenamiento, en donde consta la procedencia de los animales.

Los bovinos muestreados procedieron de 7 provincias del Ecuador, observándose que el 49,17% (89/181) de bovinos procedieron de la provincia de Sto. Domingo de los Tsáchilas. Esto se debe a que esta zona es considerada como una de las más importantes en la producción

bovina y debido a su proximidad a la capital, abastece de ganado destinado para el consumo de carne, además en esta provincia se realizan ferias de comercialización de ganado todas las semanas. Sobre la base estadística, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,005$), determinándose que la procedencia del bovino influye en la presencia o ausencia de la enfermedad.

La prevalencia obtenida en la provincia de Sto. Domingo de los Tsáchilas con esta técnica fue de 26,97% (24/89), inferior a la reportada en el trabajo realizado por Martínez (1975) y superior a la obtenida por Rosillo (1996), quienes utilizando está técnica como medio de diagnóstico, obtuvieron valores de 6,67% y 28,6%, respectivamente.

Finalmente, la edad, sexo y procedencia no reflejan datos significativos en varios estudios realizados, las zonas a estudiar dentro de los límites del litoral ecuatoriano con climas tropicales y subtropicales, generan variaciones en las prevalencias, diferentes zonas pueden tener un grado mayor de susceptibilidad a la enfermedad ya que el clima del país es variado como tal y ligado a los tipos de clima donde será determinante la presencia del vector y las prevalencias más altas se reflejan en zonas más tropicales del país.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1.Conclusiones

- El presente trabajo de investigación se realizó en el Cantón Santa Isabel, provincia del Azuay, encontrando una prevalencia de anaplasmosis del 53% de 188 bovinos muestreados por medio de la técnica de ELISA competitivo.
- Los resultados de la investigación revelan que esta enfermedad sigue siendo prevalente en el cantón Santa Isabel y sus alrededores, demostrando que existe ineficiencia en el cuidado, manejo y sanidad de los animales, la aplicación de cuarentena para animales recién incorporados, la falta de vacunación y mal uso de desinfectantes y acaricidas en el lugar.
- Los pisos climáticos, ya sea tanto de una región como de un sector en específico influye relativamente en la susceptibilidad de la enfermedad hacia los animales, una pequeña diferencia en cuanto a la temperatura crea un ambiente de mayor o menor desarrollo de los vectores y su nivel de parasitismo.
- Es importante tomar en consideración que en las ferias ganaderas que se desarrollan en el cantón Santa Isabel también llegan animales provenientes de otros sectores; los cuales pueden padecer la enfermedad en diferentes etapas aumentando la susceptibilidad hacia los animales residentes y elevar la prevalencia de esta.

5.2.Recomendaciones.

- Efectuar campañas de concienciación periódica a los productores ganaderos sobre la importancia de la Anaplasmosis para evitar el incremento infeccioso de esta enfermedad hemo parasitaria.
- En cuanto a los trabajos investigativos de *Anaplasmosis bovina*, se sugiere implementar análisis de medidas de asociación de varios factores con respecto al desarrollo de la enfermedad, para determinar la interacción de factores asociados.
- Implementar como medida de control en cada establecimiento la realización de pruebas serológicas antes de la movilización de animales.
- Implementar programas de desparasitación de ectoparásitos periódica de todos los animales que ingresen a los hatos ganaderos y ferias.
- Realizar estudios a nivel nacional especialmente en la costa y oriente ecuatoriano para determinar la situación real de la enfermedad en hatos ganaderos, además de su epidemiología, clínica y vectores.

6. BIBLIOGRAFIA.

Alcaraz, E. L. (1999). *ANAPLASMOSIS BOVINA.* Obtenido de Producción Animal: https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_en_general/40-anaplasmosis.pdf

Arreaga, K. (2004). Determinacion de la prevalencia de Anaplasmosis en el cantón General Antonio Elizalde (Bucay). *(Tesis de Grado).* Universidad Agraria del Ecuador, Guayaquil.

Benavides, E., Romero, J., & Villamil, L. (2016). *Las garrapatas del ganado bovino y los agentes de enefermedad que transmiten en escenarios epidemiologicosde cambio climático.* Costa Rica, San José: IICA. Obtenido de http://repiica.iica.int/docs/B4212e/B4212e.pdf

Benitez, W. (2003). Determinación de la presencia de Anaplasma en el ganado bovino del cantón Jama, Provincia de Manabí. *(Tesis de Grado).* Universidad Agraria del Ecuador, Guayaquil.

Brayton, K. A. (2012). Transmisión de Anaplasma marginale por garrapatas. *Revista mexicana de ciencias pecuarias, 3*(1), 41-50. Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242012000500006

Caroa Caiza, D. (2020). Identificación de hemoparásitos en sangre de bovinos y humanos, en dos áreas ganaderas de la provincia de Morona Santagio a través de microscopia y Ncpr. *Universidad central del Ecuador*, 49-50. Obtenido de http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/22424/1/T-UCE-0014-MVE-113.pdf

Corona , B., & Martínez, S. (2011). DETECCIÓN DE Anaplasma marginale EN BOVINOS, MEDIANTE LA AMPLIFICACION POR PCR DEL GEN msp5. *Salud Animal, 33*(1), 24-31. Obtenido de http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v33n1/rsa04111.pdf

Corona Gonzáles, B., Obregón , D., Alemán, Y., Pastor, A., Vega, E., Díaz, A., & Martínez, S. (Mayo-Agosto de 2014). Tendencias en el diagnóstico de la anaplasmosis bovina. *Revista de Salud Animal. Scielo., 36*, 4. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2014000200001

Coronado, A. (2001). ¿Es Boophilus microplus el Principal Vector de Anaplasma marginale? Nota Técnica. *Revista Cientifica FCV-LUZ, XI*(5), 408-411. Obtenido de https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjrqsTs8PXxAhVvRTABHbR4CGcQFjAEegQIDxAD&url=https%3A%2F%2Fproduccioncientificaluz.org%2Findex.php%2Fcientifica%2Farticle%2Fdownload%2F14795%2F14772%2F&usg=AOvVaw3ASy1h9_JGYCpmfxLlMGv

De la Sota, M. D. (2004). *Manual de procedimientos de anaplasmosis y babesiosis.* Buenos Aires, Argentina: SENASA. Obtenido de

http://www.intranet.senasa.gov.ar/intranet/imagenes/archivos/dnsa/manuales_de_procedimiento/29%20Anaplasmosis.pdf

Díaz, D., Valera, Z., De Andrade, E., Parra, O., Escalona, F., & Ramírez, R. (2003). REVALENCIA DE Anaplasma marginale EN BOVINOS DEL SECTORLA PIÑATA, MUNICIPIO LA CAÑADA DE URDANETA,ESTADO ZULIA, VENEZUELA. *FCV. LUZ, XIII*(3), 193-198. Obtenido de https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/14978/14955

Duque Campuzano, S. (2017). Anaplasmosis bovina "historia, actualidad, clínica eimpactoeconómico en la ganadería". *2017.* Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias, Caldas. Antioquia. Obtenido de http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/2171/1/Anaplasmosis_bovina.pdf

Escobar, A., Cevallos, O., Villareal, P., Carranza, M., Carranza, H., & Pinargote, E. (2015). Prevalencia y detección por PCR anidada de Anaplasma marginale en bovinos y garrapatas en la zona central del litoral Ecuatoriano. *Ciencia y tecnologia, 8*(1), 11-18. Obtenido de https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwicqZ7Yi-31AhU5RDABHSktDjEQFnoECAMQAQ&url=https%3A%2F%2Frevistas.uteq.edu.ec%2Findex.php%2Fcyt%2Farticle%2Fdownload%2F145%2F159%2F212&usg=AOvVaw0eUsy-P4e3z3MYnvMhWyAd

Felgueroso Espí, A. (2011). Las garrapatas como agentes transmisores de enfermedades para los animales y el hombre. *SERIDA.ORG*, 4. Obtenido de https://ria.asturias.es/RIA/bitstream/123456789/1483/1/Archivo.pdf

Fernandez Gómes, D. (21 de mayo de 2018). *Prevalencia de anaplasmosis bovina en los cantones Río Verde, Eloy Alfaro y Quinindé en la provincia de Esmeraldas.* Universidad San Francisco de Quito USFQ, Quito. Obtenido de https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/7285/1/138148.pdf

Fosgate , G., Urdaz- Rodriguez, J., Dunbar, M., Rae, D., Donovan , G., Melendez , P., & et. al. (2010). Diagnostic accuracy of methods for detecting Anaplasma marginale ifection in lactind diary cattle of Puerto Rico. *J Vet Diagn Invest., 22*(2), 192-199. Obtenido de https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20224076/

Gobierno Autónomo Decentralizado de Santa Isabel. (2020). *GAD SANTA ISABEL - Ubicación Geográfica*. Obtenido de https://santaisabel.gob.ec/

GoffW, Barbet , A., Stiller, D., Palmer, G., Knowles , D., Kocan, K., & et al. (1988). *Detection of Anaplasma marginale infected tick vectors by using a cloned DNA probe.* USA: Proc Natl Acad Sci. Obtenido de https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3422471/

Gutierrez, C. N. (2016). Ehrlichiosis Canina. *Saber, 28*(4), 641-665. Obtenido de http://ve.scielo.org/pdf/saber/v28n4/art02.pdf

Hernández Cordova, M. A. (2016). Anaplasmosis bovina:abordaje clínico y patológico de la enfermedad. *2016.* Corporación Universtaria Lasallista , Colombia. Obtenido de http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/1739/1/Anaplasmosis_bovina.pdf

Keiser, S., Eriks, I., & Palmer, G. (16 de Abril de 1990). Cyclic Rickettsemia during persistent Anaplasma Marginale Infecction of cattle. *Infection and Immunity, 58*(4), 1117-1119. Obtenido de https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/iai.58.4.1117-1119.1990

Kuttler, K., Zaraza, H., & Roberts, E. (1969). Examen de las tecnicas de inmunizacion contra anaplasmosis y babesiosis. *SEPARATA DE LA REVISTA "ICA", 4*(3), 139-146. Obtenido de https://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNRAA117.pdf

LOSA. (2019). *REGLAMENTO GENERAL DE LA LEY ORGANICA DESANIDAD AGROPECUARIA.* Quito, Ecuador: LEXISFINDER. Ley 919/2019, de 29 de noviembre de 2019, (Reglamento) LEY ORGANICA DE SANIDAD AGROPECUARIA - LOSA. Registro Oficial Suplemento 91. Quito. 29 de noviembre de 2019, núm. 91, 1-92. Obtenido de http://www.epmrq.gob.ec/images/servicios/Reglamento_LOSA.pdf

Mathieu, M. (17 de Abril de 2019). ELISA ¿Que es? ¿En que consiste? ¿Cuales son los distintos tipos de este ensayo y en cual se diferencian? *All science. Ciencia, tecnologia y ambiente.* Obtenido de https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/elisa-que-es-en-que-consiste-cuales-son-los-distintos-tipos-de-este-ensayo-y-en-que-se-diferencian

McElwain, T. (2000). Bovine anaplasmosis. *Chapter 2.3.7. In manual of standards for diagnostic test and vaccine.*, 399-341.

Medina Naranjo, V. L., Reyna Bello, A., Tavares Marques, L. M., Campos, A. M., Ron Roman, J. W., & Monayo, J. C. (2017). DIAGNÓSTICO DE LOS HEMOTRÓPICOS Anaplasma marginale, Trypanosoma spp. Y Babesia spp. MEDIANTE LAS TÉCNICAS DE ELISAi Y PCR EN TRES FINCAS GANADERAS DE LA PROVINCIA DE PASTAZA, ECUADOR. *Redalyc, XXVII*(3), 162-171. Obtenido de https://www.redalyc.org/journal/959/95952010005/movil/

Muñoz Guarnizo, T. R. (abril de 2017). Prevalencia de Anaplasma marginale en bovinos de la provincia Zamora Chinchipe, Ecuador. *Salud Animal, 39*(1), 7. Obtenido de http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v39n1/rsa09117.pdf

Olguin y Bernal, A. (2007). *ANAPLASMOSIS BOVINA.* Obtenido de PDF4PRO: https://pdf4pro.com/amp/view/anaplasmosis-ammveb-net-1035c3.html

Organizacion Mundial de Salud Animal (OIE). (2008). Bovine anplasmosis. *Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals., 6,* 599-610.

Palmer , G., Barbet, A., Musoke , A., Katende, J., Rurangirwa, F., Varda, S., . . . Mcguirre, T. (1988). Recognition of conserved surface protein epitopes on Anaplasma centrale and Anaplasma marginale isolates from Israel, kenya and the Unites states. En G. H.

Palmer, *ANAPLASMA MARGINALE* (Vol. 18, págs. 33-38). Argentina: J. Parasitol. Obtenido de https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0020751988900331?via%3Dihub

Palmer GH, Barbet , A., Kuttler, K., & McGuirre, T. (1986). Detection of Anaplasma marginale common surface proteins in all stages of infection. *J Clin Microbiol., 23*(6), 1078-1083. Obtenido de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC268797/pdf/jcm00107-0100.pdf

Quiroz, H. (1990). *PARASITOLOGIA.* MEXICO: LIMUSA S.A.

Rodriguez, G. (18 de Julio de 2014). *Anaplasmosis y Piroplasmosis*. Obtenido de Ganaderia.com: https://www.ganaderia.com/destacado/Anaplasmosis-y-Piroplasmosis

Sanchez, F. (1984). PREVALENCIA DE ANAPLASMOSIS y BABESIOSIS EN EL CENTRO EXPERIMENTAL PECUARIO DE ALDAMA TAMAULIPAS. *Tec. Pec. Mex.46*, 88-92. Obtenido de https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjpxb2Z1ObxAhWNMVkFHQxSB18QFnoECAMQAA&url=https%3A%2F%2Fcienciaspecuarias.inifap.gob.mx%2Findex.php%2FPecuarias%2Farticle%2Fdownload%2F3292%2F2712&usg=AOvVaw0znTSKv8BO

Shompole, S., Waghela, S., Rurangirwa, F., & McGuire, T. (7 de Dec de 1989). *Cloned DNA probes indentify Anaplasma Ovis in goats and reveal a high prevalence on infection.* (Vol. 12). J Clin Microbiol. Obtenido de https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2592538/

Sierra, J. (03 de Octubre de 2013). *Anaplasmosis Bovina.* Obtenido de SlideShare: https://es.slideshare.net/jesierra/anaplasmosis-bovina-jer

Soto, K. (2010). DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE ANAPLASMOSIS EN EL GANADO BOVINO FAENADO EN LA EMPRESA METROPOLITANA DE RASTRO DE QUITO (EMRQ) MEDIANTE LA APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO: MICROSCOPÍA DE FROTIS SANGUÍNEOS, REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA. *(Tesis de Grado).* Escuela Politécnica del Ejercito, Quito, Ecuador. Obtenido de http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2846/1/T-ESPE-030491.pdf

Trabattoni, E. (2015). Tratamientoo y Vacunacion en Anaplasmosis y Babesiosis en Bovinos. *ESPERANZA distribuciones. Sitio Argentino de Produccion Animal.*, 1-7.

Vanzini, V., & Ramirez, L. (1994). Babesiosis y anaplasmosis bovina Diagnostico, Epidemiologia y control. *Sitio Argentino de Producción Animal, 25*(3), 137-190. Obtenido de https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/Bovinos_garrapatas_tristeza/56-babesiosis_y_anaplasmosis_bovina.pdf

Veterinary Medical Resarch and Development. (2021). ANAPLASMA ANTIBODY TEST KIT, cELISA v2. 2. Washington, USA.

Villafuerte, G. (2001). *Prevalencia de Anaplasmosis Bovina en el cantón Lomas de Sargentillo. Provincia del Guayas.* Universidad Agraria del Ecuador , Guayaquil.

Visser, E., & Ambrosio, R. (Dec de 1987). DNA probes of detection of Anaplasma centrale and Anaplasma marginale. (Onderstepoort, Ed.) *JVet Res*, *54*(4), 623-627. Obtenido de https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2832800/

Zambrano, J. (2016). *GUÍA PARA LA CORRECTA TOMA DE SANGRE EN BOVINOS A PARTIR DE LA VENA COCCÍGEA Y DE LA VENA YUGULAR EXTERNA.* Obtenido de Universidad Nacional de Colombia: http://medicinaveterinariaydezootecnia.bogota.unal.edu.co/fileadmin/FVMZ/Servicios/bioetica/Pro_autorizados/001_Guia_toma_sangre_bovinos.pdf

7. ANEXOS.

Anexo A. Lista de medicamentos para tratamiento de anaplasmosis bovina.

TRATAMIENTO	
Medicamento	Dosis
Oxitetraciclina soluble (Clorhidrato) Retiro: leche 3 días- carne 10 días. Presentación comercial: 500mg/ml	10 mg/kg. Vía IM o EV
Oxitetraciclina L.A (base) Retiro: leche 6 días- carne 28 días Presentación comercial: 200 mg/ml	20 mg/kg. Vía IM
Imidocarb Dipropionato Retiro dosis no esterilizante: leche 6 días- carne 7 meses. Retiro dosis esterilizante: 14 días. Presentación: Imizol (Intervet Ecuador) de 120 mg/ml	Dosis no esterilizante: 3mg/kg (2.5 ml cada 100kg) Dosis esterilizante: 5 mg/kg (2.5 ml cada 100 kg)

(Trabattoni, 2015)

Anexo B: lista de protocolos de tratamiento para anaplasmosis bovina.

PROTOCOLOS DE TRTAMIENTO	
Protoclo N°1 Anaplasmosis Clínica	Se obtiene mejores resultados al iniciar el tratamiento antes de que el hematocrito descienda por debajo del 15%. Si él % de eritrocitos infectados es mayor al 15%, el tratamiento es poco efectivo y la recuperación dependerá de la médula ósea. Opción a) Clásico: elegir una de las dos drogas Oxitetraciclina soluble (Clorhidrato): 10 mg/kg IM o EV (2 ml cada 10 kg), una dosis diaria, durante cuatro días bien... Oxitetraciclina LA: 20 mg/kg, IM (1 ml cada 10 kg), una dosis.

	Opción b) De elección: “Tratamiento combinado” (aplicar en el mismo momento, pero en puntos diferentes) Oxitetraciclina Soluble:5 mg/kg IM o EV (1 ml cada 10 kg), una dosis. + Oxitetraciclina LA: 20 mg/kg, IM (1 ml cada 10 kg) una dosis.
Protocolo N°2 Eliminación de estado de portador o esterilización del animal.	Opción a) Oxitetraciclina LA: 20 mg/kg, (1 ml cada 10 kg), IM, en total 3 dosis, con 7 días de intervalo entre cada una. Opción b) Oxitetraciclina Soluble: 20 mg/kg (4 ml cada 10 kg), IM o EV, una dosis diaria durante 5 días. Opción c) Oxitetraciclina Soluble: 10 mg/kg I (2 ml cada 10 kg), M o EV,una dosis diaria durante 10 días
Protocolo N° 3 Medicación durante la estación del año donde hay mas vectores	Opción a) Oxitetraciclina LA: 20 mg/kg, (1 ml cada 10 kg), IM, una dosis diaria, cada 21 a 28 días. Opción b) Oxitetraciclina Soluble: 10 mg/kg (2 ml cada 10 kg), IM o EV, una dosis diaria, cada 21 a 28 días
Protocolo N°4 Brote severo de Anaplasmosis	. Realizar un protocolo de vacunación bajo control veterinario porque puede haber reacciones adversas. 2. Aplicar tratamiento combinado a todos los animales. 3. Luego tomar muestras de sangre en una proporción del 10% del hato (con un mínimo de 20 y máximo de 100 muestras). 4. A los 7 días del tratamiento vacunar animales. 5. Hacer control de temperatura y otros signos de la enfermedad 10 días después de la aplicación de la vacuna. En lote grande tomar lote testigo. 6. Si hay signos de la enfermedad, tratar al lote a los 30 días posteriores a

	la vacunación con oxitetraciclina LA 20 mg/kg IM, una dosis. No hay riesgo de esterilizar				
Protocolo Nº 5 Identificación y tratamiento de los portadores.	• % de animales positivos a ELISA inferior al 8%: hay bajo riesgo de aparición de casos clínicos. Identificar por medio del test de ELISA (anticuerpos) a todos los positivos y eliminar el estado de portador (esterilizar). Definir si es necesario vacunar a terneros de entre 4 y 10 meses de edad. • % de animales positivos a ELISA entre el 8 al 75%: Identificar por medio del test de ELISA a todos los positivos y eliminar a todos los portadores (esterilizar). Vacunar a terneros de entre 4 y 10 meses de edad. • % de animales positivos a ELISA superior al 75%: tratamiento masivo. No es necesario vacunar				
Protocolo Nº6 Vacunación masiva y control con Imidocarb a los 28 días post vacunación.	Categoría	Rango de preñez en días	Aplicación de vacuna monovalente	Aplicación Imidocarb 28 días post vacunación Dosis/animal cc/100 kg	Observaciones
	Ternero 4-11 meses	0	Si	0	Controlar posibles casos de enfermedad a los días 30-45

						post-vacunación
	Vaquillonas > 11 meses preñadas		35-150	Si	2,5	
			151-282	No	1	Vacunar luego del parto con el criterio de vaca vacía y hacer profilaxis con Imidocarb
	Vacas secas	Vacias	0	Si	1	
		Preñadas	35-150	Si	2,5	
			151-282	Si	1	Vacunar luego del parto con el criterio de vaca vacía y hacer profilaxis con Imidocarb
		Vacías	0	Si	1	

	Vacas en ordeño	Preñadas	35-150	Si	2,5	
				No	1	Vacunar luego del parto con el criterio de vaca vacía y hacer profilaxis con Imidocarb

(Trabattoni, 2015)

Anexo c: Fotografías.

a. Recolección de muestras en el Camal municipal de Santa Isabel.

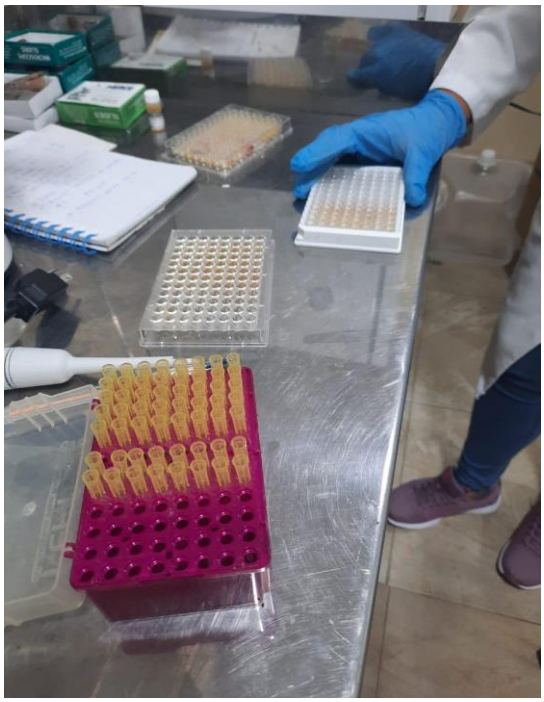
b. Ganado bovino proveniente de diferentes zonas del cantón Santa Isabel.

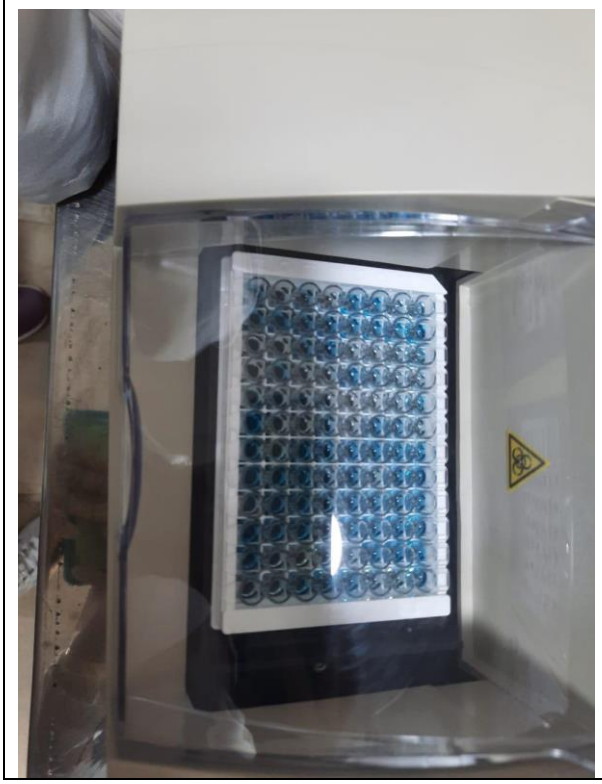
b. Recolección de muestras en campo.

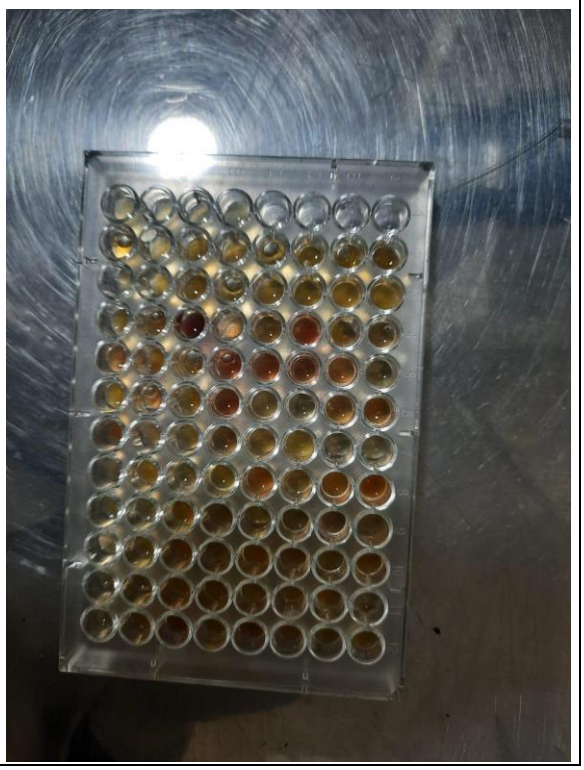
c. Centrifugación de las muestras.

d. Obtención de suero bovino.

e. Evaluación de las muestras en laboratorio mediante el kit ELISA competitivo.







Anexo d. Obtención de resultados.

RESULTADOS DENSIDAD OPTICA (DO)

Enfermedad	Fecha	Muestra
Anaplasmosis	13/10/2021	individual

	1	2	3	4	5	6
A	0,256	0,690	0,331	0,200	0,361	0,240
B	0,262	0,554	0,252	0,238	0,226	0,438
C	0,599	0,520	0,196	0,292	0,174	0,521
D	0,613	0,583	0,200	0,602	0,169	0,208
E	0,181	0,559	0,682	0,210	0,174	0,254
F	0,343	0,572	0,451	0,201	0,150	0,157
G	0,176	0,752	0,158	0,437	0,161	0,137
H	0,551	0,593	0,208	0,209	0,229	0,584

RESULTADOS PORCENTUAL PUNTO DE CORTE(S/P%) CON EL POSILLO CONTAMINAD

	1	2	3	4	5	6
A	57,75578	-13,86139	45,37954	66,9967	40,42904	60,39604
B	56,76568	8,580858	58,41584	60,72607	62,70627	27,72277
C	1,155116	14,19142	67,65677	51,81518	71,28713	14,0264
D	-1,155116	3,79538	66,9967	0,660066	72,11221	65,67657
E	70,13201	7,755776	-12,54125	65,34653	71,28713	58,08581
F	43,39934	5,610561	25,57756	66,83168	75,24752	74,09241
G	70,9571	-24,09241	73,92739	27,88779	73,43234	77,39274
H	9,075908	2,145215	65,67657	65,51155	62,21122	3,630363

CONTROL POS	CONTROL NEGATIVO		VALIDACION 1	VALIDACION 2
0,259	0,606	PROMEDIO	0,606	57,2607261
			+ 0,40; -2,10	+ 30 %

Especie	Kit	ELISA
bovinos	VMRD Anapla	Competitivo

7	8	9	10	11	12	13
0,672	0,623	0,671	0,598	0,798	0,445	0,521
0,609	0,705	0,571	0,675	0,808	0,247	0,198
0,614	0,236	0,481	0,504	0,625	0,234	0,178
0,602	0,623	0,653	0,596	0,174	0,510	0,448
0,367	0,230	0,286	0,250	0,214	0,495	0,180
0,547	0,530	0,555	0,518	0,185	0,367	0,494
0,196	0,577	0,606	0,567	0,190	0,239	0,133
0,405	0,525	0,200	0,635	0,616	0,247	0,266

O

7	8	9	10	11	12	13
-10,89109	-2,805281	-10,72607	1,320132	-31,68317	26,56766	14,0264
-0,49505	-16,33663	5,775578	-11,38614	-33,33333	59,24092	67,32673
-1,320132	61,05611	20,62706	16,83168	-3,135314	61,38614	70,62706
0,660066	-2,805281	-7,755776	1,650165	71,28713	15,84158	26,07261
39,43894	62,0462	52,80528	58,74587	64,68647	18,31683	70,29703
9,735974	12,54125	8,415842	14,52145	69,47195	39,43894	18,48185
67,65677	4,785479	0	6,435644	68,64686	60,56106	78,05281
33,16832	13,36634	66,9967	-4,785479	-1,650165	59,24092	56,10561

14	15	16	17	18	19	20
0,472	0,580	0,614	0,154	0,200	0,283	0,509
0,211	0,774	0,378	0,194	0,600	0,789	0,259
0,486	0,343	0,308	0,647	0,652	0,187	0,563
0,191	0,509	0,610	0,602	0,183	0,292	0,375
0,808	0,150	0,235	0,502	0,606	0,602	0,272
0,517	0,414	0,217	0,610	0,523	0,165	0,219
0,131	0,265	0,532	0,298	0,349	0,166	0,347
0,256	0,230	0,700	0,616	0,322	0,733	0,635

14	15	16	17	18	19	20
✓ 22,11221	✓ 4,290429	✓ -1,320132	✗ 74,58746	✗ 66,9967	✗ 53,30033	✓ 16,0066
✗ 65,18152	✓ -27,72277	✗ 37,62376	✗ 67,9868	✓ 0,990099	✓ -30,19802	✗ 57,26073
✓ 19,80198	✗ 43,39934	✗ 49,17492	✓ -6,765677	✓ -7,590759	✗ 69,14191	✓ 7,09571
✗ 68,48185	✓ 16,0066	✓ -0,660066	✓ 0,660066	✗ 69,80198	✗ 51,81518	✗ 38,11881
✓ -33,33333	✗ 75,24752	✗ 61,22112	✓ 17,16172	✓ 0	✓ 0,660066	✗ 55,11551
✓ 14,68647	✗ 31,68317	✗ 64,19142	✓ -0,660066	✓ 13,69637	✗ 72,77228	✗ 63,86139
✗ 78,38284	✗ 56,27063	✓ 12,21122	✗ 50,82508	✗ 42,40924	✗ 72,60726	✗ 42,73927
✗ 57,75578	✗ 62,0462	✓ -15,51155	✓ -1,650165	✗ 46,86469	✓ -20,9571	✓ -4,785479

21	22	23	24
0,502	0,189	0,245	0,476
0,203	0,225	0,726	0,611
0,534	0,549	0,163	0,197
0,178	0,191	0,230	0,197
0,613	0,549	0,404	0,331
0,176	0,221	0,546	0,181
0,495	0,329	0,132	0,164
0,501	0,466	0,136	0,260

21	22	23	24
✓ 17,16172	✗ 68,81188	✗ 59,57096	✓ 21,45215
✗ 66,50165	✗ 62,87129	✓ -19,80198	✓ -0,825083
✓ 11,88119	✓ 9,405941	✗ 73,10231	✗ 67,49175
✗ 70,62706	✗ 68,48185	✗ 62,0462	✗ 67,49175
✓ -1,155116	✓ 9,405941	✗ 33,33333	✗ 45,37954
✗ 70,9571	✗ 63,53135	✓ 9,90099	✗ 70,13201
✓ 18,31683	✗ 45,70957	✗ 78,21782	✗ 72,93729
✓ 17,32673	✓ 23,10231	✗ 77,55776	✗ 57,09571