



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS
NATURALES RENOVABLES
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

**“DIAGNÓSTICO DE ANAPLASMOSIS BOVINA POR LOS
MÉTODOS DE GIEMSA Y ELISA INDIRECTO Y SU
RELACIÓN CON LOS VALORES SANGUÍNEOS, EN LA
PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE ”**

Tesis de Grado previa a la
obtención del título de Médico
Veterinario Zootecnista

AUTOR:

LUIS EDUARDO TORRES QUILLE

DIRECTORA:

Dra. PATRICIA AYORA FERNÁNDEZ

LOJA-ECUADOR

2015

CERTIFICACIÓN

Dra. Patricia Ayora Fernández

DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICA:

Que he revisado la presente tesis titulada **“DIAGNÓSTICO DE ANAPLASMOSIS BOVINA POR LOS MÉTODOS DE GIEMSA Y ELISA INDIRECTO Y SU RELACIÓN CON LOS VALORES SANGUÍNEOS, EN LA PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE”** realizada por el señor egresado **LUIS EDUARDO TORRES QUILLE**, la misma que cumple con todos los lineamientos establecidos para su respectiva presentación normada por la Universidad Nacional de Loja, por lo cual, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

Loja, Febrero del 2015



Dra. Patricia Ayora Fernández

DIRECTORA DE TESIS

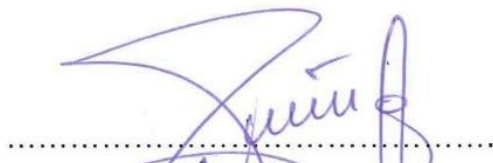
“DIAGNÓSTICO DE ANAPLASMOSIS BOVINA POR LOS MÉTODOS DE GIEMSA Y ELISA INDIRECTO Y SU RELACIÓN CON LOS VALORES SANGUÍNEOS, EN LA PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE”

Tesis presentada al Tribunal de Grado como requisito previo a la obtención del título de:

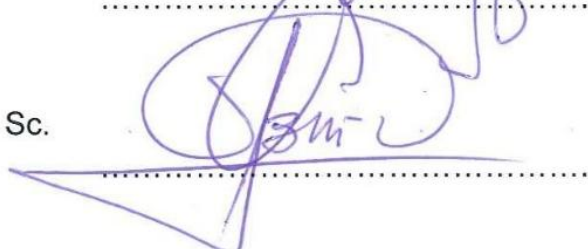
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada:

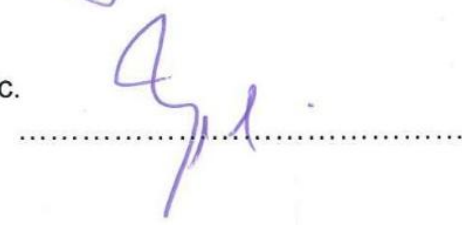
Dr. Tito Ramiro Muñoz Guarnizo Mg. Sc.
Presidente del Tribunal



Dr. Juan Alberto Parra Chalán Mg. Sc.
Vocal



Dr. Segundo Germán Barragán fierro Mg. Sc.
Vocal



AUTORÍA

Yo, Luis Eduardo Torres Quille, declaro ser autor del presente trabajo de tesis que ha sido desarrollada con base a una investigación exhaustiva y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma; los conceptos, ideas, resultados, conclusiones y recomendaciones vertidos en el desarrollo del presente trabajo de investigación son de absoluta responsabilidad de su autor.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional – Biblioteca Virtual

Autor: Luis Eduardo Torres Quille.

Firma: 

Cedula: 1104666688

Fecha: 26-02-2015

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DEL AUTOR PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO

Yo, **Luis Eduardo Torres Quille**, declaro ser autor de la tesis titulada **“DIAGNÓSTICO DE ANAPLASMOSIS BOVINA POR LOS MÉTODOS DE GIEMSA Y ELISA INDIRECTO Y SU RELACIÓN CON LOS VALORES SANGUÍNEOS, EN LA PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE”** como requisito para optar al grado de: Médico Veterinario Zootecnista, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional (RDI):

Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Firma:.....

Autor: Luis Eduardo Torres Quille.

C.I: 1104666688

Dirección: Loja, Ciudadela Daniel Alvarez

Correo Electrónico: luissagitario87@hotmail.com

Teléfono: 2 562 817

Cel. 0986909663

DATOS COMPLEMENTARIOS

Director de Tesis: Dra. Patricia Ayora Fernández

Tribunal de Grado: Dr. Tito Ramiro Muñoz Guarnizo Mg. Sc.

Dr. Juan Alberto Parra Chalán Sc.

Dr. Segundo Germán Barragán fierro Mg. Sc

AGRADECIMIENTO

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización de este proyecto ya que es el resultado del esfuerzo conjunto de todos.

A la Universidad Nacional de Loja, al Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, a la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia a sus docentes que nos supieron guiar en los diferentes módulos, al personal administrativo, al Dr. Tito Muñoz y Dra. Patricia Ayora Fernández, quienes con su gran paciencia, responsabilidad y dedicación me guiaron en la realización de la misma y en especial a mis padres, que con cuyo apoyo y dedicación pude alcanzar este gran objetivo en mi formación profesional.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigos.

A todos ellos, muchas gracias.

Luis Eduardo Torres Quille

DEDICATORIA

Este proyecto lo dedico a Dios y a María Santísima, porque han estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar.

La concepción de este proyecto está dedicada a mis padres Carlos Eduardo Torres González, Lidia Esperanza Quille Rojas, a mi hermano Diego Javier Torres Quille y a mis abuelitos quienes son pilares fundamentales en mi vida. Sin ellos, jamás hubiese podido llegar a mi meta.

Su tenacidad y lucha insaciable han hecho de ellos el gran ejemplo a seguir y destacar, no solo para mí, sino para toda mi familia en general.

Luis Torres

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PAG.
PRESENTACIÓN.....	i
APROBACIÓN.....	iii
CERTIFICACIÓN.....	ii
AUTORÍA.....	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN.....	v
DEDICATORIA.....	vii
ÍNDICE GENERAL.....	1
ÍNDICE DE CUADROS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
1 INTRODUCCIÓN.....	10
2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	13
2.1 ANAPLASMOSIS.....	13
2.1.1 Antecedentes.....	13
2.1.2 Generalidades.....	14
2.1.3 Agente Etiológico.....	15
2.1.4 Descripción de la Enfermedad.....	19
2.1.5 Patogenia.....	20
2.1.6 Transmisión de la Enfermedad.....	21
2.1.7 Síntomas de la Enfermedad.....	22
2.1.8 Epidemiología de la Enfermedad.....	23
2.1.9 Diagnóstico.....	25
2.1.10 Control de la Enfermedad.....	33
2.2 HEMOGRAMA BOVINO.....	35
2.2.1 Introducción.....	35
2.2.2 Interpretación del Hemograma para su aplicación.....	36

2.2.3	Valores sanguíneos normales de bovinos.....	39
2.3	TRABAJOS REALIZADOS SOBRE EL TEMA.....	39
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
3.1	MATERIALES.....	41
3.1.1	Materiales de Campo.....	41
3.1.2	Materiales de Laboratorio.....	41
3.1.3	Materiales de Oficina.....	42
3.2	MÉTODOS.....	42
3.2.1	Ubicación del proyecto.....	42
3.2.2	Tamaño de la Población.....	43
3.2.3	Tamaño de la Muestra.....	43
3.2.4	Variabes a Evaluar.....	44
3.2.5	Análisis Estadístico.....	44
3.2.6	Selección de Fincas.....	44
3.2.7	Técnicas de Recolección de las Muestras de sangre.....	45
3.2.8	Realización de Frotis Sanguíneos.....	45
3.2.9	Coloración de Giemsa.....	45
3.2.10	Extracción del Suero sanguíneo.....	46
3.2.11	Elaboración de hemograma.....	46
3.2.12	Análisis de muestras de suero por iELISA.....	47
4	RESULTADOS.....	51
4.1	PREVALENCIA DE LA ANAPLASMOSIS BOVINA (<i>A. Marginale</i>) .	51
4.1.1	Prevalencia General.....	51
4.1.2	Prevalencia de <i>A. marginale</i> por Sectores (%).....	52
4.1.3	Prevalencia de <i>A. marginale</i> por Edad en la Provincia de Zamora Chinchipe (%)......	53
4.1.4	Prevalencia de <i>A. marginale</i> por Sexo en la Provincia de Zamora Chinchipe (%)......	54
4.1.5	Prevalencia de <i>A. marginale</i> por raza en la provincia de Zamora Chinchipe (%)......	55
4.1.6	Comparación de las pruebas diagnósticas.....	56
4.1.7	Comparación del Diagnóstico con las alteraciones hematológicas .	56

4.2	ESTUDIO DESCRIPTIVO DE FACTORES POTENCIALES PARA LA PRESENCIA DE <i>Anaplasma marginale</i> EN EL GANADO BOVINO DE LA PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE.....	57
4.2.1	Presencia de la enfermedad.....	57
4.2.2	Conocimiento Epidemiológico	58
4.2.3	Diagnóstico y control de la enfermedad (<i>A. Marginale</i>).....	61
4.2.4	Control de garrapatas.....	63
4.2.5	Salubridad	65
4.2.6	Socialización de resultados.....	65
5	DISCUSIÓN	67
5.1	Prevalencia de <i>A. marginale</i> en la Provincia de Zamora Chinchipe	67
5.2	Comparación de las Pruebas diagnósticas	69
5.3	Alteraciones Hematológicas más frecuentes	69
5.4	Factores Asociados a la presencia de <i>A. marginale</i> en la Provincia de Zamora Chinchipe	71
6	CONCLUSIONES	74
7	RECOMENDACIONES	75
8	BIBLIOGRAFÍA	76
9	ANEXOS	83

ÍNDICE DE CUADROS

CONTENIDO	PAG.
Cuadro 1. Especies del género Anaplasma	15
Cuadro 2. Prevalencia de anaplasmosis en el Continente Americano.....	24
Cuadro 3. Valores normales del conteo hemático.....	39
Cuadro 4. Características agrometeorológicas de la provincia de Zamora Chinchipe.....	42
Cuadro 5. Sectores de toma de muestras.....	44
Cuadro 6. Prevalencia general de Anaplasmosis bovina en bovinos de la provincia de Zamora Chinchipe (%).....	51
Cuadro 7. Prevalencia de Anaplasmosis bovina por sectores de la provincia de Zamora Chinchipe (%).....	52
Cuadro 8. Prevalencia de Anaplasmosis bovina por Edad en la Provincia de Zamora Chinchipe (%).	53
Cuadro 9. Prevalencia de Anaplasmosis bovina por sexo en la provincia de Zamora Chinchipe (%).	54
Cuadro 10. Prevalencia de Anaplasmosis bovina por raza en la provincia de Zamora Chinchipe (%).	55
Cuadro 11. Comparación de las pruebas diagnósticas	56
Cuadro 12. Comparación de diagnósticos vs Alteraciones Hematológicas. 56	56
Cuadro 13. Presencia de la enfermedad (%).	57
Cuadro 14. Tipo de suelo en la provincia de Zamora Chinchipe (%).	59

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PAG.
Figura 1. Anaplasma marginale.....	16
Figura 2. Principio de la prueba de cELISA (Docstoc, 2009).....	27
Figura 3. Principio de la prueba de ELISA indirecto (Docstoc. 2009).....	28
Figura 4. Prevalencia general de Anaplasmosis bovina en Zamora Chinchipe (%).	51
Figura 5. Prevalencia por Sectores de Anaplasmosis bovina (%).	52
Figura 6. Prevalencia por Edad de Anaplasmosis bovina en la provincia de Zamora Chinchipe (%).	53
Figura 7. Prevalencia por Sexo de Anaplasmosis bovina en la provincia de Zamora Chinchipe (%).	54
Figura 8. Prevalencia por razas de Anaplasmosis bovina en la provincia de Zamora Chinchipe (%).	55
Figura 9. Presencia de la enfermedad de Anaplasmosis bovina (%).	58
Figura 10. Tipo de pasto en las fincas de la provincia de Zamora Chinchipe (%).....	59
Figura 11. Consumo de agua de las fincas dela provincia de Zamora Chinchipe (%).	60
Figura 12. Sistemas de alimentación de las fincas bovinas en la provincia de Zamora Chinchipe (%).	60
Figura 13. Servicio de veterinario en la provincia de Zamora Chinchipe (%).	61
Figura 14. Toma de muestras en la provincia de Zamora Chinchipe (%). ...	62
Figura 15. Edad que enferman los animales con la Anaplasmosis bovina (%).....	62
Figura 16. Productos más usados para el control de garrapatas en las fincas bovinas de la provincia de Zamora Chinchipe (%).	63

Figura 17. Grado de infestación por garrapatas en los bovinos de la provincia de Zamora Chinchipe (%).....	63
Figura 18. Productos para el control de garrapatas (%).....	64
Figura 19. Frecuencia del uso del producto (%).....	64
Figura 20. Suspensión de leche del hato ganadero (%).....	65
Figura 21: Socialización de los resultados obtenidos, ante estudiantes del tercer módulo de la carrera de Medicina veterinaria y Zootecnia.....	66

**“DIAGNÓSTICO DE ANAPLASMOSIS BOVINA POR LOS
MÉTODOS DE GIEMSA Y ELISA INDIRECTO Y SU RELACIÓN CON
LOS VALORES SANGUÍNEOS, EN LA PROVINCIA DE ZAMORA
CHINCHIPE”**

RESUMEN

Se analizaron 61 muestras de sangre, tomadas de bovinos asintomáticos en cuatro sectores: Norte, Sur, Este y Oeste de la provincia de Zamora Chinchipe, utilizando dos tipos de tubos vacutainer con anticoagulante y sin coagulante. El diagnóstico se realizó mediante frotis sanguíneo teñido con Giemsa y la técnica de inmunoensayo iELISA (ELISA indirecto); comparando estos resultados con los valores sanguíneos mediante un hemograma realizado con la técnica QBC. La prevalencia general de Anaplasmosis bovina muestra que mediante la tinción de Giemsa es del 56 %; correspondiendo a los sectores Sur un 73 %, al Norte un 69 %, al Este un 83 % y al Oeste un 13 %; los animales menores de una año se encuentran afectados en un 77 %; siendo la prevalencia del 56 % para cada sexo; y de acuerdo a las razas un 83 % para la Mestiza; un 55 % para la Holstein; 50 % para la Jersey y el 44 % para la Brown Swiss. Por la técnica de inmunoensayo (iELISA) tenemos que la prevalencia general de Anaplasmosis es del 98%, con prevalencias en los sectores Sur, Este y Oeste del 100% y en el Norte del 94%; la prevalencia por edad, demuestra que los animales menores a 1 año y los comprendidos entre 2 - 4 años tienen una prevalencia del 100%. En cuanto al sexo, los machos presentan una prevalencia del 100% y las hembras del 98%; las razas Brown Swiss, Jersey y Mestiza presentan una prevalencia del 100% y la Holstein del 98%. Dentro de las alteraciones hematológicas se obtuvo que el 85% de muestras son normales para Hematocrito, 89% normal para Hemoglobina, 52% normal para Serie Blanca, 90% normal para Eosinófilos, 30% normal para Linfocitos y Monocitos y 30% normal para Plaquetas, indicando que las alteraciones no concuerdan con los resultados de Giemsa o con los casos positivos, lo que determina que estos animales ya cursaron con la enfermedad o son portadores asintomáticos. El 90% de los ganaderos encuestados dice tener presente la enfermedad siendo la época de verano la de mayor presencia; asimismo todos ellos conocen los síntomas. Entre los factores asociados a la presencia de Anaplasmosis bovina, podemos anotar los sistemas de alimentación, la presencia de garrapatas y otros vectores mecánicos, incluido el propio ganadero.

ABSTRACT

61 samples of blood were analyzed, taken from asymptomatic cattle in four sectors: North, South, East and West from the province of Zamora Chinchipe, using two types of vacunatainer tubes with anticoagulant and without coagulant. The diagnosis was released by blood smear which are stained with Giemsa a "staining reagent for bovine blood plates", and the immunoassay technique iELISA (ELISA indirectly) comparing these results with the blood values through the hemoglobin with the QBC technology "a technique of blood analysis". The general prevalence of bovine anaplasmosis a sample that through the staining of Giemsa is about 56% corresponding to the South side 73% for the North side, a 69%, the East side 83% and the West side with a 13%; the animals that are less than 1year old are affected with a 77%; being the prevalence of a 56%foro both sexes; and according to their breeds an 83%, for the mixed race ones a 55%, for the Holstein 50%, for the Jersey 44% and for the Brown Swiss. By the immunoassay technique (iELISA) we have the general prevalence of anaplasmosis is of 98%, with the prevalence's on the South, East and West sides of a 100%. Referring to the sex, the males present a prevalence of 100% and the females of 98%, the Brown Swiss, Jersey and Mixed races present a higher prevalence of a 100% and the Holstein a 98%. Within the hematological disorders we found that an 85% of samples are normal for the Hematocrit, 89% are normal for the Hemoglobin, 52% are normal for the White Series, 90% are normal for the Eosinophil's, 30% are normal for the lymphocytes and monocytes and 30% normal for platelets, showing that the alterations disagree with the Giemsa results or with the positive cases, which determinates that these animals have already progressed with the disease or they are asymptomatic carriers. The 90% of farmers that were surveyed say that they have presence the disease being summer the season with a higher presence, all of them know the symptoms. The factors associated with the presence of Anaplasmosis bovine, we can take note of the feeding systems, the presence of ticks and other mechanic vectors including the own livestock.

INTRODUCCIÓN

El sector agropecuario del Ecuador enfrenta nuevos y más complejos desafíos, el proceso de globalización de la economía, impone a cada país la necesidad de la especialización en aquellas producciones que le permitan una inserción estable al comercio mundial. La mayoría de los grupos sociales que tienen a cargo el manejo de los recursos naturales renovables como la fauna y la flora, son duramente golpeados por la incapacidad de proveerse de recursos técnicos para solucionar problemas epidemiológicos que se evidencian en el manejo del ganado y de plantaciones que producen bienes para la sociedad.

Desde hace más de cien años, la Anaplasmosis bovina, constituye por su importancia patológica y por su repercusión económica, una de las mayores limitantes de la ganadería en áreas tropicales (Babes, 1888; Theiler, 1908). Produce conjuntamente con sus artrópodos vectores, según estimativos de la FAO, pérdidas anuales en la ganadería tropical del mundo, en más de 7.000 millones de dólares en un número aproximado de 1.200 millones de bovinos (FAO, 1988). El tema de la Anaplasmosis bovina ha ido creciendo de tal forma que se ha convertido en uno de los principales problemas económicos a los sistemas de producción de leche y de carne.

Es considerada una enfermedad en expansión hacia áreas templadas del mundo, fundamentalmente en las zonas tropicales y subtropicales (Palmer y col., 1999). Este microorganismo presenta múltiple variabilidad antigénica, de morfología, virulencia, transmisibilidad por garrapatas y habilidad para inducir protección cruzada contra aislamientos heterólogos (Palmer y McElwain, 1995)

El Ecuador, por su situación geográfica privilegiada, con todos los climas, con la cultura de la actividad agropecuaria, es uno de los países con mayores potenciales para cumplir la función de constituirse en la despensa de los alimentos que requiere la humanidad. Las regiones de la Costa y Amazonía producen principalmente ganado de carne, mientras que el ganado lechero se encuentra, sobre todo, en la Sierra. En la Costa. Dentro de la producción pecuaria nacional, la mayor proporción corresponde a la ganadería bovina de doble propósito, es decir, para la producción de carne y leche.

En la provincia de Zamora Chinchipe se considera que la base del crecimiento económico es debida fundamentalmente al ganado bovino para leche y carne, constituyéndose en otra fuente de ingresos de la Provincia. De acuerdo al III Censo Nacional Agropecuario en Zamora Chinchipe existen 130677 animales bovinos en 6724 Unidades Productivas Agropecuarias (Upas).

Al tener esta provincia las condiciones climáticas adecuadas, se debe considerar que este tipo de explotación de ganado bovino estará sometido a experimentar todo tipo de enfermedades causales para un descenso en la producción tal es el caso de la Anaplasmosis cuyos síntomas más marcados son anemia e ictericia, la última con aparición tardía en la enfermedad. No se presenta hemoglobinemia ni hemoglobinuria, lo que puede ayudar al diagnóstico diferencial entre Anaplasmosis y Babesiosis, que a menudo es endémica en las mismas regiones.

Para este tipo de enfermedad existen un sinnúmero de formas de transmisión ya sea mecánica o biológicamente por insectos vectores pero los más comunes son por el *Boophilus annulatus*, *B. decoloratus*, *B. microplus*. Se ha demostrado como vectores mecánicos, particularmente en USA a ciertas especies de *Tabanus* (mosca del caballo) y con mosquitos del género *Psorophora*.

El presente trabajo de investigación ha permitido determinar el índice de prevalencia de una de las enfermedades más comunes en la región, así como

realizar un análisis epidemiológico de la misma, que oriente de manera más efectiva su control y ayude a reducir las pérdidas económicas.

Para la realización del presente trabajo de investigación se plantearon los siguientes objetivos:

- ✚ Determinar la prevalencia general y por sectores, edad, sexo y raza.
- ✚ Aplicar la técnica de microscopía de frotis sanguíneo con tinción Giemsa para Diagnóstico de *A. marginale*.
- ✚ Utilizar la prueba de iELISA para la detección de anticuerpos de *A. marginale*.
- ✚ Determinar las variaciones fisiológicas del hemograma, en relación al diagnóstico.
- ✚ Analizar los factores epidemiológicos relacionados con la enfermedad en estudio.
- ✚ Socializar los resultados con los ganaderos de la provincia.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANAPLASMOSIS

2.1.1 Antecedentes

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*. Sir Arnold Theiler en el año de 1910 usó el término “*Anaplasma*” para describir un pequeño microorganismo (corpúsculos) que se encontraba presente en los eritrocitos de bovinos africanos que sufrían de una anemia infecciosa aguda, fue el primero en considerar estos corpúsculos como representantes de un nuevo género de parásito y propuso el nombre de *A. marginale*, debido a la carencia de citoplasma y a su localización marginal dentro del glóbulo rojo, a la enfermedad la denominó como Anaplasmosis.

En Ecuador desde el año de 1968, se han realizado investigaciones en bovinos con el propósito de demostrar la prevalencia de Anaplasmosis utilizando diferentes métodos de diagnóstico (Soto, 2010).

Es así, que utilizando la técnica de frotis sanguíneo y la coloración de Giemsa se encontró una prevalencia de Anaplasmosis de 17,5 % en el cantón Lomas de Sargentillo de la provincia de Guayas (Villa fuerte, 2001). Mediante la técnica de Wright en el cantón Jama de la provincia de Manabí, se determinó una prevalencia de 43 % (Benítez 2003). En el cantón Antonio Elizalde de la provincia de Guayas, empleando la técnica de frotis sanguíneo coloreado con Giemsa, se encontró una prevalencia de 9 % (Arreaga 2004); mientras que

con la misma técnica en el cantón Chone de la provincia de Manabí, pudo determinarse una prevalencia de 65,20% (Villamil, 2005).

Un último trabajo realizado en Ecuador, a nivel de matadero en Quito, revela una prevalencia de 28,18% mediante la técnica de microscopía de frotis sanguíneo; el 91,71% por PCR; y, el 91,16% iELISA (Soto, 2010).

2.1.2 Generalidades

Anaplasmosis, tradicionalmente se refiere a una enfermedad de los rumiantes causada por bacterias intra-eritrocíticas obligadas del género *Anaplasma*. La enfermedad clínica es más notable en el ganado bovino, pero otros rumiantes como el búfalo de agua, bisontes, antílopes africanos y algunas especies de ciervos se pueden infectar persistentemente.

La Anaplasmosis, es una enfermedad infecciosa pero no contagiosa, se transmite por las picaduras de garrapatas o la transferencia mecánica de los eritrocitos frescos de moscas que pican o equipos quirúrgicos, tales como agujas, o el descornado, castraciones o equipos de tatuaje.

Anaplasmosis bovina se produce en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, incluyendo América del Sur y Central, los estados unidos (EE.UU.), el sur de Europa, África, Asia y Australia (The Merck Veterinary Manual, 2008). En Canadá, los controles de importación se legisló en diciembre de 1969, y en la actualidad existe una política de erradicación de la Anaplasmosis bovina.

Es una enfermedad infecciosa transmisible que afecta a los bovinos, ovinos, caprinos y algunos rumiantes salvajes el agente causal es una *Rickettsia* llamada *Anaplasma* intra-eritrocíticas que es altamente específica para el vertebrado pero no para el vector. En bovinos es el *Anaplasma marginale* la

más patógena y está se localiza en el margen del glóbulo rojo, también los bóvidos son afectados por el *Anaplasma centrale*, que causa ligera patología y se ubica en la parte central del glóbulo rojo.

Se conocen varias especies de este género y afectan a diferentes especies animales (Cuadro 1.).

Cuadro 1. *Especies del género Anaplasma*

TIPO	CÉLULAS	HOSPEDADOR	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
<i>Anaplasma phagocytophila</i>	Granulocitos	Humanos	Europa, América del norte y del sur, Norte de África
<i>Anaplasma equi</i>	Granulocitos	Equinos	Europa y estados Unidos
<i>Anaplasma platys</i>	Plaquetas	Perros	América del Norte y del Sur
<i>Anaplasma marginale</i>	Eritrocitos	Bovinos	Estados Unidos, Costa Rica, Venezuela, Colombia, Brasil, Paraguay y Argentina
<i>Anaplasma centrale</i>			
<i>Anaplasma ovis</i>	Eritrocitos	Ovinos y caprinos	Estados Unidos

Fuente: Reyna, 2009 y Blanco et al, 2007

2.1.3 Agente Etiológico

Morfología

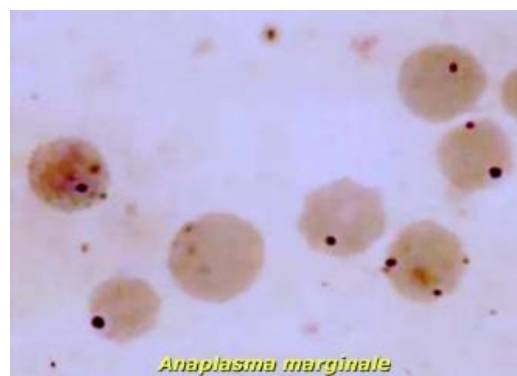


Figura 1. *Anaplasma marginale*

Anaplasma marginale es una rickettsia intraeritrocitaria gran negativa que al microscopio ofrece el espacio de una inclusión redondeada, basófilo, pequeña (0,3-0,1 μm), única o doble, generalmente localizada a lo largo del margen del eritrocito; consta de un cuerpo inicial, que invade el eritrocito y posteriormente se multiplica para formar inclusiones con 4 a 8 cuerpos iniciales, se caracteriza como todas las rickettsias, por no tener su cromatina organizada en un núcleo con membrana limitante y por carecer de retículo endoplásmico.

2.1.3.1 Taxonomía

Anaplasma marginale se consideró como un protozoo hemático durante mucho tiempo; investigaciones ulteriores demostraron que se clasifica así:

Reino: Procarionte

Grupo: Eubacteriales

Sub grupo: Protobacteria

Phylum: Ciliophora

Clase: kinetofragminophora

Orden: Rickettsiales

Familia: Anaplasmataceae

Género: *Anaplasma* (Ristic y kreier, 1984).

Especie: *Anaplasma marginale*

El análisis filogenético, utilizando secuencias se permitió esclarecer la relación dentro de los genogrupo de las especies de ehrlichias, situando a *A. marginale* dentro del árbol filogenético, en el genogrupo II de las ehrlichias, las cuales son patógenos de animales y humanos que se transmiten por garrapatas (Biberstein, 1999).

Se conocen cuatro especies del género *Anaplasma*, como agentes causantes de la anaplasmosis: *A. marginale*, que es la más patógena para los bovinos; *A. centrale*, causante de una relativa forma benigna de anaplasmosis en bovinos; *A. caudatum* también en ganado bovino y *A. ovis*, causante de un padecimiento limitado a ovinos y caprinos (Ristic y Kreier, 1984).

2.1.3.2 Caracteres morfofuncionales

Anaplasma marginale no es un microorganismo sin forma definida se establecieron tres categorías de acuerdo a su talla: el clásico cuerpo marginales, una forma intermedia cuerpo inicial y la de tamaño pequeño conocido como cuerpo polihédrico (Ristic y Watrach, 1963; Palmer y Mcguire, 1984; Ristic y Kreier, 1984).

En los hospederos vertebrados, *Anaplasma spp.*, infecta a los eritrocitos maduros con la formación de una vacuola derivada de dichos eritrocitos, alrededor del organismo (Francis y col., 1979). Cada organismo tiene un diámetro de 0.55- 0.85 μm y contiene los cuerpos iniciales que consisten en agregados granulares densos rodeados por una doble membrana de 40-50 μm de espesor. El microorganismo se replica dentro del eritrocito por fisión binaria para formar hasta ocho organismos individuales dentro de una vacuola simple (Ristic y Watrach, 1963; Palmer y Mcguire, 1984; Ristic y Kreier, 1984). Posteriormente, los organismos salen del eritrocito, utilizando mecanismos aparentemente no líticos e infectan los eritrocitos adyacentes.

El cuerpo inicial se encuentra dentro de los glóbulos rojos en número variable y está formado por material fibrilar y varios gránulos electro densos que contienen ADN, ARN y hierro orgánico, rodeados por una doble membrana, estos cuerpos iniciales, a la vez, son limitados por una vesícula

intracitoplasmática, constituida por una sola membrana, y que también posee material fibrilar, nombrada cuerpo de inclusión (Ristic y kreier, 1984).

Nakamura y *col.*, (1989) demostraron la presencia de carbohidratos en la superficie de los cuerpos iniciales de *A. marginale*, pero al parecer éstos no son importantes en la hemaglutinación de los cuerpos iniciales, ya que cuando se trató con NaIO_4 o neuroaminidasa, no se encontraron diferencias con respecto al control; esto sugiere que aparentemente los carbohidratos de superficie de los cuerpos iniciales no juegan un papel importante en la adhesión de *A. marginale*.

Cuando se trataron los eritrocitos bovinos con α quimotripsina o neuroaminidasa, fue evidente la pérdida de la hemaglutinación, no así cuando se siguió el tratamiento con tripsina y varias fosfolipasas, lo que sugirió que el ligando del receptor de los eritrocitos está compuesto parcialmente por proteína y/o ácido siálico (McGarey y Allred, 1994).

Este hemoparásito se caracteriza además, por producir catalasas, no producir pigmentos y no formar esporas u otros estados de resistencia. es sensible a la tetraciclina e insensible a las penicilinas, sulfonamidas, estreptomycinina y arsenicales, su inefectividad puede ser destruida al exponerlo a 60°C , al menos por 50 minutos y a rayos x o a sonicación a 35°C por 90 minutos (Ristic y Kreier, 1984).

En Brasil se detectaron y aislaron cepas de *A. marginale* con un apéndice de inclusión. El mismo presenta estriaciones longitudinales electrodensas y no se origina directamente del cuerpo de la *rickettsia*, sino de un complejo localizado en la unión entre la membrana de inclusión y el apéndice. Este apéndice permanece en las células huéspedes, incluso aún después que *A. marginale* abandonan los glóbulos rojos (Ribeiro y Passos, 1996; Stich y *col.*, 1997).

A. marginale se logró cultivar, pero por cortos períodos de tiempo, mediante la propagación del parásito en un cultivo de una línea celular derivada de embriones de garrapata *Dermacentor variabilis*, pero para poder mantener el crecimiento se necesitaron realizar pases continuos, pues este microorganismo requiere para su propagación de células hospederas con una alta actividad de crecimiento y multiplicación y un medio con suero fetal bovino (Hidalgo y col., 1989). Sin embargo, Munderloh y col., (1996), lograron propagar continuamente esta *Rickettsia* en una línea celular derivada de *Ixodes scapularis*, usando como inóculo sangre de bovino infectado. Un segundo aislamiento, derivado de vacas naturalmente infectadas en Oklahoma, se propagó en la misma línea celular de garrapata, lo que tiene potencialidad para ser utilizado como antígeno para el desarrollo de una vacuna mejorada contra la anaplasmosis en los estados unidos (Blouin y col., 1998).

2.1.4 Descripción de la Enfermedad

La Anaplasmosis es una enfermedad, infecciosa, aguda a crónica, caracterizada por presentar anemia, ictericia y fiebre, que parasita los eritrocitos maduros del ganado bovino se exterioriza en los rumiantes domésticos y salvajes, ha sido descrita en el Reino Unido, Irlanda, Noruega, Finlandia, Holanda, Austria, suiza, India y Sudáfrica, el agente causal es una *Rickettsia*, *Anaplasma marginale*, que invade los glóbulos rojos produciendo luego la destrucción de los mismos, es una enfermedad de importancia ya que se presenta en todos los pisos térmicos, causando cuantiosas pérdidas económicas. Este microorganismo presenta múltiple variabilidad antigénica, de morfología, virulencia, transmisibilidad por garrapatas y habilidad para inducir protección cruzada contra aislamientos heterólogos (Palmer y McElwain, 1995).

Se conocen varias especies de este género las cuales pueden afectar diferentes células y a diferentes especies animales (Cuadro 1.). Se han caracterizado seis proteínas de superficie de membrana de los cuerpos iniciales de este organismo, portadoras de epitopes b y t, denominadas proteínas mayoritarias de superficie (msps) y designadas 1a, 1b, 2, 3, 4 y 5. Estas proteínas son reconocidas por anticuerpos neutralizantes y se encuentran en una estrecha relación intermolecular en la superficie de la membrana de los cuerpos iniciales. Algunas de estas proteínas inducen una protección total o parcial en animales vacunados, aunque el nivel y la uniformidad de la misma, es variable (Palmer y Mcelwain, 1995).

A pesar de las cuantiosas pérdidas económicas producidas todos los años, a nivel mundial hasta el momento no se cuenta con un método de control eficaz contra la enfermedad, por lo que resulta de gran importancia desarrollar una vacuna capaz de prevenir la infección con este patógeno y contar con técnicas de diagnóstico más sensibles y específicas que permitan la detección de animales portadores para ser utilizadas en estudios epizootiológicos y para el control de la enfermedad.

2.1.5 Patogenia

Es una bacteria intracelular 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 (Figueroa *et al.*, 1993a).

El periodo pre patente durante la incubación de la enfermedad es de dos a tres semanas y la duración depende de la cantidad de organismo infectante (Medellín, 2003). La infección puede detectarse por microscopia entre 20 y 40

días después de la transmisión, dependiendo del número de microorganismos transmitidos y de la virulencia (Bautista, 1996).

2.1.6 Transmisión de la Enfermedad

La enfermedad puede ser transmitida por artrópodos hematófagos tales como algunos géneros de garrapatas como: *Ixodes ricinus*, *Boophilus microplus*, *Dermacentor* y *Amblyomma*, la transmisión por garrapatas puede ser mecánica o por larvas de garrapatas hinchadas de sangre de animales infectados (<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040405/040511.pdf>).

2.1.6.1 Transmisión biológica

La transmisión del microorganismo a través de las diferentes especies de garrapata puede ocurrir de forma transestadial, es decir, de larvas a ninfas y de ninfas a adultos (Kocan y col., 1981; Kocan y col., 1986); además puede ocurrir del estado de larva a adulto sin reexposición en el estadio como ninfa y por adultos machos que se transfieren del ganado infectado a otro susceptible.

La enfermedad tiene un período de incubación promedio de aproximadamente 30 días, seguido de una etapa aguda de una semana de duración durante la cual se multiplica activamente dentro de los eritrocitos.

2.1.6.2 Transmisión mecánica

En donde se introducen directamente los eritrocitos infectados, ya sea por inoculación natural a través de picaduras de artrópodos hematófago como: las moscas entre ellas la mosca caballos (*tábanos*), moscas de establo (*Stomoxys*) y el hombre, es sumamente importante en la difusión de la enfermedad. Hay casos en los cuales los brotes infecciosos se han dado después de operaciones en masa, como descornados, castraciones y

vacunaciones, además la transmisión vertical de tipo placenta-feto, cuando la madre sufre anaplasmosis aguda (Zaugg, 1990); este autor demostró que *A. marginale*, podía en el segundo y tercer trimestre de gestación, atravesar la barrera placentaria e infectar al feto y que probablemente esto no sucedía dentro de los eritrocitos, sino que era una fase extra eritrocitaria del parásito. Según Rey y col., (2003), la vía de transmisión transplacentaria debe ser tomada en cuenta como factor de riesgo en zonas donde la anaplasmosis es endémica.

2.1.7 Síntomas de la Enfermedad

Un animal infectado no presenta síntomas clínicos hasta que más de un 15 % de los eritrocitos no hayan sido parasitados, en ese momento, la parasitemia comienza a incrementarse geométricamente y posteriormente los eritrocitos infectados se eliminan del torrente circulatorio mediante fagocitosis por las células del retículo endotelial del bazo, hígado y nódulos linfáticos; induciéndose el desarrollo de una fase de inflamación aguda. La subsecuente fiebre, temperaturas de hasta 41°C, es el primer síntoma clínico de la enfermedad (Richey y Palmer, 1990).

2.1.7.1 Fase aguda

La subsecuente fiebre, temperaturas de hasta 41°C, es el primer síntoma clínico de la enfermedad (Richey y Palmer, 1990).

2.1.7.2 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 por ml. Estas últimas consecuencias ocurren con frecuencia al cabo de las 24 a 36 horas del pico de parasitemia (Richey y Palmer, 1990).

2.1.7.3 Fase crónica

Los animales que sobreviven a esta fase disminuyen drásticamente la parasitemia y desarrollan una marcada respuesta regenerativa a la anemia. Los parámetros hematológicos retornan gradualmente a valores normales luego de muchas semanas (Swift y Thom, 1983), frecuentemente siguen siendo portadores de por vida a estos animales se los conocen como “portadores asintomáticos”, en esta fase es difícil de diagnosticar la enfermedad por los métodos tradicionales (Viseshakul, 2002).

Los animales sobrevivientes a la infección inicial se convierten en los principales portadores de la rickettsia; este fenómeno está bien documentado. Una vez resuelta la rickettsemia inicial, se detectan altos niveles de anticuerpos específicos para variantes de la MSP-2 y MSP-3.

Existen dos variantes de MSP2 que se expresan también en las glándulas salivales de las garrapatas SVG 1 y SVG 2, sin embargo, posterior a este evento y a un largo ciclo de aproximadamente 6 semanas, surgen pequeños incrementos en el número de rickettsias circulantes que corresponden a la presencia de 2 a 3 variantes antigénicas de MSP2, a las que se les atribuye la capacidad para evadir el sistema inmune. Una semana posterior al surgimiento de estas variantes, se presenta un nuevo pico de anticuerpos específicos para cada variante, y esta es muy probablemente la causa, por la que hayan fallado los experimentos encaminados a verificar la capacidad protectora del suero inmune de animales hiperinmunes (<http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol9/CVv9c5.pdf>)

2.1.8 Epidemiología de la Enfermedad

Anaplasma marginale se distribuye en todo el mundo en regiones tropicales y subtropicales del Nuevo Mundo, Europa, África, Asia y Australia. En los EE.UU. la anaplasmosis bovina es enzoótica en los estados del sur del Atlántico, los estados del Golfo y varios de los estados del medio oeste y oeste (McCallon, 1973). Excepto para el estado de Hawái que se considera libre de

anaplasmosis bovina, la enfermedad ha sido reportada en casi todos los estados en los EE.UU. Esta amplia distribución y el aumento de probabilidad el resultado de un aumento de transporte de ganado con la subsiguiente transmisión mecánicos o biológicos de animales persistentemente infectados asintomáticos a los susceptibles (Kocan et al., 2009).

Cuadro 2. Prevalencia de anaplasmosis en el Continente Americano.

País	Prevalencia %	Técnica	Autor
Estados Unidos Luisiana	5,6	CT	Hugh - Jones et al (1998, citado por Kocan et al 2003)
Estados Unidos Oklahoma	4,7 - 17,6	CF	Rodgers et al (1994, citado por Kocan et al 2003)
Costa Rica	61 – 90	cELISA, PCR	Herrero et al (1998, citado por Kocan et al 2003)
Venezuela	57,7	IFA	Meléndez y Forlano (1997, citado por Kocan et al 2003)
Colombia	64 - 100	IFA	Otte (1992, citado por Kocan et al 2003)
Brasil	67,3	IFA	Vidotto et al (1997, citado por Kocan et al 2003)
Paraguay	92	CT	Payne y Osori O (1990, citado por Kocan et al 2003)
Argentina	7 – 61	Frotis sanguíneo	Lignieres (1998, citado por Kocan et al 2003)
Jamaica	69,9	CT	McGinnis et al (1998, citado por Kocan et al 2003)
Antillas Menores	18 – 71	Dot ELISA	Camus y Montenegro-James (1994, citado por Kocan et al 2003)

Fuente: Soto, 2010

2.1.9 Diagnóstico

El diagnóstico de la anaplasmosis se dificulta debido fundamentalmente a lo difícil de detectar los 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 (Aboytes-Torres y Buening, 1990; Masika y col., 1997). 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 positiva del eritrocito parasitado, diferencia estas otras enfermedades hemolíticas de la anaplasmosis clínica (Richey y Palmer, 1990). La detección del organismo o sus antígenos distingue a los animales con infección aguda, de aquellos que tengan anticuerpos provenientes de una infección anterior o de una vacunación, además de tener la ventaja de poder cuantificar la parasitemia. Entre los métodos utilizados podemos citar la subinoculación de eritrocitos infectados en animales esplenectomizados, la tinción de Giemsa a los frotis de sangre, ELISA que detecta antígeno y las técnicas moleculares, como hibridación de ácidos nucleídos y PCR (World Organization for Animal Health, 2000).

2.1.9.1 Identificación del Agente

a. Tinción con Giemsa a los frotis de sangre

Es un método confiable, barato y capaz de detectar niveles de parasitemia de 0.1 a 0.2% (Eriks y col., 1989), o sea sólo puede detectar niveles mayores a 106 eritrocitos infectados por mililitro de sangre (Gale y col., 1996), 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 y Ambrosio, 1987).

Giemsa es el método más común para identificar *Anaplasma* en animales con infección clínica.

En estos frotis, *A. marginale* aparece dentro de los eritrocitos como cuerpos densos y redondeados de 0.3–1.0 μm de diámetro, la mayor parte de ellos situados en la zona marginal del eritrocito o en su proximidad. *Anaplasma centrale* es aparentemente similar, pero la mayor parte de los microorganismos se sitúan lejos del margen del eritrocito. Puede resultar difícil diferenciar entre *A. marginale* y *A. centrale* en un frotis teñido, sobre todo, con bajos niveles de rickettsia. En algunos países existen colorantes comerciales que permiten una tinción rápida de Anaplasma.

La tinción mediada por anticuerpos puede ser utilizada como una técnica de tinción alternativa. Su mejor aplicación es para detectar *A. marginale* en muestras de sangre tomadas post-mortem para lo que muestra ser más sensible que la tinción con Giemsa para este propósito (Johnston y col., 1980).

b. Elisa

El ensayo Elisa desarrollado para detectar antígeno, utilizando anticuerpos monoclonales para epitopes conservados de la proteína de superficie msp1, logró discriminar entre anaplasmosis y otras enfermedades hemoparasíticas clínicamente similares, sin embargo, la sensibilidad de este ensayo no fue mayor de 0.01 (1,1 % de parasitemia), por lo que la prueba no resultó idónea para la detección de portadores (Trueblood y col., 1991).

I. ELISA competitivo (cELISA)

Tiene por objetivo determinar la concentración de Ag o Ac, en el caso de la determinación de Ac, se basa en la competencia que se establece entre el anticuerpo de la muestra y el conjugado para ocupar sitios reactivos en el antígeno fijado. En este ELISA (Figura 1.) tanto la muestra que contiene el anticuerpo como el conjugado se agrega al mismo tiempo. Si la concentración de anticuerpos en la muestra es alta muy poco conjugado puede fijarse en los antígenos inmovilizados, por lo tanto habrá ausencia de coloración por la poca fijación de la enzima con el sustrato. Inversamente con muestras que contienen poco o nada de anticuerpos, más conjugado se fijará al antígeno y la posterior adición de sustrato producirá la presencia de color (Docstoc, 2009).

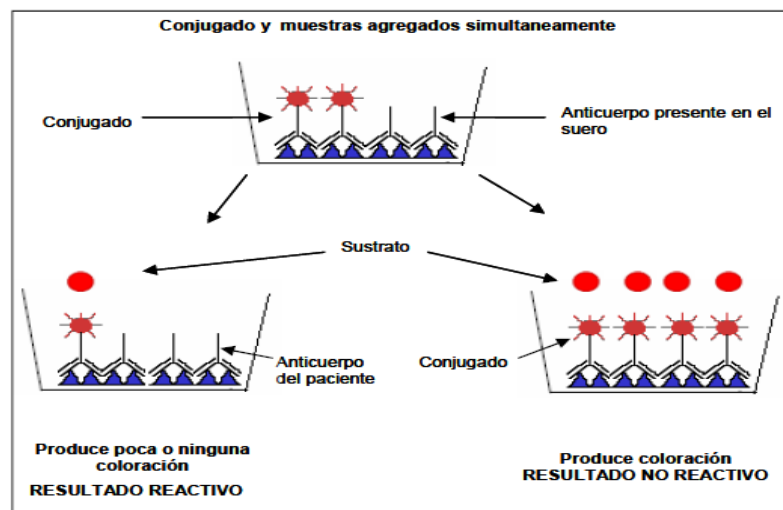


Figura 2. Principio de la prueba de cELISA (Docstoc, 2009).

II. ELISA no competitivo

✚ ELISA directo (dELISA)

Esta prueba es generalmente de tipo sándwich, permite la detección de antígenos, consiste en ligar un anticuerpo monoclonal a una fase sólida (pocillo, esfera plástica) el cual capta al antígeno presente en el suero. A

continuación se agrega el conjugado (Ac policlonal marcado con una enzima) y se promueve el desarrollo de color tras la adición de sustrato.

✚ ELISA indirecto (iELISA)

Se basa en la fijación de un antígeno en la fase sólida (Figura 2.), el cual atrapa los Ac de la muestra sanguínea que posteriormente son identificados por el conjugado, que al reaccionar con el sustrato dará la reacción de color. En estos casos la cantidad de Ac es directamente proporcional a la cantidad de producto enzimático formado, por lo cual se produce más color a medida que la concentración de Ac aumenta en la muestra dando lecturas de densidad óptica altas y viceversa (Docstoc. 2009).

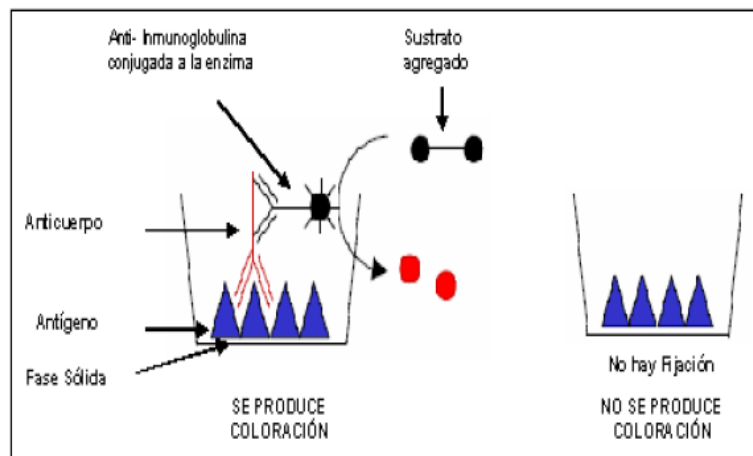


Figura 3. Principio de la prueba de ELISA indirecto (Docstoc. 2009).

Para la detección de sueros positivos frente a *A. marginale* se ha diseñado un método iELISA, basado en la utilización de dos preparaciones de Ag, una “negativa” de Ag normal de eritrocitos y de una “positiva” de Ag derivados de eritrocitos infectados por *A. marginale*, Aunque este método es más lento que las otras pruebas que utilizan un solo Ag, esta prueba reduce notablemente las reacciones cruzadas que son el resultado de isoantígenos.

La prueba identificó correctamente los 100 sueros positivos conocidos tomados de ganado bovino hasta después de 3 años de la infección, mientras

que el 3% de sueros negativos, el 2% de sueros de *Babesia bovis* y el 4% de sueros de *B. bigemina* dieron falsos resultados positivos (Duzgun et al., 1988).

Hasta el presente se han caracterizado 6 proteínas mayoritarias de superficie (MSP) de esta bacteria, de las cuales la MSP5, ha sido señalada como un excelente polipéptido para el diagnóstico de la enfermedad, debido a que esta proteína es altamente conservada e inmunogénica.

Esto ha motivado su clonamiento e inserción en un plásmido de *E. coli*, para usarla purificada como antígeno en ensayos inmunoenzimático. Sin embargo, estudios posteriores, indican que proteínas de *E. coli* recombinante que eluyen conjuntamente con la MSP5 durante el proceso de purificación, interfieren en el ELISA originando falsos positivos. En el presente trabajo se estandarizó un ELISA indirecto, utilizando la MSP5 como antígeno y se logró disminuir las uniones inespecíficas a las proteínas contaminantes de *E. coli*, por adición de un suero de conejo anti *E. coli* que bloquea los epítopes de estas proteínas.

A través de un cuadro de contingencia de doble entrada, se determinaron los parámetros de validación del ELISA al compararla con la técnica de naranja de acridina-bromuro de etidio, obteniéndose como resultado que la técnica de ELISA mejorada es 96,1% sensible, 9% específica y presenta un valor predictivo del 88,6%. Además, se estudió una población bovina de 48 mautes de la Estación Experimental La Iguana (estado Guárico), utilizando ambas técnicas, obteniendo una seroprevalencia de 93,7% por ELISA y una prevalencia de 54,1% por naranja de acridina-bromuro de etidio.

Estos resultados muestran que el bloqueo de los epítopes de las proteínas de *E. coli* contaminates, utilizando para ello un suero de conejo anti-*E. coli*, permite disminuir los falsos negativos cuando se utilizan proteínas recombinantes (http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-22592007000400006&script=sci_abstract).

✚ **MSP1** es una proteína está compuesta de dos polipéptidos heterogéneos no relacionados, MSP1a, que está codificada por el gen *mSP1a* y MSP1b codificado por al menos dos genes *mSP1β I* y *mSP1B2*. También se ha reportado que esta proteína contiene un epítipo sensible a la neutralización. Se ha reportado que la inmunización con el complejo MSP1 induce protección al desafío homólogo y en menor grado al desafío heterólogo, esto quizá se deba a que en estudios funcionales de este complejo se demostró que ambas fracciones fungen como receptores para los eritrocitos; más recientemente, se demostró también que este complejo tiene la capacidad de adherirse a células de garrapata en cultivo *in vitro* y células del intestino de *Dermacentor variabilis*. Por otro lado, el estudio de un aislado de *A. marginale* en cultivo no mostró que exista presión para que el organismo presente variabilidad en estas y otras proteínas de superficie.

✚ **MSP2** es una proteína que cuando se aísla de extractos crudos de la rickettsia, es capaz de inducir una respuesta parcialmente protectora contra aislados homólogos y en menor grado contra aislados heterólogos, cuando se inocula a animales menores de un año. Este polimorfismo está íntimamente relacionado con la permanencia de *A. marginale* en los animales portadores ya que aun cuando se recuperan de una primo-infección, sí la rickettsia no es eliminada entonces, surgen variantes de la misma (variantes de MSP2) que permiten a la rickettsia iniciar un nuevo ciclo de rickettsemia que no es reconocido por los anticuerpos específicos generados en el hospedero cuando se presentó la primo-infección y que será terminada abruptamente cuando se genera una nueva respuesta de anti cuerpos capaz de reconocer y eliminar las nuevas variantes, de esta forma se han determinado que surgen de 3 a 6 variantes de MSP2 cada 6 a ocho semanas en animales portadores, es. La presentación de variantes se ha observado también durante la infección de la rickettsia a sus hospederos vectores, cuando se reproduce en células de intestino de garrapatas, sin embargo el perfil de la MSP2 que llega a la glándula salival

del vector parece estar restringido a dos variantes en *Dermacentor andersoni*, de manera que al momento de alimentarse, siempre se transmiten al bovino dos variantes de MSP2 (*salivarygland variant-1 SGV1* y *SGV2*) hablando de un mismo aislado, estas mismas variantes son las que se presentan en la rickettsia que se desarrolla en forma aguda durante la primo-infección por garrapatas en el nuevo hospedero

- ✚ **MSP3** es una proteína que se presenta en forma polimórfica dentro de una misma infección y entre aislados. Los estudios genéticos de esta proteína han demostrado que está codificada por una familia multigénica que se expresan en forma cíclica en un solo animal, que comparte secuencias con MSP2 y con MSP4 y además se especula que parte de la variabilidad de MSP3 y MSP2 deriva de la posible recombinación. Entre los genes que codifican por estas dos proteínas. Desafortunadamente no todos los sueros de animales infectados son capaces de reconocer esta proteína

- ✚ **MSP4** es una proteína que está codificada por un solo gene y los anticuerpos monoclonales reconocen el homólogo de esta en aislados de diferentes regiones geográficas distantes, pero no se han detectado homólogos en otras rickettsias (*A. ovis*, *Ehrlichia ruminantium* etc.) y no todos los sueros de animales infectados con *A. marginale* reconocen con la misma intensidad a esta proteína, por lo que se considera que no es un candidato adecuado para la inmunización de animales contra la anaplasmosis

- ✚ **MSP5** es una proteína que se ubica en la superficie de la rickettsia, y está codificada por un solo gen, lo que indica que debe tener una función de importancia en la conservación de la especie; se ha reconocido su homólogo en todos los aislados geográficos hasta ahora probados y estructuralmente se presenta en forma multimérica, y unida por puentes disulfuro que le ayudan a mantener su conformación terciaria, necesaria para su reconocimiento por anticuerpos de bovinos expuestos a la rickettsia, también se expresa en garrapatas infectadas, que sirve para

diagnóstico en bovinos y vectores. Dada su amplia presencia en todos los aislados hasta ahora estudiados, se ha usado con éxito en ensayos diagnósticos en diferentes partes del mundo

c. Fijación del complemento

Esta prueba utiliza el proceso estándar de fijación del complemento. El antígeno consiste de cuerpos de *Anaplasma* que han sido separados del eritrocito por lisis, aunque se utiliza también una técnica que requiere solo pequeñas cantidades de los reactivos (Avon, 1974).

d. Inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos (IFI)

Esta prueba ha sido utilizada 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 período de incubación de esta enfermedad (Goff y *col.*, 1988).

e. PCR

Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad, virus o bacterias causantes de una enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado. Estos usos derivados de la amplificación han hecho que se convierta en una técnica muy extendida, con el consiguiente abaratamiento del equipo necesario para llevarla a cabo.

2.1.10 Control de la Enfermedad

2.1.10.1 Control de garrapatas

el acceso a las garrapatas se puede reducir manteniendo el ganado susceptible en pastos no infestados, especialmente las hembras gestantes, o bien mediante el uso de acaricidas sobre los propios animales, en baños o aspersión, una vez han alcanzado suficiente tamaño y longitud de pelo o vellón para que el efecto sea duradero. Obviamente las avermectinas son también una posibilidad atractiva. 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 (Ortiz, Corona, & Martínez, 2000).

2.1.10.2 Inmunización

Aunque no se han conseguido vacunas eficaces, los vacunos adquieren inmunidad tras pasar la enfermedad clínica. La inmunidad dura varios meses y declina pronto si no se re estimula, pero siempre mantiene una eficacia residual, de modo que las re infecciones son más benignas y la inmunidad residual más duradera. Por ello una práctica utilizada cuando las condiciones lo permiten es infectar los animales y tratarlos con tetraciclina al comenzar la fiebre, lo que permite que el agente se multiplique lo bastante para lograr una inmunidad eficaz evitando los riesgos de una infección incontrolada.

2.1.10.3 Resistencia natural

La resistencia de los animales a la anaplasmosis como en otras enfermedades se puede clasificar como resistencia natural, que a su vez puede ser dependiente del sexo, de la edad o aún de la raza, de la misma forma se considera que a menor edad la presentación del cuadro clínico será más leve, sin embargo estos animales no son refractarios a la infección, lo que se ha probado mediante el ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa, con la que se ha demostrado que animales menores de 3 meses son portadores de la rickettsia aun cuando no presentan signos clínicos.

Los mecanismos que evitan la presentación de los signos clínicos se desconocen ya que aun cuando se ha propuesto la mediación de factores solubles derivados de células T de terneras infectadas, estos factores no pudieron ser caracterizados en detalle. Más recientemente se postuló que la ausencia de células T (linfocitos cooperadores CD4 +) de bazo, ganglios linfáticos podría abrogar esta resistencia, sin embargo animales con estas características no presentaron signos clínicos cuando fueron infectados en forma experimental, sin embargo se pudo observar una rickettsemia transitoria junto con alteración en los valores de hematocrito.

Estos resultados no eliminan la posibilidad de que otros mecanismos celulares no caracterizados, puedan contribuir a la inhibición de la presentación de los signos, como se ha observado para babesiosis, donde la rápida estimulación de interleucina (IL) 12, interferón g y producción de ácido nítrico en el hígado contribuyen a la resistencia a la presentación de signos clínicos aun cuando tampoco se evita la infección.

Fenómenos de resistencia relativos a la raza de los animales se han reportado, más bien en términos de especie, es decir en animales Bos Taurus (bovinos tipo europeo) o Bos Indicus (tipo cebuino). La resistencia en relación al sexo se ha reportado más en virtud del daño que la enfermedad ocasiona

en sementales los cuales pierden su capacidad para reproducirse, que en términos de verdadera resistencia de un sexo sobre otro a la anaplasmosis.

2.1.10.4 Tratamiento

Las tetraciclinas son muy eficaces curativa y preventivamente, tanto en las formulaciones de larga duración como en las de acción breve. Puede usarse también la sulfametacina.

2.2 HEMOGRAMA BOVINO

2.2.1 Introducción

El hemograma es un examen relativamente simple y en algunas situaciones nos ayuda en la evaluación diagnóstica. Este examen entrega datos sobre hematocrito (Hto), concentración de la hemoglobina (Hb), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), volumen corpuscular medio (VCM), recuento de eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Además, nos entrega información sobre la dispersión del tamaño de los eritrocitos (RDW) (*Red blood cell distribution width*), el que se expresa en % y representa el coeficiente de variación de tamaños de los eritrocitos.

Los valores hematológicos resultan de gran interés en el laboratorio, ya que ellos constituyen una referencia adicional para el clínico que debe valorar los cambios cuantitativos y cualitativos que sobre estos provocan sustancias las cuales influyen en el fisiologismo animal, ya sea de forma favorable o indeseable (Vega y Figueredo, 2005).

Varios son los factores que pueden provocar alteraciones no patológicas en hematología veterinaria entre los cuales se encuentran: toma de la muestra, excitación o temor del animal en el momento de la extracción, velocidad de extracción, sujeción química, ejercicio previo, especie, raza, sexo, estado

fisiológico y edad (Giménez, 2006). En la actualidad unas de las técnicas más empleadas en la clínica para precisar procesos patológicos o fisiológicos en el organismo animal es el hemograma. Varios autores han reportado el cuadro hematológico para el ganado bovino (Schalm et al., 1975; Schaffer et al., 1981; Quincosa y Alvarez, 2006).

Es de imprescindible importancia conocer los valores normales fisiológicos en que se pueden mover estos parámetros sanguíneos para diferenciarlos de procesos patológicos que pueden estar afectando (Vega y Figueredo, 2005) y aumentar la calidad en la interpretación de los resultados del hemograma. En la serie eritrocítica se ha encontrado variaciones fisiológicas causadas por la edad (Giménez, 2006). En relación con el sexo estas variaciones se presentan sobre todo en los animales adultos con los mayores valores en el macho (Vega y Figueredo, 2005; Quincosa y Alvarez, 2006).

En cuanto a la serie leucocítica se muestran variaciones fisiológicas en el conteo de los leucocitos totales según la raza, sexo y estado fisiológico que tenga el animal (Giménez, 2006). Como podemos observar varios estudios ya se han realizados sobre el tema del hemograma, el cual ha sido necesario retomarlo nuevamente debido a que se pretende tener un análisis lo más específico sobre la vaquería para ponerla bajo un sistema de máxima productividad.

2.2.2 Interpretación del Hemograma para su aplicación

El hemograma es una prueba que sirve para orientar hacia el diagnóstico de diversas enfermedades que se han sospechado por la historia clínica y la exploración física. A veces, los datos que nos da son suficientes para confirmar o descartar la enfermedad sospechada, pero con frecuencia se necesita utilizar otras pruebas diagnósticas que aporten más información. El hemograma puede ser útil para el diagnóstico de ciertas enfermedades

como para otras no brindar información alguna, por lo que lo consideramos como un apoyo paraclínico luego de haber realizado un correcto método diagnóstico, en cuanto a anamnesis, exploración clínica y patología se trata.

El método de exploración clínica y la patología son la base para llegar a un diagnóstico correcto, el hemograma es un apoyo. Por ejemplo, en casos de enfermedades causadas por hematozoarios; la historia de garrapatas junto con la sintomatología clínica de decaimiento general y fiebre en el animal nos lleva a realizar un hemograma, que con la información que este nos brinda de anemia y por frotis la visualización de los parásitos intracelulares nos ayuda a dar un diagnóstico definitivo.

2.2.2.1 Fórmula roja

Los valores Hto y Hb se relacionan al número y cantidad de Hb de los eritrocitos. Cuando estos valores están disminuidos en más de 2 DE respecto al promedio, según la edad se habla de anemia. Si el Hto y la Hb están aumentados se habla de la policitemia, que puede ser primaria (policitemia vera) o secundaria (enfermedad cardiaca, cianótica, tumores cerebrales, renales, etc.).

La determinación de la fórmula roja se compone de los siguientes parámetros:

- A.** Hematocrito (Ht): Es el porcentaje de la sangre que está compuesta por eritrocitos.
- B.** Hemoglobina (Hb): Es determinada la cantidad de esta proteína expresada en g/dl.
- C.** Conteo eritrocítico (Eri): Es la cantidad total de eritrocitos circulantes por micro litro de sangre.

Algunos factores que afectan hematocrito, hemoglobina y conteo eritrocítico son:

- a. Cambios que inciden directamente en la circulación de eritrocitos; anemia y policitemia absoluta o relativa.
- b. Cambios en el volumen plasmático; deshidratación y anemia.

2.2.2.2 Fórmula blanca

Dentro de las alteraciones cuantitativas en el número de glóbulos blancos se ha de diferenciar entre aquellas que afectan a toda la población leucocitaria (leucocitosis y leucopenia) y aquellas donde únicamente un subtipo celular es el que sufre un aumento o reducción en su número.

- a. Neutrofilia: El aumento en el número de neutrófilos sanguíneos puede aparecer de manera fisiológica y por cortos periodos de tiempo en respuesta al estrés (a excepción del gato, donde este hecho provoca linfocitosis y no neutrofilia).
- b. Neutropenia: Normalmente la neutropenia es la principal causa de leucopenia en pequeños animales y es característica de procesos que cursan con inmunodeficiencia (en la inmunodeficiencia felina la neutropenia es un hallazgo constante en animales infectados).
- c. Linfopenia: Suele aparecer como consecuencia de un aumento de corticoides endógeno (típico leucograma de estrés, con neutrofilia y linfopenia) o exógeno, por estrés prolongado o por enfermedades víricas que conllevan aplasia medular (acompañándose de leucopenia generalizada).
- d. Monocitosis: Se suele asociar a cuadros donde aparece un daño tisular muy extenso y grave o bien a procesos piogranulomatosos.
- e. Eosinofilia: Se describe en animales con dermatitis atópica por picadura de pulgas, complejo eosinofílico del gato, endoparasitosis gastrointestinales, etc.

- f. **Basofilia:** Es bastante rara y comparte etiología con la eosinofilia, ya que suelen cursar juntas. Puede encontrarse de manera secundaria a alergias, dirofilariosis, mastocitosis sistémica, leucemia basofílica, etc.

2.2.3 Valores sanguíneos normales de bovinos

Cuadro 3. Valores normales del conteo hemático.

Componente	Unidad (S.I.)	Bovino
Hematocrito	$\times 10^{-2} \text{ l/l}$	24-46
Hemoglobina	$\times 10 \text{ g/l}$	8-15
Eritrocitos	$\times 10^{12} \text{ /l}$	5-10
Recuento plaquetas	$\times 10^{11} \text{ /l}$	1-8
Leucocitos	$\times 10^9 \text{ /l}$	4-12
Linfocitos	$\times 10^9 \text{ /l}$	2-7
Monocitos	$\times 10^9 \text{ /l}$	0.02-0.85
Eosinófilos	$\times 10^9 \text{ /l}$	0-2.4
Basófilos	$\times 10^9 \text{ /l}$	0-0.2

Fuente: *Mundo Pecuario; Sanidad Animal, Valores Hemáticos Normales (2010)*

2.3 TRABAJOS REALIZADOS SOBRE EL TEMA

Utilizando la técnica de frotis sanguíneo y la coloración de Giemsa se encontró una prevalencia de anaplasmosis de 17,5 % en el cantón Lomas de Sargentillo de la provincia de Guayas (Villafuerte, 2001; citado por Soto, 2010).

Soto, 2010; mediante PCR, Elisa y Microscopía de frotis sanguíneos en la Empresa Metropolitana de Rastro de Quito, encontró prevalencias de 91,71 %, 91,16 y 28,18 respectivamente.

Chamba, 2011; encontró una prevalencia de anaplasmosis y piroplasmosis de 93,7%, en el cantón Centinela de Córdor de la provincia de Zamora Chinchipe, mediante la técnica de coloración de Giemsa.

Miles 2013, encontró una prevalencia de anaplasmosis del 71%, en el cantón Nangaritza de la provincia de Zamora Chinchipe, mediante la técnica de coloración de Giemsa.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Materiales de Campo

- ✚ 61 Bovinos
- ✚ Overol y botas
- ✚ Tubos vacutainer para muestreo de sangre con EDTA y sin EDTA
(Ácido etildiaminotetraacético)
- ✚ Agujas hipodérmicas
- ✚ Termo para conservación de muestras
- ✚ Algodón y alcohol
- ✚ Lápiz dermatográfico
- ✚ Placas portaobjetos para frotis sanguíneos
- ✚ Registros de campo

3.1.2 Materiales de Laboratorio

- ✚ Placas portaobjetos
- ✚ Aceite de inmersión
- ✚ Giemsa
- ✚ Microscopio
- ✚ Kit QBC
- ✚ Reactivo ELISA Indirecto (iELISA)
- ✚ Pipetas de precisión
- ✚ Puntas de pipetas desechables
- ✚ Agua destilada desionizada
- ✚ Frasco lavador o lavador de placas
- ✚ Envase: 1 a 2 litros para PBS-tween
- ✚ Fotómetro de microplacas, filtro de 405 nm
- ✚ Incubador térmico

3.1.3 Materiales de Oficina

- ✚ Ordenador
- ✚ Impresora
- ✚ Papel bond
- ✚ Calculadora
- ✚ Lápices
- ✚ Esferográficos
- ✚ Registros

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Ubicación del Proyecto

La presente investigación se desarrolló en la provincia de Zamora Chinchipe, la cual tiene una superficie de 10.556 km², que comprende una orografía montañosa única que la distingue del resto de provincias amazónicas, y que cuenta con la siguientes característica agrometeorológicas:

Cuadro 4. Características agrometeorológicas de la provincia de Zamora Chinchipe

Característica	Valor	Unidad de medida
Altitud	250 – 1800	msnm
Temperatura	18 – 22	°C
Clima	tropical cálido húmedo	Holdridge
Precipitación:	2000	mm/año
Humedad	92	%

Fuente: Gobierno Autónomo Descentralizado del cantón Zamora.

Asimismo, los hemogramas se realizaron en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia; y el inmunoensayo (iELISA), se realizó en el Laboratorio de Microbiología Animal del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

3.2.2 Tamaño de la Población

La población estuvo constituida por 130.000 bovinos de las ganaderías de la provincia de Zamora Chinchipe de diferentes edades razas y sexo, de donde se extrajo estadísticamente una muestra para su estudio.

3.2.3 Tamaño de la Muestra

El tamaño de la muestra se calculó partiendo del conocimiento de la población bovina existente en la provincia de Zamora Chinchipe y de la probabilidad de prevalencia y el error máximo permitido, a través de la siguiente fórmula:

$$n = \frac{NZ^2P(1 - P)}{(N - 1)d^2 + Z^2P(1 - P)}$$

Donde:

N = tamaño de la población

Z = Percentil 1-alfa/2 de la normal para alfa=0,05 Z=1,96

P = Probabilidad de encontrar el efecto (80 %)

d = Error máximo permisible o precisión (10 %)

Partiendo de que la población bovina en la provincia de Zamora Chinchipe es de 130.000 animales; y que la probabilidad de prevalencia de acuerdo a trabajos previos es elevada (80 %), y un error de precisión permitido es de 10 %; la fórmula se desarrolló así:

$$n = \frac{(130000)1,96^2 * 0,8(1 - 0,8)}{(130000 - 1)0,1^2 + 1,96^2 * 0,8(1 - 0,8)} = 61$$

Por lo tanto, el tamaño de la muestra fue de 61 bovinos escogidos de forma aleatoria en toda la provincia.

3.2.4 Variables a Evaluar

En el presente estudio se consideraron las siguientes variables:

✚ Prevalencia de Anaplasmosis bovina en la provincia de Zamora Chinchipe

- Por Giemsa
- Por iELISA

✚ Hemograma bovino

- Hematocrito
- Hemoglobina
- Serie blanca

✚ Análisis epidemiológico

3.2.5 Análisis Estadístico

La información recopilada se tabuló y se presentó en cuadros y gráficos con promedios y porcentajes, utilizando la estadística descriptiva.

3.2.6 Selección de Fincas

Las muestras se tomaron aleatoriamente en las cuatro zonas geográficas de la provincia de Zamora Chinchipe; de la siguiente manera

Cuadro 5. Sectores de toma de muestras

Zona	Número de Fincas	Número de Muestras
------	------------------	--------------------

Norte (Yantzaza-Pangui)	5	16
Sur (Palanda- Zumba)	5	15
Este (Zamora)	5	15
Oeste (Nangaritza)	5	15
Total	20	61

3.2.7 Técnicas de Recolección de las Muestras de Sangre

Las muestras se tomaron asépticamente ya sea de la vena yugular o caudal en tubos vacutainer con EDTA y sin EDTA, se agitaron lentamente para favorecer su mezclado, se colocaron en un termo para su conservación hasta su análisis en el laboratorio de diagnóstico de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia y en el Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

3.2.8 Realización de Frotis Sanguíneos

Los frotis se realizaron extrayendo una gota de sangre de los tubos vacutainer con EDTA, ubicándolo sobre el porta objetos y se extendió la gota con la ayuda de otro porta objetos o con una laminilla, en la que debe presentar una punta de cola, luego se procede al secado.

3.2.9 Coloración de Giemsa

Los frotis de sangre se ubicaron en una gradilla portaobjetos para luego proceder a realizar la tinción de Giemsa de acuerdo a la siguiente técnica:

1. Fijado con alcohol metílico
2. Dejar secar de 5 a 10 minutos
3. Sumergir en Giemsa durante 30 minutos
4. Eliminar el colorante y Lavar con agua destilada

5. Dejar secar a temperatura ambiente; y,
6. Observar al microscopio con aceite de inmersión y lente de 100x

3.2.10 Extracción del Suero Sanguíneo

Una vez colectadas las muestras de sangre se procedió a la centrifugación de los tubos vacutainer sin EDTA con ayuda de la centrifuga a 1000 rpm durante 15 minutos, pasado este tiempo se extrajo el suero en micro tubos debidamente identificados los cuales fueron colocados en congelación para su conservación a -20° C, para su posterior análisis.

3.2.11 Elaboración de Hemograma

Este procedimiento se realiza con la ayuda del equipo QBC, con la boquilla alejada de usted, se abre la pipeta girando el tambor en el sentido de las agujas del reloj. Introduzca el extremo del tubo con líneas verdes en el tambor hasta el máximo. En esta posición ciérrela girando al tambor en contra de las agujas del reloj, (mezcle la muestra con EDTA mediante 10 inversiones suaves antes de quitar la tapa y aspirar el contenido hacia la pipeta).

Presione el embolo de la pipeta y manténgalo así, inserte el extremo del tubo cubierto de naranja de acridina en la muestra con EDTA. Libere el embolo poco a poco, compruebe que la sangre llega hasta la línea negra de 111 μ L. Levante la pipeta y limpie cuidadosamente el exterior del tubo con un paño que no deje residuos. Introduzca el extremo del tubo en la tapa que está en la bandeja, asegúrela haciendo girar la pipeta una media vuelta, levante la pipeta y asegúrese de que el sellado es seguro. Repítalo con un nuevo tubo si la muestra se filtra por la tapa.

Mantenga la pipeta horizontal y ábrala deslizándola hacia delante, retire el tubo con cuidado. Mantenga el tubo horizontal y gírelo con los dedos durante al menos 30 segundos para asegurar que los reactivos se mezclan bien con la muestra.

(Nunca toque los flotadores con los dedos, use pinzas para manejar los flotadores sueltos o que se hayan caído. Cuidado no rompa el tubo). Para introducir el flotador, mantenga el tubo horizontal y deslícelo sobre la punta del flotador, cogiendo el tubo cerca de las líneas verdes, levántelo para liberar el flotador de la ranura, complete la inserción haciendo que el extremo del tubo toque el fondo de la bandeja.

(Asegúrese de volver a colocar y ajustar la tapa de la centrifuga antes de comenzar). Centrifugue durante 5 minutos. Equilibre la centrifuga con otro tubo.

Retire inmediatamente el tubo, compruebe el tubo para asegurarse de que está limpio de sangre o huellas digitales. Asegúrese de que el nivel plasmático se encuentre entre las dos líneas verdes del tubo. Si se encuentra por encima o por debajo de las mismas, deséchelo y prepare un nuevo tubo.

3.2.12 Análisis de Muestras de Suero por iELISA

Se trabajó con un KIT de ELISA indirecto de *Anaplasma marginale* de la marca SVANOVIR (SVANOVIR® *A. marginale*-Ab *Anaplasma marginale* Antibody Test)

- **Preparación de reactivos PBS-tween buffer**

Diluir la solución de PBS-tween 20x concentración 1/20 en agua destilada. Preparar 500 ml por placa mediante la adición de 25 ml de solución PBS-tween a 475 ml de agua destilada y mezclar bien.

- **Conjugado Anti-IgG de bovino**

Reconstituir el conjugado HRP liofilizado con 11,5 ml de PBS-tween buffer añadir el tapón cuidadosamente a la botella dejar la solución 1 minuto y mezclar bien en un agitador. Preparar inmediatamente antes de su uso.

- **Pre-dilución de los controles de muestra**

Para las pruebas, los controles de suero y las muestras deben ser prediluidas 1/40 en PBS-tween buffer (por ejemplo 10 µl de muestra en 390 µl de PBS-tween buffer).

- **Procedimiento**

- ✓ Todos los reactivos deben ser equilibrados a temperatura ambiente 18-25° C (64 - 77° F) antes de su uso.
- ✓ Duplicados, añadir 100 µl de prediluido, suero control positivo del (reactivo A) y suero control negativo (reactivo B) respectivamente, en posos seleccionados.
- ✓ Anadir 100 µl de muestra de suero prediluido a los posos seleccionados. Las muestras pueden ser examinadas individualmente o duplicado.
- ✓ Sellar las placas / tiras e incubar a 37° C (98,6° F) por 30 minutos
- ✓ Enjuagar las placas / tiras 4 veces con PBS-tween en cada ciclo de enjuague, llenar los posos, vaciar la placa y golpear duro para eliminar todos los restos de fluido.
- ✓ Anadir 100 µl de dilución HRP conjugado a cada poso, sellar la placa y encubar a 37° C por 30 minutos
- ✓ Repetir el paso #5

- ✓ Anadir 100 µl de solución de sustrato a cada pocillo. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente 18 - 25⁰ C (64 - 77⁰ F). se cronometra cuando el primer poso está lleno.
- ✓ Detener la reacción añadiendo 100µl de solución de parada en cada pocillo y mezclar bien. Anadir la solución de parada en el mismo orden que se colocó la solución de sustrato en el paso #8.
- ✓ Medir la densidad óptica (DO) de los controles y muestras a 405 nm en un fotómetro de microplacas. medir la DO dentro de 15 minutos después de la adición de la solución de parada a fin de evitar La fluctuación de los valores DO.

- **Cálculo de valores porcentaje de positividad (PP)**

- Calcular los valores medios de la DO para cada uno de los controles y las muestras.
- Calcular los valores de porcentaje de positividad (PP) para el suero control negativo y las muestras, utilizando la siguiente fórmula:

$$PP = \frac{DO \text{ control negativo}}{DO \text{ control positivo}} \times 100$$

- **Interpretación de resultados**

Para asegurar la validez, el duplicado de los valores de la DO del control positivo no debe diferir más del 25% del valor medio de los dos duplicados. Además los valores de control deben estar dentro de los siguientes límites:

- ✚ DO control positivo $> 0.9 - 2.3$
- ✚ PP control negativo < 20

Si alguno de estos criterios no se cumple la prueba es invalidada. Para las pruebas no válidas, la técnica puede ser sospechosa y el ensayo deberá repetirse.

RESULTADOS

4.1 PREVALENCIA DE LA ANAPLASMOSIS BOVINA (*A. marginale*)

4.1.1 Prevalencia General

En el presente cuadro se observa la prevalencia general de *A. marginale* en bovinos de la provincia de Zamora Chinchipe, diagnosticada mediante Giemsa y ELISA Indirecto (iELISA).

Cuadro 6. Porcentaje de prevalencia general de *A. marginale* en bovinos de la provincia de Zamora Chinchipe.

Nº DE NUESTRAS	RESULTADOS							
	Giemsa				iELISA			
	Positivo	%	Negativo	%	Positivos	%	Negativos	%
61	34	56	27	44	60	98	1	2

De los 61 animales muestreados 34 que representan el 56 %, fueron positivos a Giemsa; mientras que mediante el ensayo inmunoenzimático (iELISA), 60 animales que representan el 98 %, resultaron positivos.

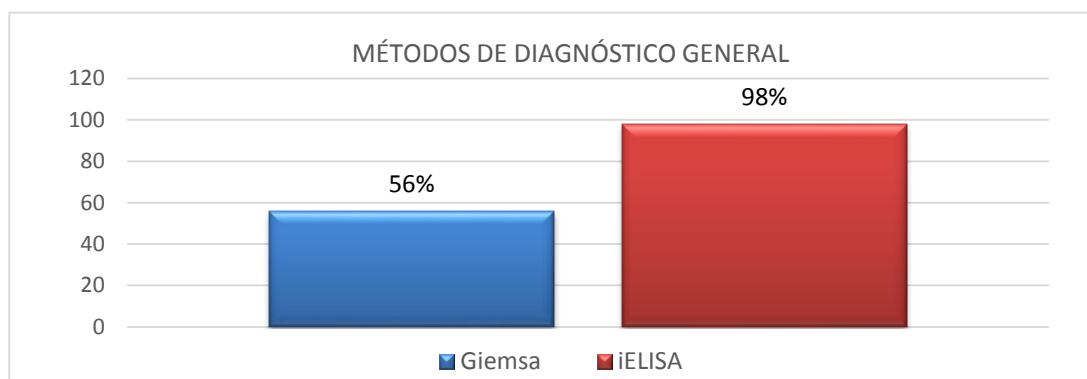


Figura 4. Porcentaje de prevalencia general de *A. marginale* en bovinos de la provincia de Zamora Chinchipe.

4.1.2 Porcentaje de Prevalencia de Anaplasmosis Bovina por Sectores

El siguiente cuadro detalla la prevalencia de anaplasmosis bovina por sectores en la provincia de Zamora Chinchipe.

Cuadro 7. Porcentaje de prevalencia de Anaplasmosis bovina por sectores de la provincia de Zamora Chinchipe.

SECTOR	Nº DE MUESTRAS	RESULTADOS							
		Giemsa				iELISA			
		Positivo	%	Negativo	%	Positivo	%	Negativo	%
NORTE	16	11	69	5	31	15	94	1	6
SUR	15	11	73	4	27	15	100	0	0
ESTE	15	10	67	5	33	15	100	0	0
OESTE	15	2	13	13	87	15	100	0	0
Total	61	34	56	27	44	60	98	1	2

Por la técnica de Giemsa, el sector Sur tiene una prevalencia más alta (73%), seguida por el Norte con el 69%, el Este con 67% y el sector Oeste con un 13%. Por iELISA la prevalencia en los sectores Sur, Este y Oeste es de 100%; mientras que en el sector Norte hay un 94%.

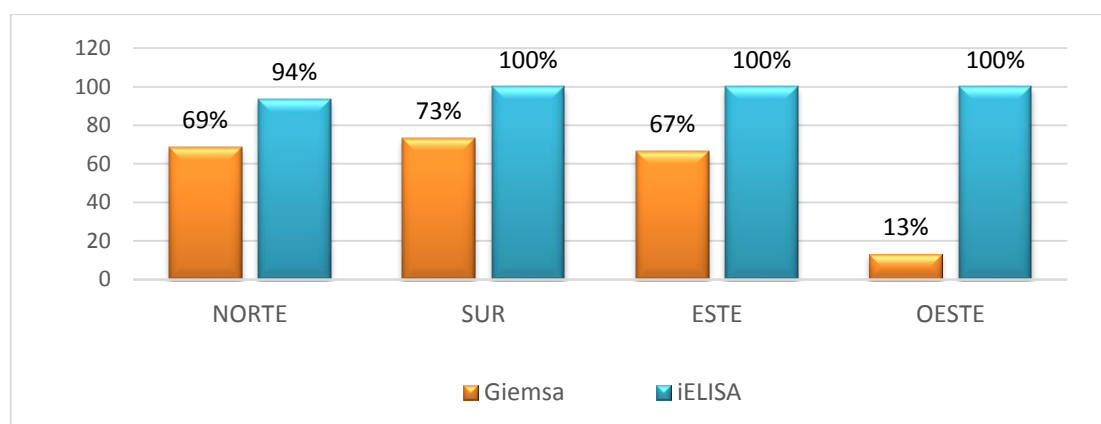


Figura 5. Porcentaje de prevalencia de Anaplasmosis bovina por sectores de la provincia de Zamora Chinchipe.

4.1.3 Porcentaje de prevalencia de Anaplasmosis bovina por Edad en la Provincia de Zamora Chinchipe

En el siguiente cuadro se observa el porcentaje de *A. marginale* por Giemsa y (iELISA) en tres categorías de animales por edad.

Cuadro 8. Porcentaje de prevalencia de Anaplasmosis bovina por Edad en la provincia de Zamora Chinchipe (%).

EDAD	Nº DE MUESTRAS	RESULTADOS							
		Giemsa				iELISA			
		Positivo	%	Negativo	%	Positivo	%	Negativo	%
< 1 Año	13	10	77	3	23	13	100	0	0
De 2-4 Años	26	15	58	11	42	26	100	0	0
> DE 4 Años	22	8	36	14	64	21	95	1	5
Total	61	33	57	28	43	60	98	1	2

Por tinción de Giemsa los animales positivos menores de 1 año son 77%; de 2-4 años son el 58% y mayores de 4 años son 36%. Por el ensayo de iELISA son positivos, menores de 1 año y de 2-4 años el 100%, mientras que mayores de 4 años representan el 95% de positivos.

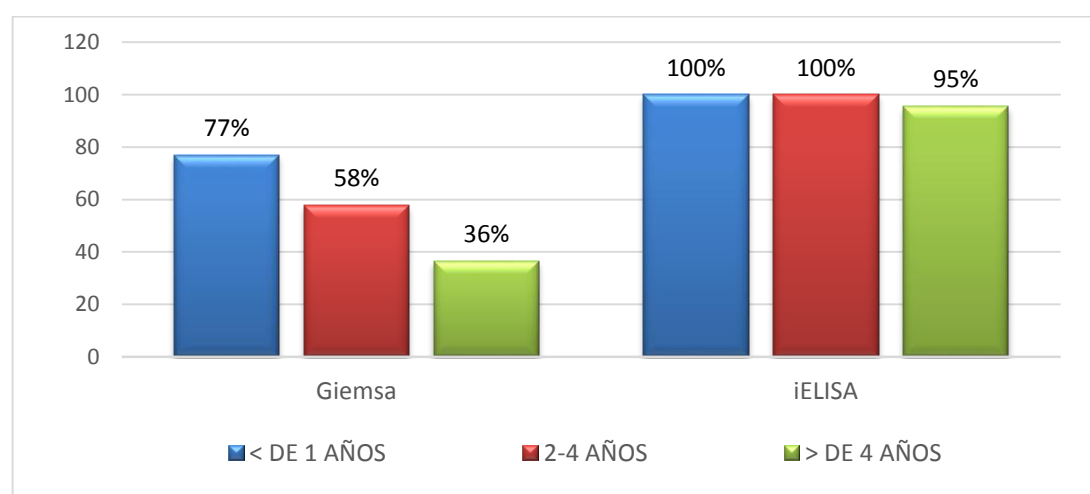


Figura 6. Porcentaje de prevalencia por edad de *A. marginale* en la provincia de Zamora Chinchipe.

4.1.4 Porcentaje de Prevalencia de Anaplasmosis Bovina por Sexo en la Provincia de Zamora Chinchipe

En el cuadro nueve se observa el porcentaje de prevalencia de *A. marginale* de acuerdo al sexo, tanto por Giemsa como por iELISA.

Cuadro 9. Porcentaje de prevalencia de Anaplasmosis bovina por sexo en la provincia de Zamora Chinchipe.

SEXO	MUESTRA	RESULTADOS							
		Giemsa				iELISA			
		positivo	%	Negativo	%	positivo	%	Negativo	%
Machos	9	5	56	4	44	9	100	0	0
Hembras	52	29	56	23	44	51	98	1	2
Total	61	34	56	27	44	60	98	1	2

Por tinción de Giemsa; los machos fueron positivos en un 56%; mientras que las hembras arrojaron valores de 56%. Por el ensayo de iELISA los machos positivos representan el 100% y las hembras el 98%.

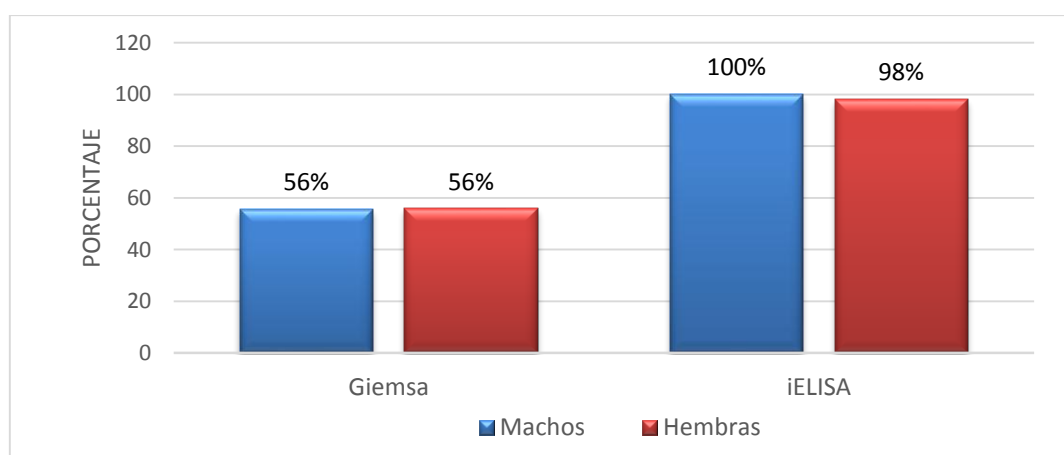


Figura 7. Porcentaje de prevalencia por Sexo de *A. marginale* en la provincia de Zamora Chinchipe.

4.1.5 Porcentaje de prevalencia de Anaplasmosis bovina por Raza en la Provincia de Zamora Chinchipe

En este cuadro se detalla la prevalencia de *A. marginale* por raza, de acuerdo a la coloración por Giemsa y análisis por iELISA.

Cuadro 10. Porcentaje de prevalencia de Anaplasmosis bovina por raza en la provincia de Zamora Chinchipe.

DIAGNOSTICO DE PREVALENCIA POR RAZA									
RAZA	Nº DE MUESTRAS	RESULTADOS							
		Giemsa				iELISA			
		Positivo	%	Negativo	%	Positivo	%	Negativo	%
Holstein	44	24	55	20	45	43	98	1	2
Brown Swiss	9	4	44	5	56	9	100	0	0
Jersey	2	1	50	1	50	2	100	0	0
Mestiza	6	5	83	1	17	6	100	0	0
total	61	34	58	27	42	60	98	1	2

Porción de Giemsa, el número de positivos son: Holstein 55%, Brown Swiss 44%; Jersey 50% y Mestiza 83%. Por el ensayo de iELISA, positivos son: Holstein 98%, pero Brown Swiss, Jersey y Mestiza son el 100% de positivos.

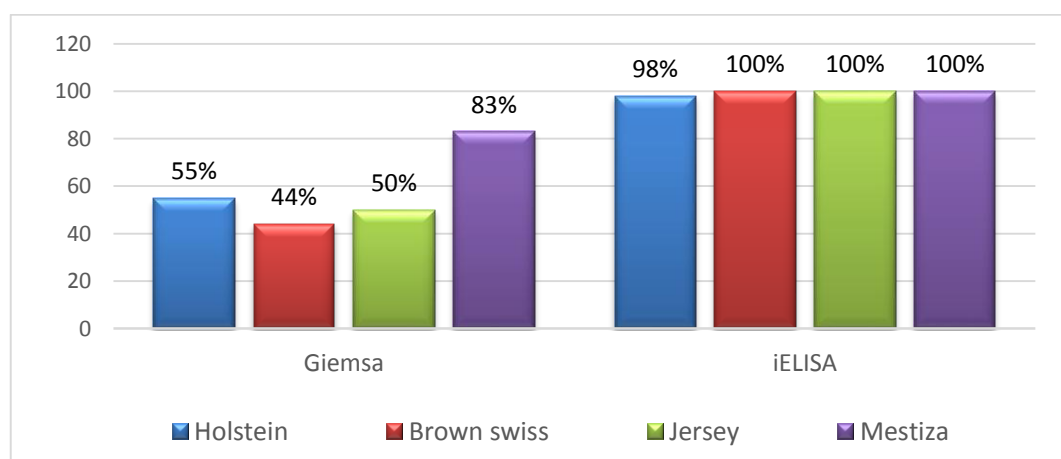


Figura 8. Porcentaje de Prevalencia por razas de *A. marginale* en la provincia de Zamora Chinchipe.

4.1.6 Comparación de las Pruebas Diagnósticas

En el presente cuadro se muestra las comparaciones que existe entre los métodos de Giemsa y el ensayo inmunoenzimático iELISA, en la prueba de análisis de *A. marginale*.

Cuadro 11. Comparación de las pruebas diagnósticas

N° de Animales	Giemsa				iELISA			
	Positivo	%	Negativo	%	Positivo	%	Negativo	%
61	34	56	27	44	60	98	1	2

Como resultado se obtuvo que un 56% es positivo para Giemsa, pero para iELISA es positivo con el 98%, concluyéndose que por el ensayo inmunoenzimático es más sensible al detectar el anticuerpo, lo que indica que hay un 46% de discordancia diagnóstica.

4.1.7 Comparación del Diagnóstico con las Alteraciones Hematológicas.

Para la comparación de los diagnósticos con las alteraciones hematológicas, se tomó en consideración los resultados de Giemsa, y los resultados obtenidos por iELISA, cuyos datos se registran en el cuadro 12.

Cuadro 12. Comparación de diagnósticos vs Alteraciones Hematológicas

Técnicas	Positivo	%	Negativo	%	Alteraciones Hematológicas
GIEMSA	34	56	27	44	No concuerdan con la enfermedad por ser portadores asintomáticos
iELISA	60	98	1	2	

Se determinó que las alteraciones no concuerdan con los resultados por Giemsa o con iELISA, lo que deja entender que los títulos elevados de anticuerpos o la positividad por Giemsa no indican que los animales están padeciendo la enfermedad, sino que son portadores asintomáticos.

4.2 ESTUDIO DESCRIPTIVO DE FACTORES POTENCIALES PARA LA PRESENCIA DE ANAPLASMOSIS EN EL GANADO BOVINO DE LA PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE

Para este estudio, se procedió a plantear una entrevista con preguntas preelaboradas a los ganaderos propietarios de las fincas de donde se extrajeron las muestras para los respectivos diagnósticos; cuyos resultados se exponen a continuación en los siguientes cuadros y figuras.

4.2.1 Presencia de la enfermedad

En este cuadro se muestra el conocimiento y padecimiento de la enfermedad, al igual que la presencia de garrapatas, síntomas de la *A. marginale*, la época de mayor presencia de garrapatas y temperatura de la finca.

Cuadro 13. Porcentaje de presencia de la enfermedad

Conocimiento de la Enfermedad	SI	%	NO	%
	18	90	2	10
Padecimiento de la Enfermedad	SI	%	NO	%
	18	90	2	10
Presencia de Garrapatas	SI	%	NO	%
	17	85	3	15
Síntomas	tristeza, postración ,fiebre, renguera			100%
Época de presencia	verano			100%
Temperatura de la Finca	26,6°c			

La mayoría de los ganaderos de la provincia de Zamora Chinchipe (90%), tiene conocimiento de la anaplasmosis o fiebre de garrapata, el (90%) aseguran que sus animales han padecido de esta enfermedad, El 85% de

ganaderos, reporta la presencia de garrapatas en su ganado; lo cual convierte a este parásito en uno de los principales vectores de la enfermedad.

Por lo observado, se considera que las garrapatas están presentes en todas las ganaderías de la provincia de Zamora Chinchipe, aunque algunos ganaderos tras el uso de avermectinas, no reporten su presencia al momento de la encuesta.

El 100% de los ganaderos encuestados, señala que los principales síntomas de la *A. marginale* son la fiebre, la tristeza, postración y la renguera. Se obtuvo que como temperatura promedio en todas las fincas encuestadas el 26,6°C y como época de mayor presencia de garrapatas el verano con el 100%.

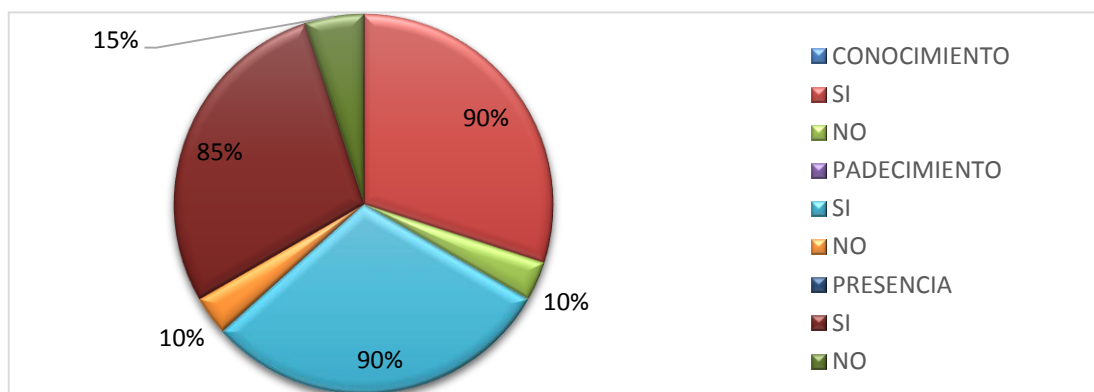


Figura 9. Porcentaje de presencia de la enfermedad de *A. marginale*.

4.2.2 Conocimiento Epidemiológico

4.2.2.1 Porcentaje del tipo de pasto existente en las fincas de la provincia de Zamora Chinchipe

Se pudo determinar que el pasto predominante en todas las fincas fue la brachiaria con un 90%, seguida por el merkerón con un 35% y elefante con el 25%.

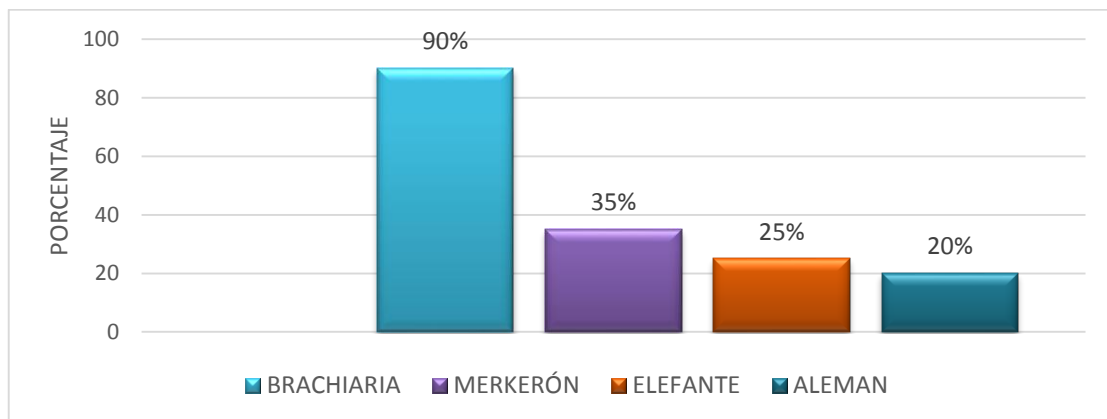


Figura 10. Porcentaje del tipo de pasto en las fincas de la provincia de Zamora Chinchipe.

4.2.2.2 Porcentaje del tipo de suelo existente en las fincas de la provincia de Zamora Chinchipe

Se determinó que el suelo con mayor predominancia en las fincas es el arenoso con un (45%), entre el arcilloso y humífero hay 30%.

Cuadro 14. Porcentaje de tipo de suelo en la provincia de Zamora Chinchipe.

TIPO DE SUELO DE FINCA	Arenoso	Arcilloso	Humífero	Aren.-Humíf.
	45%	20%	15%	5%
	Pedre.-Humíf.	Pedre.-Arci.-Humíf.		Pedre.-Arci.
	5%	5%		5%

4.2.2.3 Porcentaje del consumo de agua en las fincas de la provincia de Zamora Chinchipe

Se determinó que el consumo de agua se lo efectúa por arroyos con un (90%), por manguera, colección de agua de lluvia es del 5%.

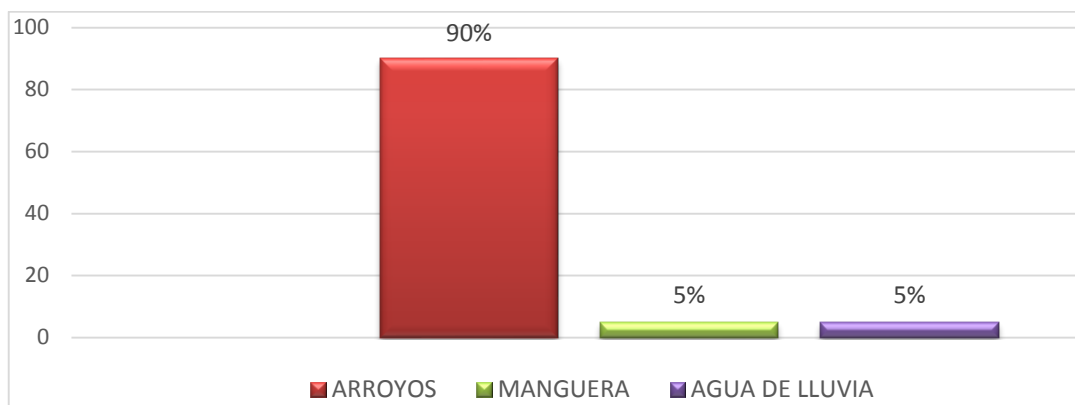


Figura 11. Porcentaje d consumo de agua de las fincas dela provincia de Zamora Chinchipe.

4.2.2.4 Porcentaje del sistema de alimentación

Se determinó que los sistemas de alimentación en las fincas bovinas de la provincia de Zamora Chinchipe son de la siguiente manera: rotativa y a voluntad con el 25% de forma rotativa al sogueo del 20% y rotativa con establos del 15%.

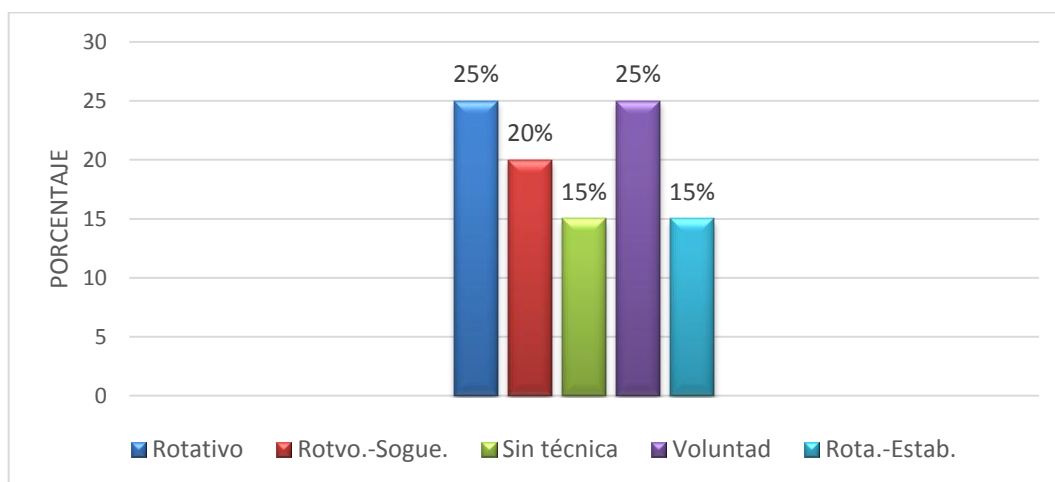


Figura 12. Porcentaje de sistemas de alimentación de las fincas bovinas en la provincia de Zamora Chinchipe.

4.2.3 Diagnóstico y control de la enfermedad Anaplasmosis Bovina

4.2.3.1 Porcentaje del servicio de un veterinario

El 90 % de los ganaderos de la provincia utiliza los servicios profesionales veterinarios para el tratamiento y control de la enfermedad. Un bajo porcentaje (10 %), no utiliza estos servicios pese a la existencia de agencias de servicios agropecuarios (AGROCALIDAD), instaladas a lo largo y ancho de todo el país.

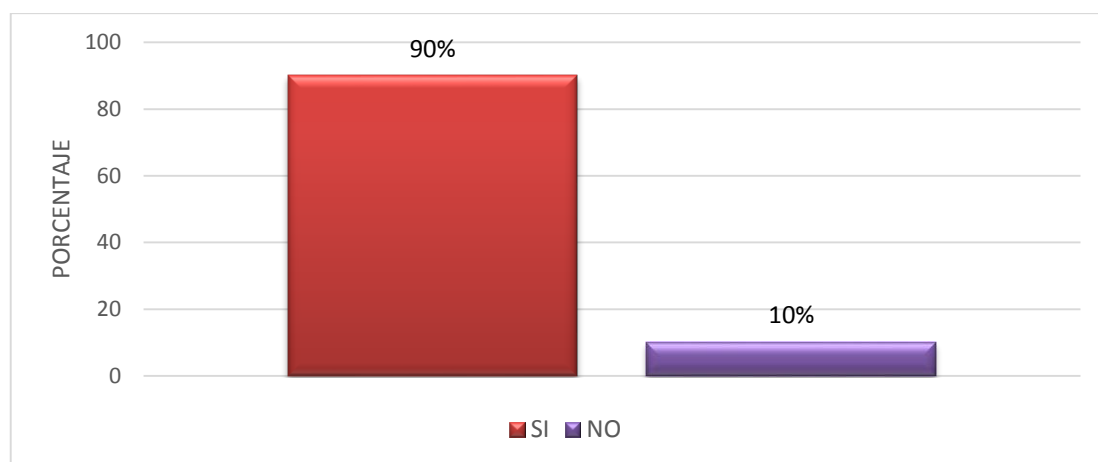


Figura 13. Porcentaje de servicio veterinario en la provincia de Zamora Chinchipe.

4.2.3.2 Porcentaje de participación del profesional veterinario

El 85 % de los ganaderos de la provincia no utilizan los servicios de laboratorio para el diagnóstico de la enfermedad, apenas el 10 % de los ganaderos encuestados en el sector Este de la provincia, dicen haber utilizado este medio para garantizar el diagnóstico y el control de la enfermedad.

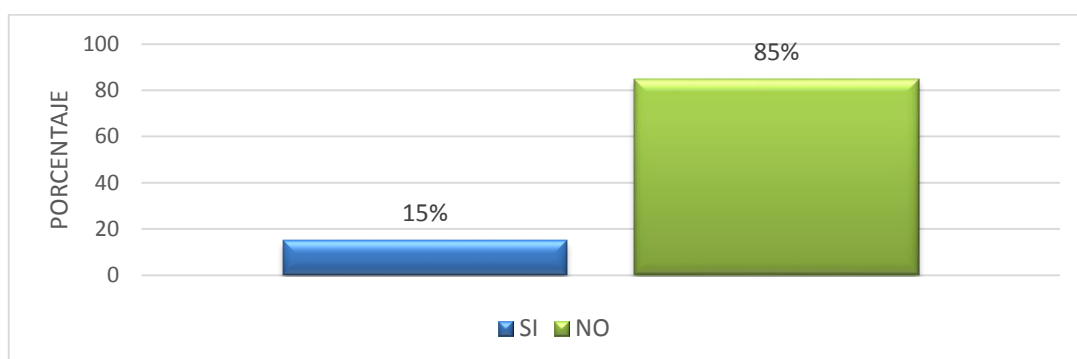


Figura 14. Porcentaje de toma de muestras en la provincia de Zamora Chinchipe.

4.2.3.3 Porcentaje de la edad que enferman los animales

El 50 % de los ganaderos encuestados señalan que la enfermedad aparece con más frecuencia entre los animales mayores a 2 años; el 35 % manifiesta que enfermedad está presente en animales de entre 1 a 2 años de edad; el 10 % indica que la enfermedad aparece con más frecuencia entre 6 a 12 meses; y, el 5 % manifiesta que los animales enferman antes de los 6 meses.

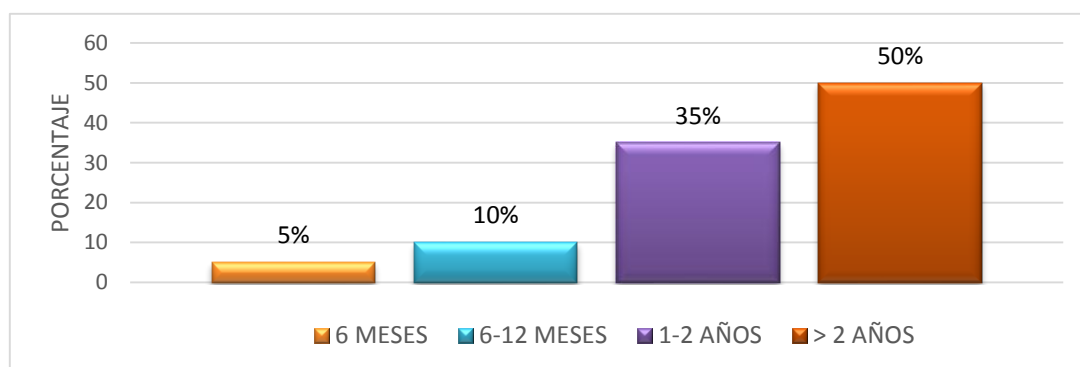


Figura 15. Porcentaje de la edad que enferman los animales con *A. marginale*).

4.2.3.4 Porcentaje del tratamiento antibiótico

El 80% de los ganaderos encuestados usa para el tratamiento de la enfermedad *A. marginale* las Tetraciclinas y un 5% utiliza combinaciones de Tetraciclinas + Diminazeno con ivermectinas y un 10% utilizan ivermectinas.

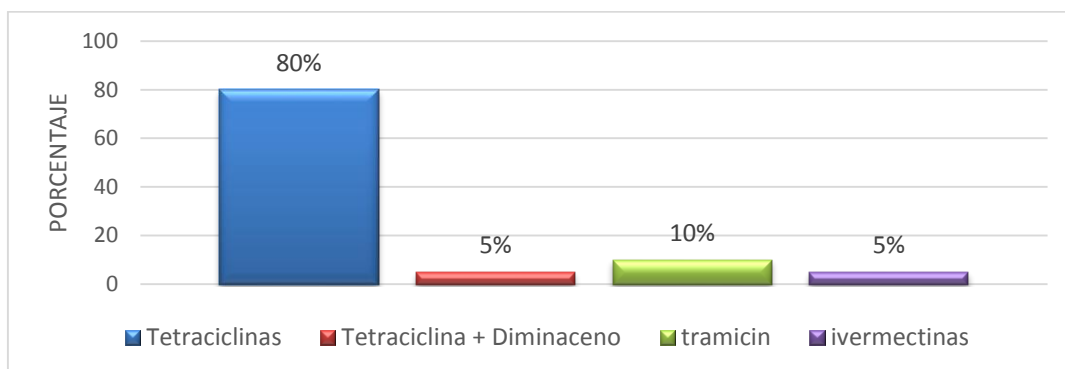


Figura 16. *Porcentaje de tratamiento antibiótico de productos más usados para el control de garrapatas en las fincas bovinas de la provincia de Zamora Chinchipe.*

4.2.4 Control de Garrapatas

4.2.5 Porcentaje del grado de infestación

El grado de infestación se determinó en base a la encuesta y a la observación directa del ganado por parte del encuestador. El 70% de los ganaderos dice tener un grado medio de infestación, mientras que el 30% señala que el grado de infestación es bajo.

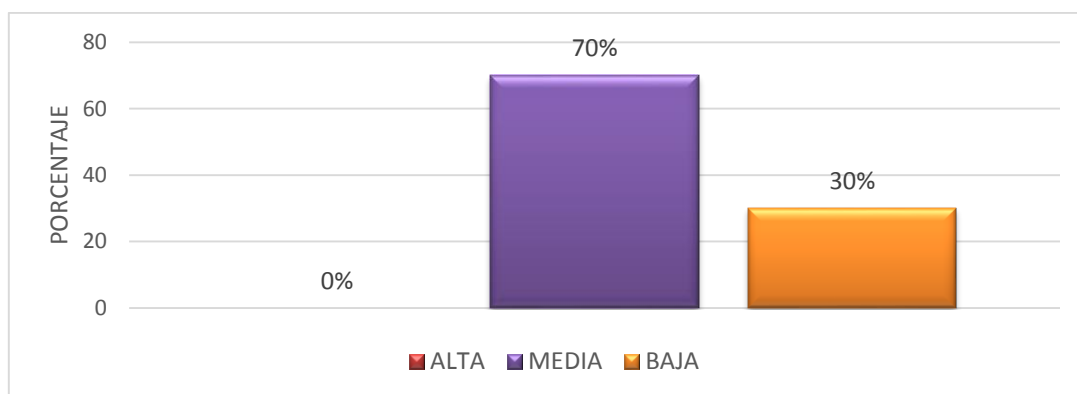


Figura 17. *Porcentaje Grado de infestación por garrapatas en los bovinos de la provincia de Zamora Chinchipe.*

4.2.5.1 Porcentaje de productos usados para el control de garrapatas.

Este cuadro muestra que el producto más usado por las fincas encuestadas es el toril (amitraz) con el 65%, nuvan (diclorvos) con el 55% y el derribante (amitraz) con un 45% y con las ivermectinas del 20%.

El método más utilizado para la aplicación de estos productos a excepción de las ivermectinas, es el baño por aspersion, utilizando bomba mochila.

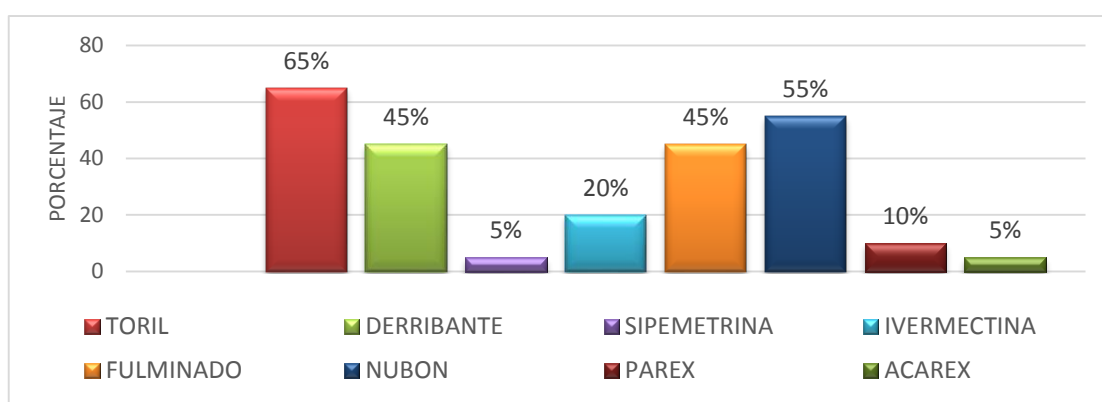


Figura 18. Porcentaje de productos usados para el control de garrapatas.

4.2.5.2 Porcentaje de la frecuencia de uso del producto.

De las 20 fincas encuestadas se obtuvo que la frecuencia de uso de los productos es cada mes con el 70%; el 5% de los ganaderos lo hace cada 3 o 6 meses; y el 20% de acuerdo al grado de infestación en cualquier tiempo.

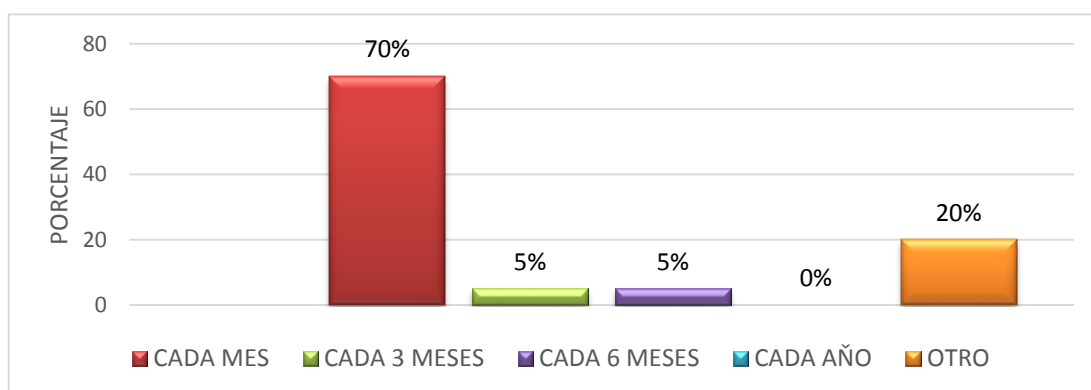


Figura 19. Porcentaje de la frecuencia del uso del producto.

4.2.6 Salubridad

4.2.6.1 Periodo de retiro de leche postratamiento con avermectinas

El 60 % de los ganaderos encuestados manifiesta que no realiza retiro de la leche después del tratamiento con avermectinas (ivermectina).

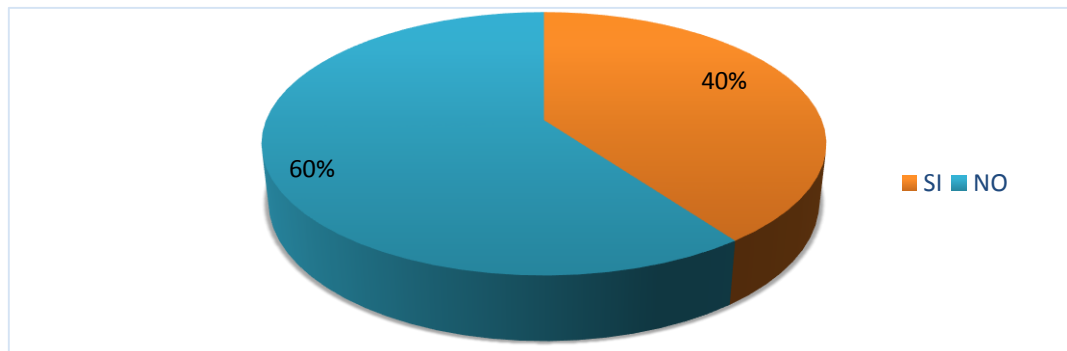


Figura 20. Periodo de retiro de leche postratamiento con avermectinas

4.2.6.2 Consumo de carne del hato ganadero.

Como resultado a las encuestas, que el consumo de la carne del ganado muerto por enfermedades no la realizan marcando un 100%.

4.2.7 Socialización de resultados

Socialización del tema de tesis denominado **“DIAGNÓSTICO DE ANAPLASMOSIS BOVINA POR LOS MÉTODOS DE GIEMSA Y ELISA INDIRECTO Y SU RELACIÓN CON LOS VALORES SANGUÍNEOS, EN LA PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE”** con los estudiantes de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Loja



Figura 21: Socialización de los resultados obtenidos, ante estudiantes del Tercer y Cuarto Módulo de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

DISCUSIÓN

5.1 PREVALENCIA DE ANAPLASMOSIS EN LA PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE

Mediante la coloración de Giemsa se obtuvo una prevalencia de 56 %; mientras que por el inmunoensayo (ELISA indirecto), se obtuvo una prevalencia del 98 %. Esto se debe a que si bien Giemsa es un método confiable y barato, solo detecta niveles de parasitemia de 0.1 a 0.2% (Eriks y col., 1989); es decir, niveles mayores a 106 eritrocitos infectados por mililitro de sangre (Gale y col., 1996); en cambio iELISA, es un método que a través del uso de dos antígenos, detecta anticuerpos presentes en sueros de animales que alguna vez cursaron el proceso infeccioso, llegando a tener sensibilidad y especificidad superior al 90 % (Corona y col, 2014), haciendo de ésta, una prueba muy segura en los diagnósticos de prevalencia de *A. marginale*; por lo tanto, podemos decir con toda seguridad que la prevalencia de Anaplasma marginale en la provincia de Zamora Chinchipe es del 98 %, conforme lo determina la prueba de iELISA.

De la misma manera y con el mismo razonamiento, se afirma que la prevalencia en los sectores Sur, Este y Oeste fue de 100 %; mientras que en el sector Norte se detectó una prevalencia del 94 %. Asimismo se puede señalar que la prevalencia por edad fue del 100 % en animales menores a 1 año y también en animales comprendidos entre de 2 y 4 años de edad, mientras que en los mayores a 4 años hubo una prevalencia del 95%. En cuanto al sexo se afirma que en los machos existe una prevalencia del 100% y en las hembras el 98%. En lo que se refiere a la raza, la prevalencia en Holstein fue de 98 %, siendo del 100 % en las razas Brown Swiss, Jersey y Mestiza.

Estos datos coinciden con los reportados por Soto (2010), quien utilizando la técnica de cELISA detectó una prevalencia de 91,16 % en el Camal Metropolitano de Quito, dato que a su vez es comparable con la prevalencia determinada en el estado Guárico-Venezuela de 93,7% por Elizalde *et al* (2007), donde emplea un ELISA indirecto utilizando la MSP5 recombinante como Ag.

Estos datos de prevalencia, no necesariamente reflejan la presencia de la enfermedad en los animales al momento de ser muestreados. Conocido es que los animales que alguna vez en su vida fueron infectados ya sea por acción de vectores biológicos como la garrapata (Kocan y *col.*, 1981; Kocan y *col.*, 1986); o fueron inoculados mecánicamente por moscas chupadoras o acción iatrogénica del ganadero (Zaugg, 1990), son considerados persistentemente infectados y presentan anticuerpos en su suero; Viseshakul (2002), señala que estos animales frecuentemente siguen siendo portadores de por vida y se los conoce como “portadores asintomáticos”, manifestando además, que en esta fase es difícil diagnosticar la enfermedad por los métodos tradicionales como Giemsa.

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; y que faciliten identificar de forma segura los animales portadores para el movimiento de animales a zonas libres del hemoparásito (Camacho y *col.*, 2000), o planear medidas de control que minimicen las pérdidas económicas en los brotes agudos. Se considera que el diagnóstico por iELISA, nos ha proporcionado una información bastante fidedigna de la prevalencia de esta enfermedad en la provincia de Zamora Chinchipe.

El diagnóstico de la anaplasmosis se dificulta debido fundamentalmente a lo difícil de detectar los 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 (Aboytes-Torres y Buening, 1990; Masika y *col.*, 1997); por lo tanto, iELISA, se considera un método de diagnóstico muy eficiente en los estudios epidemiológicos de prevalencia de la enfermedad.

5.2 COMPARACIÓN DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

Como resultado se obtuvo que un 56% es positivo para Giemsa, pero para iELISA es positivo un 98%, concluyéndose que por el ensayo inmunoenzimático es más sensible al detectar anticuerpos, lo que indica que hay un 46% de discordancia diagnóstica.

Esta discordancia entre las pruebas se genera por cuanto Giemsa en comparación con iELISA, posee baja sensibilidad y especificidad; según Melman *et al.*, 2004 (citado por Soto, 2010), la tinción de los frotis de sangre con Giemsa sólo permite detectar niveles de parasitemia del orden del 0.1 - 2 %, y parasitemias menores son difíciles de diagnosticar.

Además se ha demostrado que el colorante de Giemsa puede originar falsos positivos debido a ciertos depósitos de precipitados sobre la células rojas similares a la rickettsia, o falsos negativos, que resultan cuando el porcentaje de glóbulos rojos infectados es muy bajo (Soto, 2010). Por este motivo autores como Caballero (1993), ha reportado un método más sensible, simple y relativamente económico para la detección de *A. marginale* por microscopía de fluorescencia utilizando naranja de acridina-bromuro de etidio; que sería importante incluirlo en próximas investigaciones, sobre *A. marginale*.

5.3 ALTERACIONES HEMATOLÓGICAS MÁS FRECUENTES

De las 61 muestras analizadas por medio de las dos técnicas de diagnóstico se obtuvo que las alteraciones hematológicas tanto para el hematocrito, la hemoglobina, la serie blanca, eosinófilos, linfocitos y monocitos y plaquetas tendieron más hacia la elevación que a la baja.

Las alteraciones presentadas, evidenciaron que los animales no estuvieron enfermos al momento de tomar la muestra, y si por intermedio de iELISA, la prevalencia de *A. marginale* resultó elevada, esto sucede por cuanto dichos animales algún momento de su vida estuvieron en contacto con la rickettsia, o existió cuadro clínico que fue superado, pero que debido al estado de premunición, los anticuerpos contra el patógeno están presentes en el suero sanguíneo y son detectados por el antígeno presente en el inmunoensayo.

Debido también que la alteración en la hematología se puede deber a otros factores que alteran drásticamente los resultados como por ejemplo las vacunaciones, infecciones en periodo de convalecencia, altura de la finca, neoplasias, hemorragias, enfermedades gastrointestinales y pulmonares, equipo de cirugía no desinfectada.

Como las alteraciones hematológicas según la literatura se presentan en la fase aguda y subaguda de la enfermedad; en la fase crónica los parámetros hematológicos retornan gradualmente a valores normales luego de muchas semanas (Swift y Thom, 1983). De allí que los animales que sobreviven a esta fase disminuyen drásticamente la parasitemia y desarrollan una marcada respuesta regenerativa a la anemia (Viseshakul, 2002).

Estos datos también refuerzan el criterio de que los animales al momento del muestreo, no estuvieron enfermos; y por lo tanto, se trata de muestras de animales persistentemente infectados, con una prevalencia del 56 % para frotis coloreados con Giemsa y de 98 % para la prueba serológica de iELISA.

5.4 FACTORES ASOCIADOS A LA PRESENCIA DE ANAPLASMOSIS EN LA PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE

De los resultados obtenidos producto de la encuesta aplicada a los ganaderos de la provincia en sus cuatro sectores, se puede determinar que existen factores asociados a la prevalencia establecida mediante el estudio de extendidos sanguíneos coloreados con Giemsa y el inmunoensayo con iELISA.

El 90 % de los ganaderos tiene conocimiento de la enfermedad y en el mismo porcentaje, afirman tenerla presente en sus fincas, lo que determina que la enfermedad es endémica en la zona y que posiblemente se haya llegado a un estado de estabilidad enzoótica (Solari,2006), en donde los animales desde su nacimiento están expuestos al patógeno, desarrollando un estado de premunición que no permite que la enfermedad se manifieste en forma aguda en animales jóvenes, evitando así elevada morbi-letalidad en el hato ganadero.

Solari (2006), manifiesta que se adquiere resistencia en forma pasiva por el calostro hasta dos meses de edad, luego hay inmunidad innata entre los 3 y 9 meses, por lo que los animales que se infectan durante este período no enferman clínicamente y desarrollan una inmunidad sólida por largo tiempo. En el 85 % de las fincas encuestadas hubo presencia de garrapatas, constituyéndose este parásito en uno de los principales factores asociados a la presencia de *A. marginale* en la provincia de Zamora Chinchipe; ya que la transmisión del microorganismo a través de las diferentes especies de garrapata puede ocurrir de forma transestadial, es decir, de larvas a ninfas y de ninfas a adultos (Kocan y col., 1981; Kocan y col., 1986); además puede ocurrir del estado de larva a adulto sin reexposición en el estadio como ninfa y por adultos machos que se transfieren del ganado infectado a otro susceptible. Los géneros de garrapatas reconocidos como vectores de *A.*

marginale son: *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Dermacentor* y *Amblyomma*, (Bautista, 1996); trabajos previos, han demostrado que *R. microplus* es el único género de garrapata existente en la provincia de Zamora Chinchipe (Chamba, 2011).

Por su parte, el propio ganadero por su acción mecánica al no esterilizar las agujas hipodérmicas cuando realiza especialmente vacunaciones o desparasitaciones masivas, también contribuye a la diseminación de la enfermedad; a lo cual también se suma la presencia de tábanos y otras moscas chupadoras (Muñoz, 2014).

Otros factores asociados a la presencia de *A. marginale* en la provincia de Zamora Chinchipe y que han sido identificados por los ganaderos son: el clima, el suelo, el tipo de pasto y los sistemas de alimentación.

Eriks y col. (1989), señalan que *Anaplasma marginale* es una rickettsia, que parasita los eritrocitos maduros del ganado bovino, provocando severas pérdidas económicas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo; al encontrarnos en la zona ecuatorial, donde la acción del clima tiene poca variabilidad durante el año, los animales desde su nacimiento, están cotidianamente expuestos a la infección, ya sea a través de vectores o por acciones mecánicas biológicas o iatrogénicas; constituyéndose el clima en un factor muy importante en la prevalencia de la enfermedad.

Los suelos de la provincia de Zamora Chinchipe en su mayoría son de tipo arenoso y arcilloso, esto asociado a la presencia pertinaz de lluvias en la zona, genera en el ganado situaciones de estrés que pueden inducir a una baja de defensas y permitir que en los portadores crónicos asintomáticos haya recurrencia de la infección (Rodríguez y col., 2003).

Asimismo, constituyen factores de importancia el tipo de pasto y los sistemas de alimentación. En las praderas de la provincia de Zamora Chinchipe predominan las gramíneas como la brachiaria, el merkerón y el elefante, los

sistemas de alimentación en su mayoría son mediante pastoreo al “sogueo”, donde por una parte se favorece el contacto de los estadios larvales de la garrapata con el huésped y el tipo de pastoreo también puede ser generado de estrés, favoreciendo la presencia de la enfermedad.

En la transmisión de la enfermedad, especial atención merece la actividad iatrogénica del ganadero, quien mediante la realización de prácticas de vacunación o desparasitación masiva, hace uso común de agujas hipodérmicas sin esterilizar entre los animales, constituyendo esta actividad, quizás en la forma más peligrosa y efectiva de perpetuar la endemia, y de allí, la elevadísima prevalencia de *A. marginale* en las ganaderías bovinas de la provincia de Zamora Chinchipe.

CONCLUSIONES

- ✚ Existe una elevada prevalencia de anaplasmosis bovina en la provincia de Zamora Chinchipe, debida exclusivamente a la presencia de *A. marginale*.
- ✚ La utilización del reactivo Giemsa puede ser efectivo en el momento óptimo de la presencia de la enfermedad, de lo contrario puede originar falsos positivos ya que los animales pueden ser portadores asintomáticos
- ✚ Las alteraciones presentadas en el hemograma bovino tendieron hacia la elevación antes que a la baja, debido que estos animales no estuvieron enfermos al momento de la toma de la muestra por lo que estos animales son persistentemente infectados (Asintomáticos).
- ✚ Se concluye que los resultados obtenidos por medio de la encuesta efectuada en los cuatro sectores de la provincia, un 90% de los ganaderos tiene conocimiento sobre la enfermedad (*A. marginale*), y afirman tenerla en su finca, debido que por su acción mecánica al no esterilizar las agujas hipodérmicas y no efectuar cuarentenas de los animales recién llegados a su finca, constituyen así esta actividad como la forma más peligrosa de transmisión de anaplasmosis bovina en las ganaderías de la provincia de Zamora Chinchipe.

RECOMENDACIONES

- ✚ Se recomienda la capacitación y promoción de nuevos productos al mercado y sobre la importancia del cuidado de sus animales sobre la enfermedad denominada anaplasmosis bovina y de las cuantiosas pérdidas al no ser tratada.
- ✚ La utilización de nuevas técnicas como la de PCR (*polymerase chain reaction*) (*Reacción en cadena de la Polimerasa*), debido que esta es una técnica más sensible para el diagnóstico de *A. marginale* por lo tanto es recomendada su utilización.
- ✚ La continua toma de muestras por parte del Médico Veterinario del sector, ayuda para la identificación de posibles problemas existentes en el hato ganadero.

BIBLIOGRAFÍA

- ✚ Arreaga, k. 2004. Determinación de la prevalencia de Anaplasmosis en el cantón general Antonio Elizalde (Bucay), Provincia del Guayas. Tesis de Grado Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Agraria del Ecuador. (pp 60).
- ✚ Aboytes-Torres, R. y Buening, G. H. (1990). Development of a recombinant *Anaplasma marginale* DNA probe. *Vet. Microbiol.* 24: 391-408. Masika, P. J. y Col. (1997). Perceived causes, diagnosis and treatment of babesiosis and anaplasmosis in cattle by livestock farmers in communal areas of the Central Eastern Cape Province, South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 68: 40-44.
- ✚ Avon. (1974). A microtitre technique for the complement fixation test for anaplasmosis. Veterinary Services, Animal and Plant Health Inspection Service, US Department of Agriculture, Beltsville, MD 20705, USA.
- ✚ Bartlett y Stirling, 2003; A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: *Methods Mol Biol.* 226:3-6; disponible en http://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n_en_cadena_de_la_polimerasa
- ✚ Benítez W. 2003. Determinación de la presencia de *Anaplasma* en el ganado bovino del cantón Jama, provincia de Manabí. Tesis de grado facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Agraria del Ecuador. (pp 50).
- ✚ Biberstein, E. L. (1999). *Anaplasmatataceae*. *Vet. Microbiol.* Blackwell Science Publ.: 304-307.
- ✚ Blouin, E. F. y Col. (1998). Evaluation of *Anaplasma marginale* from tick cell culture as an immunogen for cattle. *Am. N. Y. Acad. Sci.* 849: 253-258.

- ✚ Duzgun (1988). A sensitive ELISA technique for the diagnosis of *Anaplasma marginale* infections. *Vet. Parasitol.*, 29, 1–7.
- ✚ Fao (1988). El Control de las Garrapatas y de las Enfermedades que Transmiten. Manual práctico de campo. Vol. II: 221-441.
- ✚ Francis, D.H. y Col. (1979). Characterization of the inclusion limiting membrane of *Anaplasma marginale* by immunoferriting labeling. *Am. J. Vet. Res.* 40: 777-782.
- ✚ Figueroa, J. V.; (1993). Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet. Parasitol.* 50: 69-81.
- ✚ Goff, W.; y Col. (1988). Detection of *Anaplasma marginale* infected tick vectors by using a cloned DNA probe. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 919-92.
- ✚ Hidalgo, R. J. y col. (1989). *Anaplasma marginale* in tick cell culture. *American Journal Veterinary Research.* 50: 2028-2032.
- ✚ Kocan, K. M., W. L. Goff, D. Stiller, P. L. Claypool, W. Edwards, S. A. Ewing, J. A. Hair, and S. J. Barron. 1992. Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male dermancentor *andersoni* (Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible cattle. *J. Med. Entomol.* 29:657-668.
- ✚ Kocan, K. M. y Col. (1981). Transmision of *Anaplasma marginale* Theiler by *Dermacentor andersoni* Stiler and *Dermacentor variabilis* (say). *Am. J. Vet. Res.* 42: 15- 18.
- ✚ Kocan, K. M. y Col. (1986). Longevity of colonies of *Anaplasma marginale* in midget epithelial cells of *Dermadencentor andersoni*. *Am. J. Vet. Res.* 47: 1657-1661.

- ✚ The Merck Veterinary manual, 2008
- ✚ Mariana Herrera,1 Microb, Ángela Soto,1 Microb, Viviana Urrego,1 Microb, Gloria Rivera,2 Bact, Mario Zapata,1,3 Msc, Leonardo Rios*1,3, Phd. Frecuencia de Hemoparásitos en Bovinos del Bajo Cauca y Alto San Jorge, 2000-2005
- ✚ Maxine M. Benjamín: compendio de patología clínica veterinaria
- ✚ Munderloh, U. G. y Col. (1996). Stablishment of the tick (Acari: Ixodidae)- borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in tick cell culture. *J. Med. Entomol.* 32: 656-664.
- ✚ McGarey, D. J. y Allred, D. R, (1994). Characterization of hemagglutinating components of the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. *Infect. Immun.* 62: 4587-4593.
- ✚ Nakamura, Y. Col. (1989). Enzyme-linked immunosorbent assay using solubilised antigen for detection of antibodies to *Anaplasma marginale*. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 20: 259-266.
- ✚ Ortiz, F.; Corona, B & Martínez, S. 2000. Perspectivas para una vacuna eficaz contra la Anaplasmosis bovina. PDF. Consultado en enero de 2012. Disponible en: http://ftp.censa.edu.cu/revistas_censa/rsa/v22n3/p137-145.pdf
- ✚ Palmer, G., Brow, & Rurangirwa, F. 2000. Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Microbes and infections.* 2: 167
- ✚ Palmer, G. H. y McElwain, T. F. (1995). Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Vet. Parasit.* 57: 233-253

- ✚ Quincosa, J. y Alvarez, A. 2006. Fisiología de la sangre [en línea] Disponible:[http://infoservet/root/Soporte/doc/\(FISIOLOGIA%20BASICA\)%20Sangre.doc1](http://infoservet/root/Soporte/doc/(FISIOLOGIA%20BASICA)%20Sangre.doc1) [Consulta: abril, 24 2006].
- ✚ Reyna-bello, a. 2009. Anaplasmosis bovina (taxonomía, síntomas, situación epidemiológica, importancia y control.). Curso teórico práctico: enfermedades transmisibles por garrapatas en el ganado bovino: generalidades, diagnóstico y control.
- ✚ (Ristic y Watrach, 1963; Palmer y Mcguire 1984; Ristic y kreier 1984). El microorganismo se replica dentro del eritrocito por fisión binaria para formar hasta ocho organismos individuales dentro de una vacuola simple.
- ✚ Ribeiro, M. F.; Passos, L. M. (1996). Stich y col (1997). Ultrastructural alterations on *Anaplasma marginale* caused by dimethyl sulfoxide. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 48: 657-664.
- ✚ Ristic m. & kreier J.P. (1984). Family III. Anaplasmataceae MD, USA, 719–729.
- ✚ Ristic, M. y Kreir, J. P. (1984). *Anaplasma*. p. 719-722. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*,
- ✚ Richey, E. J. y Palmer, G. H. (1990). Bovine Anaplasmosis. *The Compendium Food Animal.* 12: 1661-1669.
- ✚ Rodríguez S., García M., Aboites G., y, Cantó R., 2003. Inmunología e Inmunoprofilaxis de la Anaplasmosis Bovina. *Revista Ciencia Veterinaria*; México, 9-2003-4; pp 123
- ✚ Senasa. 2006. Manual de anaplasmosis y babesiosis.
- ✚ Soulsby, e. J. L. *Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los Animales domésticos*. Interamericana. 7ma ed. México. 766 pp. 1988.

- ✚ Soto, K.; 2010. Determinación de la Prevalencia de Anaplasmosis en el ganado bovino faenado en La Empresa Metropolitana de rastro de Quito (EMRQ) mediante la aplicación de las Técnicas de diagnóstico: microscopía de frotis Sanguíneos, reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y ensayo Inmunoenzimático Competitivo (ELISA).
- ✚ Schaffer, L. 1981. Effects of age, temperature season and breed on blood characteric of dary cattle. Jour of Darry, 64(4): 62-70. Schalm, 1975. Veterinary Hematology. Philadelphia, USA. Ed. Lea and Febiger.
- ✚ Smith, r. D. Epidemiología de la Anaplasmosis y Babesiosis Bovina. En: Giardina, s. Y García, f. Hemoparásitos: biología y diagnóstico. Colección cuadernos USB. Caracas, Venezuela: 53-71 p. 1990.
- ✚ Tavares, L., C. Núñez Y A. Reyna-Bello. 2004. "Estandarización de un ensayo inmunoenzimático para el diagnóstico de la anaplasmosis en pequeños rumiantes de la Estación Experimental La Iguana". I Simposio Internacional. In: II Simposio Nacional: Hemoparásitos y Sus vectores". Caracas-Venezuela, del 14 al 16 de Octubre.
- ✚ Trueblood, E. S.; y Col. (1991). Detection of *Anaplasma marginale* rickettsemia prior to onset of clinical signs by using an antigen capture enzyme linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 29: 1542-1544.
- ✚ Theiler, A. 1908. *Anaplasma marginale* (gen. spec. nov.). the marginale points in the blood of cattle suffering from a specific disease. In: Report of the government Veterinary bacteriologist. Transvaal, South Africa. A. Theiler (ed.).p. 7-64
- ✚ Vanzini, v. & Ramírez, I. 1994. Babesiosis y Anaplasmosis bovina: diagnóstico, epidemiología y control. Ria 25: 137–190.
- ✚ Vega, E. y Figueredo, J. 2005. Parámetros hematológicos por sexo de codornices (*Conturnix japonica*) mantenidas bajo las condiciones reguladas para pruebas ecotoxicológica. Salud Animal, 27(1): 59-61.

- ✚ Villamil g. 2005. Determinación de Anaplasma Centrale y Marginale en el ganado bovino en las haciendas ganaderas del norte del cantón Chone, provincia de Manabí. Tesis de grado. Facultad de medicina veterinaria, universidad agraria del ecuador. (pp 50).
- ✚ Visser, E. y Ambrosio, R. E. (1987). DNA probes for detection of Anaplasma centrale and Anaplasma marginale. Onderstepoort. J. vet. Res. 54: 623-627.
- ✚ Viseshakul y col. (2002). Sequence and expression analysis of a surface antigen gene family of the rickettsia Anaplasma marginale. Department of Pathobiology, University of Florida. PO Box 110880.
- ✚ Zaugg, J. L. (1990). Seasonally of natural transmission of bovine anaplasmosis under desert mountain range conditions. Jauma. 196: 1106-1109
- ✚ <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf>
- ✚ http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.3.07_Anaplasmosis_bovina.pdf
- ✚ <http://www.higiene.edu.uy/parasito/trabajos/elisa.pdf>
- ✚ <http://www.monografias.com/trabajos41/anaplasmosis-bovina/anaplasmosis-bovina.shtml>
- ✚ <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040405/040511.pdf>
- ✚ <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol9/CVv9c5.pdf>
- ✚ http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S079822592007000400006&script=sci_abstract
- ✚ <http://blogs.censa.edu.cu/belkis/files/2012/02/clonaje-del-gen.pdf>

Anexo 3. Socialización de resultados con los estudiantes de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Loja

INTRODUCCIÓN:

- Tradicionalmente se refiere a una enfermedad de los ruminantes causada por bacterias intra-eritrocíticas obligadas del género *Anaplasma*. La enfermedad clínica es más notable en el ganado bovino, pero otros ruminantes como el búfalo de agua, bisontes, antílopes africanos y algunas especies de ciervos se pueden infectar persistentemente.



- Es una enfermedad infecciosa pero no contagiosa, se transmite por las picaduras de garrapatas o la transferencia mecánica de los eritrocitos frescos de moscas que pican o equipos quirúrgicos.
- Anaplasmosis bovina se produce en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, incluyendo América del Sur y Central, los estados unidos (EE.UU.), el sur de Europa, África, Asia y Australia (The Merck Veterinary Manual, 2008)

ANAPLASMOSIS BOVINA

- Es una enfermedad infecciosa transmisible que afecta a los bovinos, ovinos, caprinos y algunos ruminantes salvajes el agente causal es una *Rickettsia* llamada *Anaplasma* intra-eritrocíticas que es altamente específica para el vertebrado pero no para el vector



ETIOLOGÍA

- Es una *rickettsia* del genogrupo II de las ehrlichias, que parasita los eritrocitos maduros del ganado bovino y causa severas pérdidas económicas fundamentalmente en las zonas tropicales y subtropicales

TRANSMISIÓN

- Es transmitida por artrópodos como garrapatas: Ixodes ricinus, Boophilus microplus, Dermacentor y Amblyomma
- **Transmisión mecánica:** Por picaduras de artrópodos hematófagos y después de descornaduras, castraciones y vacunaciones
- **transmisión vertical:**

SINTOMATOLOGÍA

- Placenta-feto, en el segundo y tercer trimestre de gestación infecta al feto.
- **transmisión biológica:**
- A la par con la T. mecánica a través de las lavar de garrapatas. Tiene un periodo de 30 días, seguido de una etapa aguda de una semana durante la cual se multiplica activamente dentro de los eritrocitos
- **Fase aguda:** Temperatura de hasta 41°C, es el primer sintoma, es seguida de anorexia, depresión y debilidad muscular, acompañada de una acidosis severa, la destrucción de eritrocitos, trae palidez mucosal, sangre acuesa e ictericia.

- **Fase hiperaguda:** ocurre una pérdida dramática de peso, aborto de vacas preñadas, fallo cardiopulmonar y muerte, estas últimas consecuencias ocurren con frecuencia al cabo de las 24 a 36 horas del pico de parasitemia, donde se ha infectado un 90 % de los eritrocitos.

DIAGNÓSTICO

- diagnóstico diferencial de fiebre, anemia hemolítica aguda en el ganado adulto incluye *babesiosis*, *eperytrozoonosis*, *theileriosis*, leptospirosis, hemoglobinuria bacilar, hemoglobinuria postparto, toxicidad por plantas y ántrax.
- Entre los métodos utilizados podemos citar la subinoculación de eritrocitos infectados, la tinción de Giemsa a los frotis de sangre, ELISA que detecta antígeno y las técnicas

moleculares, como hibridación de ácidos nucleicos y PCR.

HEMOGRAMA BOVINO

- Es un examen relativamente simple, nos ayuda en la evaluación diagnóstica. Este examen entrega datos sobre (Hto), (Hb), (CHCM), (VCM), recuento de eritrocitos, leucocitos y plaquetas.
- Los valores hematológicos resultan de gran interés en el laboratorio, ya que ellos constituyen una referencia adicional para el clínico que debe valorar los cambios cuantitativos y cualitativos
- Varios son los factores que pueden provocar alteraciones no patológicas como: toma de la muestra, excitación o temor del animal en el momento de la extracción, velocidad de extracción, sujeción química, ejercicio previo, especie, raza, sexo, estado fisiológico y edad

COMPONENTE	Unidad (SI)	Bovino
Hematocrito	$\times 10^2 / l$	24-46
Hemoglobina	$\times 10 g / l$	8-15
Eritrocitos	$\times 10^{12} / l$	5-10
Recuento plaquetas	$\times 10^{11} / l$	1-8
Leucocitos	$\times 10^9 / l$	4-12
Linfocitos	$\times 10^9 / l$	2-7
Monocitos	$\times 10^9 / l$	0,02-0,85
Eosinófilos	$\times 10^9 / l$	0-2,4
Basófilos	$\times 10^9 / l$	0-0,2

CONTROL DE LA ENFERMEDAD

- Se puede reducir manteniendo el ganado susceptible en pastos no infestados, especialmente las hembras gestantes, el uso de acaricidas sobre los propios animales, en baños o aspersión. La vacuna recombinante Gavac permite una significativa mejora en el control de las poblaciones de garrapatas *Boophilus microplus*.

TRATAMIENTO

- las tetraciclinas son muy eficaces curativa y preventivamente, puede usarse también la sulfametacina.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS

NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

"DIAGNÓSTICO DE ANAPLASMOSIS BOVINA POR LOS MÉTODOS DE GIEMSA Y ELISA INDIRECTO Y SU RELACIÓN CON LOS VALORES SANGUÍNEOS, EN LA PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE "

AUTOR: LUIS EDUARDO TORRES QUILLE

DIRECTORA:

Dra. PATRICIA AVORA FERNÁNDEZ

LOJA-ECUADOR

2014

1859

Firmas de los asistentes: Módulo 3



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

"DIAGNÓSTICO DE ANAPLASMOSIS BOVINA POR LOS MÉTODOS DE GIEMSA Y ELISA
INDIRECTO Y SU RELACIÓN CON LOS VALORES SANGUÍNEOS, EN LA PROVINCIA DE ZAMORA
CHINCHIPE"

Por: Egdo. Luis Eduardo Torres Quille

Martes 2 de diciembre del 2014

NOMBRES Y APELLIDOS	N° CEDULA	FIRMA
Pardo Jiménez Julio Esosa	1105262461	
Pineda Garabai Priscila	1105736092	
Wilmer Juan Patiño	1106080789	
Francisco Calderón	1105227639	
Kimberly Campoverde	1105564528	
Byron Odonéz	1105952806	
Fabian Córdova	1105338519	
María Pogo	110458884-1	
Cristian Argumando	1105930240	
Pablo Carrion	1900651264	
Eduardo Ludeña	1104711815	
Miryam Puchacela R	11041991342	
Ibeth Stephania Paccha	190057688-3	
Jefferson Risús	1105642647	
Belen Goona	1105959454	
Nathaly León	1150321139	
Marivai Jumbo	1105111221	
Briggette Tenezaca	1105907339	
Ronald Coronado	1900720374	

Casilla "B"

teléfono: 2546672

Correo electrónico veterinariaunl@yahoo.es
Ciudad universitaria "Guillermo Falconi Espinosa"
Loja-Ecuador



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

NOMBRES Y APELLIDOS	N° CEDULA	FIRMA
Wilson Pinta	1109636227	
Freddy Guerrero	1105944423	
César Saquivalca	1105935900	
Byron Azarezo	0106381929	

Casilla "B"

teléfono: 2546672

Correo electrónico veterinariaunl@yahoo.es
Ciudad universitaria "Guillermo Falconi Espinosa"
Loja-Ecuador

Módulo 4:



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
 ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES
 CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

"DIAGNÓSTICO DE ANAPLASMOSIS BOVINA POR LOS MÉTODOS DE GIEMSA Y ELISA
 INDIRECTO Y SU RELACIÓN CON LOS VALORES SANGUÍNEOS, EN LA PROVINCIA DE ZAMORA
 CHINCHIPE"

Por: Egdo. Luis Eduardo Torres Quille

Martes 2 de diciembre del 2014

NOMBRES Y APELLIDOS	N° CEDULA	FIRMA
Yanela Paola Romero Rora	0707003448	Paola Romero
Shulliana Gabriela Arceiza Cordero	1106091663	Shulliana
REBECA DEL CISNE ORTEGA NAVEIRA	1105616187	Rebeca
YESSICA FERNANDA CUENCA R.	110496835-7	Yessica
Jhanson Andrés Sarango A.	1105575623	Jhanson
David Israel Huilpa P.	110427831-0	David
José Luis Quezada M.	1000839802	José Luis
Yesmani José Celi Poma	0705623502	Yesmani
Jonathan Blodimir Solano Pineda	0706912111	Jonathan
Jocelyn Natalia Toledo Cordero	110405748-2	Jocelyn
Stephany Jaqueline Vera Rogel	1104103984	Stephany
Angel Eduardo Calderón A.	1104552247	Angel
Johanna Jacheline Jumbo E.	1726662388	Johanna
Manuel F. Reyes Torres	1104937348	Manuel
Jorge Andrés Córdova Vivanco	1104582711	Jorge
María Inés Gualan Cango	1104235448	María Inés
Mónica Salome Zurruiga	1105741662	Mónica

Casilla "B"

teléfono: 2546672

Correo electrónico veterinariaunl@yahoo.es

Ciudad universitaria "Guillermo Falconi Espinosa"

Loja-Ecuador

Anexo 3. Diagnóstico general de anaplasmosis bovina (*A. Marginale*)

Nro.	Muestras				Código	Resultado Giemsa	Resultado ELISA
	Sexo	Edad	Raza	procedencia			
1	H	5ª	HOLLSTEIN	YANTZAZA (N)	F1M1 N	POSITIVO	NEGATIVO
2	H	4ª	HOLLSTEIN	YANTZAZA (N)	F1M2 N	NEGATIVO	POSITIVO
3	H	7ª	HOLLSTEIN	YANTZAZA (N)	F1M2 N	POSITIVO	POSITIVO
4	H	4ª	HOLLSTEIN	YANTZAZA (N)	F1M4 N	POSITIVO	POSITIVO
5	H	5ª	HOLLSTEIN	YANTZAZA (N)	F2M1 N	NEGATIVO	POSITIVO
6	H	7m	HOLLSTEIN	YANTZAZA (N)	F2M2 N	POSITIVO	POSITIVO
7	M	2ª	HOLLSTEIN	YANTZAZA (N)	F2M3 N	POSITIVO	POSITIVO
8	H	6ª	HOLLSTEIN	PANGUI (N)	F3M1 N	NEGATIVO	POSITIVO
9	M	6m	HOLLSTEIN	PANGUI (N)	F3M2 N	POSITIVO	POSITIVO
10	H	5ª	HOLLSTEIN	PANGUI (N)	F3M3 N	POSITIVO	POSITIVO
11	M	3ª	HOLLSTEIN	PANGUI (N)	F4M1 N	NEGATIVO	POSITIVO
12	H	7m	HOLLSTEIN	PANGUI (N)	F4M2 N	POSITIVO	POSITIVO
13	H	2.5ª	HOLLSTEIN	PANGUI (N)	F4M3 N	POSITIVO	POSITIVO
14	H	4ª	HOLLSTEIN	PANGUI (N)	F5M1 N	POSITIVO	POSITIVO
15	H	3ª	HOLLSTEIN	PANGUI (N)	F5M2 N	POSITIVO	POSITIVO
16	H	5ª	HOLLSTEIN	PANGUI (N)	F5M3 N	NEGATIVO	POSITIVO
17	H	6ª	MESTIZA	ZUMBI (S)	F1M1 S	POSITIVO	POSITIVO
18	M	9m	MESTIZA	ZUMBI (S)	F1M2 S	POSITIVO	POSITIVO
19	M	2ª	MESTIZA	ZUMBI (S)	F1M3 S	POSITIVO	POSITIVO
20	H	5ª	MESTIZA	ZUMBI (S)	F2M1 S	POSITIVO	POSITIVO
21	H	4ª	MESTIZA	ZUMBI (S)	F2M2 S	POSITIVO	POSITIVO
22	M	6ª	MESTIZA	ZUMBI (S)	F2M3 S	NEGATIVO	POSITIVO
23	H	4ª	BROW SUIS	ZUMBI (S)	F3M1 S	NEGATIVO	POSITIVO
24	M	4,5ª	BROW SUIS	ZUMBI (S)	F3M2 S	POSITIVO	POSITIVO
25	H	6ª	HOLLSTEIN	ZUMBI (S)	F3M3 S	POSITIVO	POSITIVO
26	H	5ª	HOLLSTEIN	PALANDA (S)	F4M1 S	NEGATIVO	POSITIVO
27	H	6m	HOLLSTEIN	PALANDA (S)	F4M2 S	POSITIVO	POSITIVO
28	H	2ª	HOLLSTEIN	PALANDA (S)	F4M3 S	POSITIVO	POSITIVO
29	H	3ª	BROW SUIS	PALANDA (S)	F5M1 S	NEGATIVO	POSITIVO
30	H	6m	BROW SUIS	PALANDA (S)	F5M2 S	POSITIVO	POSITIVO
31	H	5ª	HOLLSTEIN	PALANDA (S)	F5M3 S	POSITIVO	POSITIVO
32	H	6m	HOLLSTEIN	ZAMORA (E)	F1M1 E	POSITIVO	POSITIVO
33	H	4ª	HOLLSTEIN	ZAMORA (E)	F1M2 E	NEGATIVO	POSITIVO
34	H	3m	HOLLSTEIN	ZAMORA (E)	F1M3 E	POSITIVO	POSITIVO
35	H	3ª	HOLLSTEIN	ZAMORA (E)	F2M1 E	POSITIVO	POSITIVO
36	H	4ª	HOLLSTEIN	ZAMORA (E)	F2M2 E	POSITIVO	POSITIVO
37	H	8m	HOLLSTEIN	ZAMORA (E)	F2M3 E	NEGATIVO	POSITIVO

38	H	6m	BROW SUIS	ZAMORA (E)	F3M1 E	POSITIVO	POSITIVO
39	H	4 ^a	BROW SUIS	ZAMORA (E)	F3M2 E	POSITIVO	POSITIVO
40	H	5 ^a	HOLLSTEIN	ZAMORA (E)	F3M3 E	POSITIVO	POSITIVO
41	H	5m	HOLLSTEIN	ZAMORA (E)	F4M1 E	NEGATIVO	POSITIVO
42	H	3 ^a	HOLLSTEIN	ZAMORA (E)	F4M2 E	POSITIVO	POSITIVO
43	H	5 ^a	HOLLSTEIN	ZAMORA (E)	F4M3 E	NEGATIVO	POSITIVO
44	H	6 ^a	HOLLSTEIN	ZAMORA (E)	F5M1 E	NEGATIVO	POSITIVO
45	H	5m	HOLLSTEIN	ZAMORA (E)	F5M2 E	POSITIVO	POSITIVO
46	H	2 ^a	HOLLSTEIN	ZAMORA (E)	F5M3 E	POSITIVO	POSITIVO
47	H	4 ^a	HOLLSTEIN	NANGARITZA (O)	F1M1 O	NEGATIVO	POSITIVO
48	H	6 ^a	BROW SUIS	NANGARITZA (O)	F1M2 O	NEGATIVO	POSITIVO
49	H	4 ^a	BROW SUIS	NANGARITZA (O)	F1M3 O	NEGATIVO	POSITIVO
50	H	2 ^a	HOLLSTEIN	NANGARITZA (O)	F2M1 O	POSITIVO	POSITIVO
51	H	5 ^a	HOLLSTEIN	NANGARITZA (O)	F2M2 O	NEGATIVO	POSITIVO
52	M	1 ^a	HOLLSTEIN	NANGARITZA (O)	F2M3 O	NEGATIVO	POSITIVO
53	H	7 ^a	JERSEY	NANGARITZA (O)	F3M1 O	NEGATIVO	POSITIVO
54	H	3 ^a	JERSEY	NANGARITZA (O)	F3M2 O	POSITIVO	POSITIVO
55	M	7m	HOLLSTEIN	NANGARITZA (O)	F3M3 O	NEGATIVO	POSITIVO
56	H	3 ^a	HOLLSTEIN	NANGARITZA (O)	F4M1 O	NEGATIVO	POSITIVO
57	H	5 ^a	HOLLSTEIN	NANGARITZA (O)	F4M2 O	NEGATIVO	POSITIVO
58	H	3 ^a	HOLLSTEIN	NANGARITZA (O)	F4M3 O	NEGATIVO	POSITIVO
59	H	5 ^a	HOLLSTEIN	NANGARITZA (O)	F5M1 O	NEGATIVO	POSITIVO
60	H	5 ^a	BROW SUIS	NANGARITZA (O)	F5M2 O	NEGATIVO	POSITIVO
61	H	3 ^a	HOLLSTEIN	NANGARITZA (O)	F5M3 O	NEGATIVO	POSITIVO

Anexo 4. Diagnóstico por ELISA Indirecta (iELISA)

UBICACIÓN DE MUESTRAS EN CELDAS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	Control +	F1M1 N	F3M2 N	F1M1 S	F3M3 S	F1M2 E	F4M1 E	F1M3 O	F4M2 O
B	Control +	F1M2 N	F3M3 N	F1M2 S	F4M1 S	F1M3 E	F4M2 E	F2M1 O	F4M3 O
C	Control -	F1M3 N	F4M1 N	F1M3 S	F4M2 S	F2M1 E	F4M3 E	F2M2 O	F5M1 O
D	Control -	F1M4 N	F4M2 N	F2M1 S	F4M3 S	F2M2 E	F5M1 E	F2M3 O	F5M2 O
E	C. agua	F2M1 N	F4M3 N	F2M2 S	F5M1 S	F2M3 E	F5M2 E	F3M1 O	F5M3 O
F		F2M2 N	F5M1 N	F2M3 S	F5M2 S	F3M1 E	F5M3 E	F3M2 O	
G		F2M3 N	F5M2 N	F3M1 S	F5M3 S	F3M2 E	F1M1 O	F3M3 O	
H		F3M1 N	F5M3 N	F3M2 S	F1M1 E	F3M3 E	F1M2 O	F4M1 O	

RESULTADOS DE ANALISIS POR ELISA INDIRECTO DENSIDAD ÓPTICA											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
Prom. Cont. +	1,00	A	1	0,224	0,97	1,142	0,915	0,688	0,488	1,235	0,795
		B	0.9	0,537	0,999	0,49	0,432	0,461	0,831	0,522	0,386
Prom. Cont. (-)	0,198	C	0,196	0,583	0,711	0,602	1,437	0,818	1,15	1,211	0,294
		D	0,2	0,355	0,996	1,409	1,542	1,146	0,52	0,817	1,164
		E	0,197	0,481	1,784	1	0,745	0,411	0,58	0,674	0,617
		F	0,194	0,436	0,661	0,637	0,492	1,039	0,832	0,391	
		G		0,45	1,179	0,797	0,665	0,997	1,46	0,349	
PP Control (-)	19,8	H		1,294	0,764	0,523	0,949	0,4	0,918	0,565	

VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS POR ELISA INDIRECTO (PORCENTAJE DE POSITIVIDAD)											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
DO Control +	0,9 - 2,3	A	1	22,4	97	114,2	91,5	68,8	48,8	123,5	79,5
PP control (-)	< 20	B	0.9	53,7	99,9	49	43,2	46,1	83,1	52,2	38,6
		C	0,196	58,3	71,1	60,2	143,7	81,8	115	121,1	29,4
PP < 25 negativo		D	0,2	35,5	99,6	140,9	154,2	114,6	52	81,7	116,4
PP > 25 positivo		E	0,197	48,1	178,4	100	74,5	41,1	58	67,4	61,7
		F	0,194	43,6	66,1	63,7	49,2	103,9	83,2	39,1	
		G		45	117,9	79,7	66,5	99,7	146	34,9	
		H		129,4	76,4	52,3	94,9	40	91,8	56,5	

Anexos 5. Fotografías En Fincas

a) Aplicación de encuestas a propietarios de fincas



b) Extracción de sangre bovina.



c) Identificación de la muestra y conservación en refrigeración en termo.



d) Presencia de garrapatas en ganado.





e) Retención de humedad y tipo de suelo en fincas.



f) Temperatura y altura de pasto en las fincas.



g) Ubicación de fincas por medio de GPS medir (msnm).



Anexos 6. Fotografías en laboratorio de diagnóstico veterinario.

a. Elaboración de frotis sanguíneo.

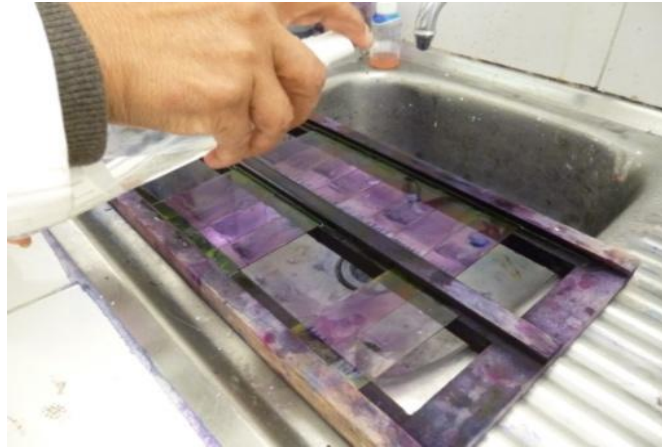


b. Aplicación de alcohol metanol a placas.

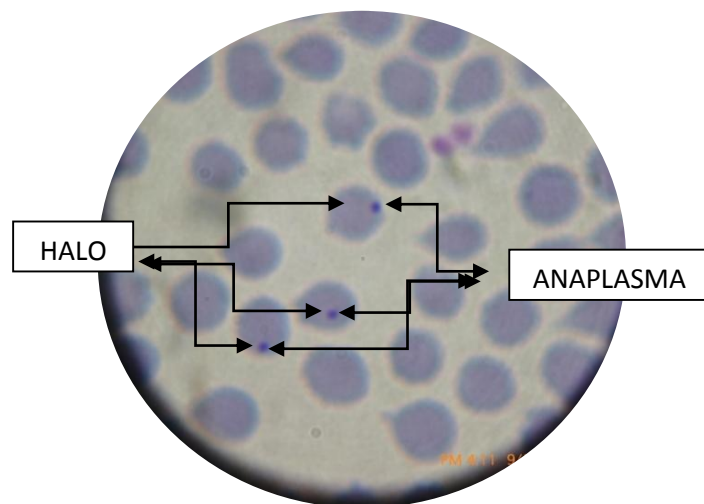
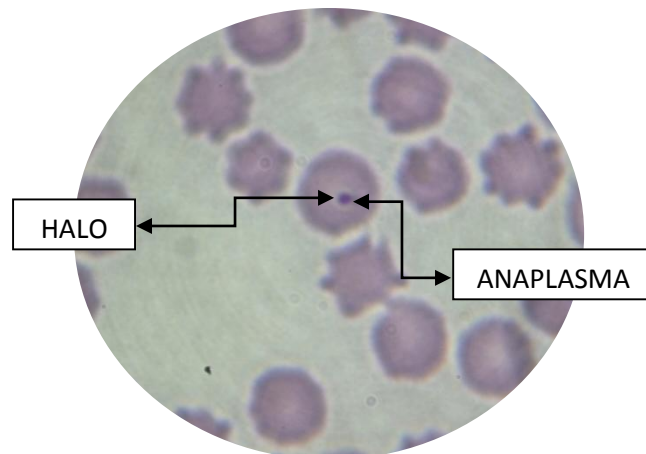


c. Tinción con Giemsa y lavado de placas con agua destilada.





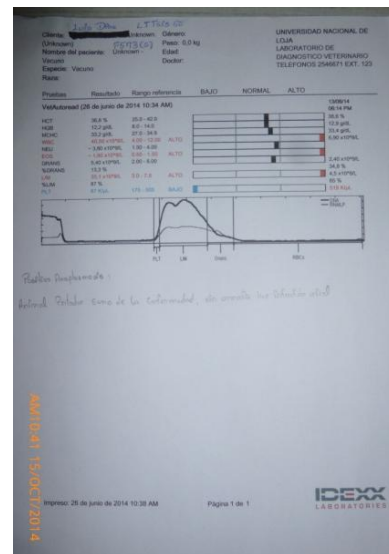
- d. Observación de placas al microscopio con el lente de 100x. previa aplicación de aceite de inmersión.



Anexo 7. Fotografías de elaboración de hemograma

I. Colocación de muestra de sangre en tubos QBC y análisis de la sangre por hemograma bovino

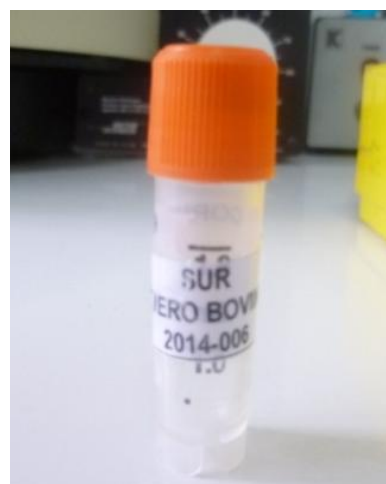




Anexos 8. Fotografías de análisis de suero de sangre para ELISA INDIRECTO (iELISA)

- Centrifugación de muestras de sangre en 15 minutos a 1000 rpm y colocación en micro tubos para su conservación en congelación -20° c



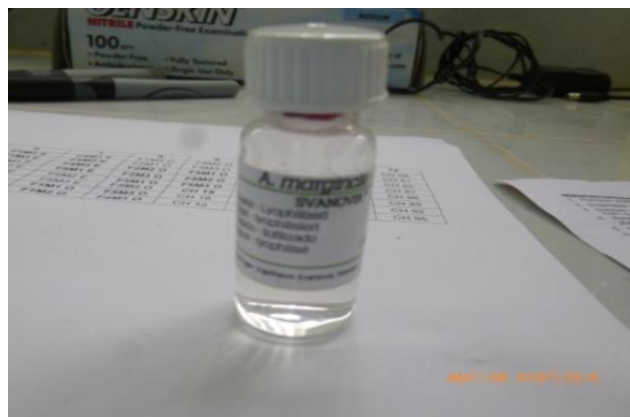


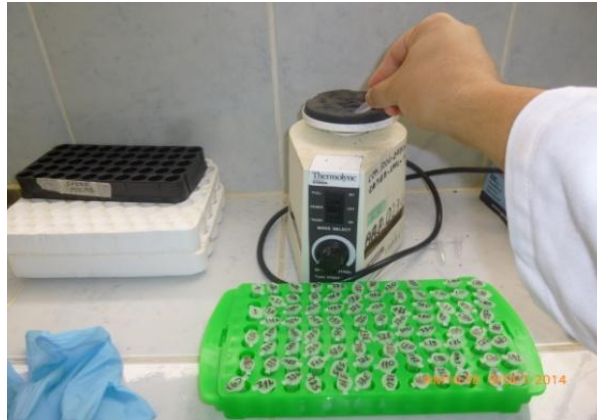
- ii. Descongelación de muestras a temperatura ambiente y preparación del PBS-tween buffer



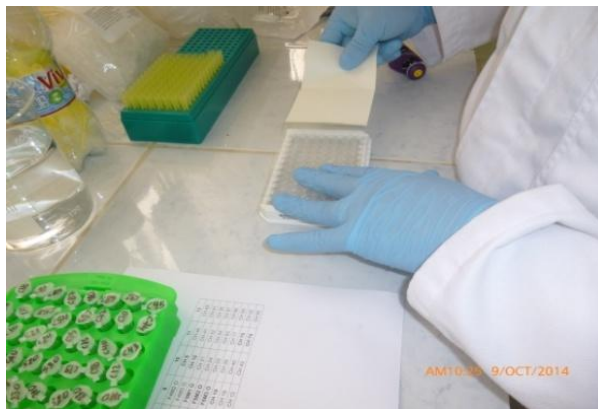


- iii. Colocación de la muestra en tubos reconstitución del conjugado IgG anti-bovina



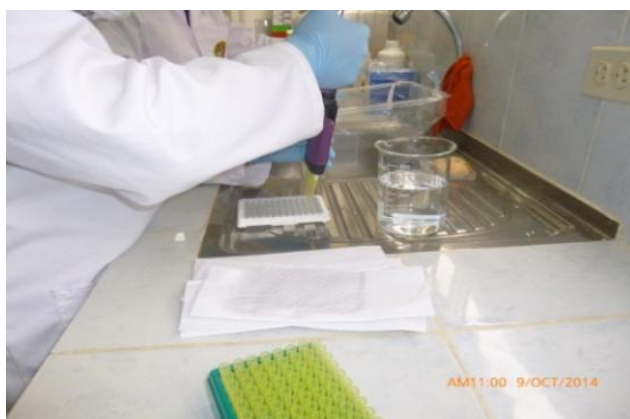


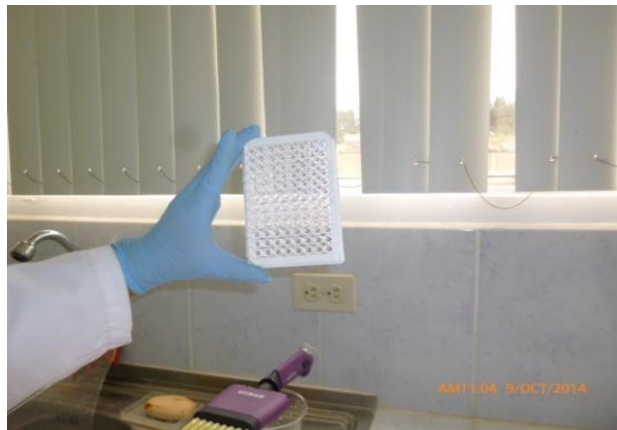
- iv. Pruebas de control de suero y muestras prediluidas 1/40 en PBS-tween y sellado de placas / tiras.



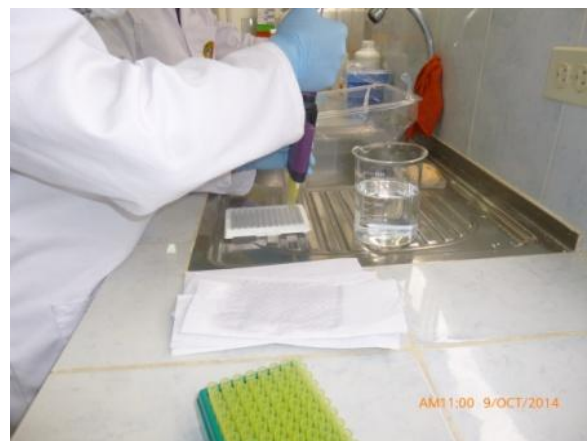
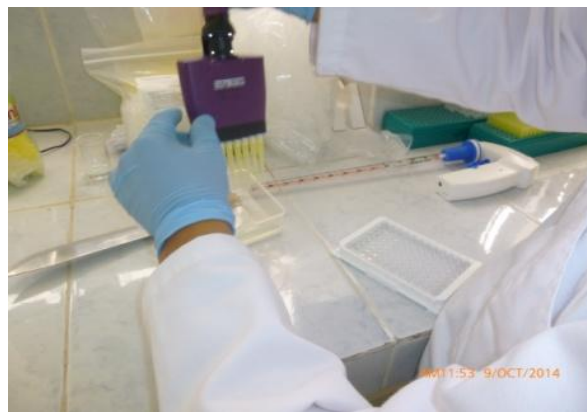
- v. Incubacion por 30 minutos y lavado de placas con tampon PBS-tween



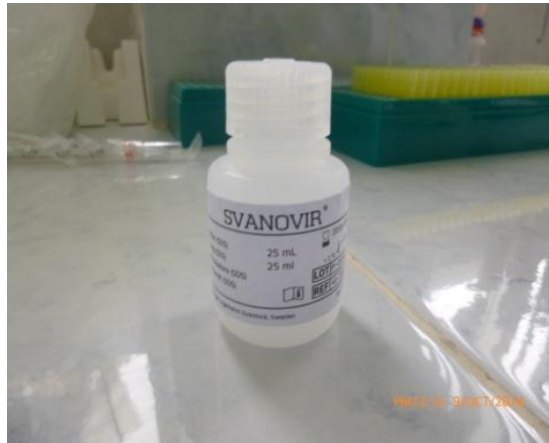




vi. Inclusión de HRP conjugado, sellado, incubación y lavado de la placa.

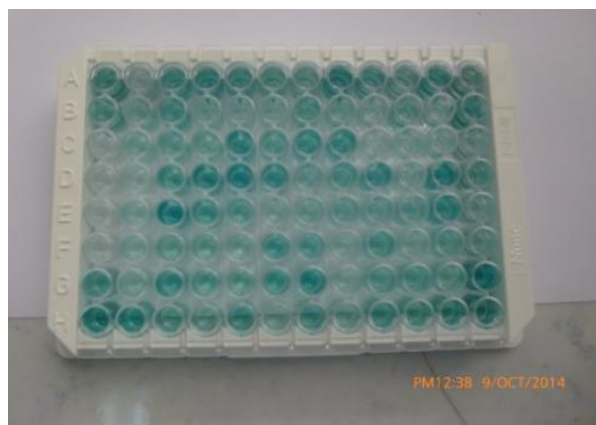
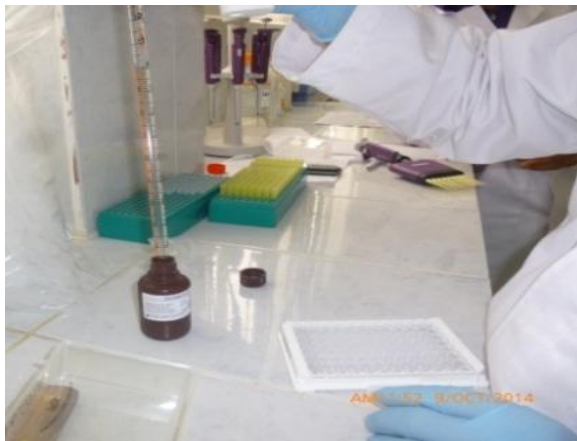


- vii. Añadir solución de sustrato, incubar y cronometrar con el llenado del primer pocillo.



- viii. Aplicación de la solución de parada





ix. Medición de la Densidad Óptica (DO) por medio del fotómetro



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
22	0.000															
23	0.004	A	0.000	0.220	0.407	0.562	0.695	0.800	0.888	0.958	0.996	1.008	0.996	0.968	0.927	
24	0.004	B	0.004	0.007	0.009	0.011	0.012	0.011	0.010	0.009	0.008	0.007	0.006	0.005	0.004	
25	0.100	C	0.100	0.103	0.105	0.107	0.108	0.109	0.109	0.109	0.108	0.107	0.106	0.105	0.104	
26	0.2	D	0.2	0.201	0.202	0.203	0.204	0.204	0.204	0.204	0.203	0.203	0.202	0.201	0.200	
27	0.500	E	0.500	0.481	0.459	0.433	0.404	0.373	0.340	0.306	0.271	0.236	0.200	0.164	0.128	
28	0.700	F	0.700	0.646	0.561	0.453	0.342	0.239	0.150	0.081	0.037	0.018	0.009	0.005	0.003	
29	1.000	G	1.000	0.85	0.619	0.397	0.265	0.192	0.140	0.101	0.071	0.051	0.039	0.030	0.024	
30	22.0021429	H	22.0021429	0.294	0.164	0.123	0.089	0.4	0.010	0.005	0.003	0.002	0.001	0.001	0.001	