







Detección y caracterización molecular de *Anaplasma marginale* en ADN de muestras de sangre de bovinos provenientes de Paraguay

Detection and molecular characterization of *Anaplasma marginale* in DNA from blood samples of bovines from Paraguay


Olga Lorena Núñez Yegros^{1*}, María de Lourdes Narváez Quiñónez¹, Alba María Araujo Oviedo¹, Guillermo Giménez Bareiro¹, Ingrid Paloma Florentín Ibarra¹, Lino César Ramírez Ayala²


¹ Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Veterinarias. Laboratorio de Biotecnología Animal. San Lorenzo, Paraguay


² Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria. Programa de Genética y Mejora Animal. Cataluña, España



*Autor correspondiente:
lnunez@vet.una.py

Editora de área:
Patricia Criscioni¹, Universidad Nacional de Asunción (UNA). Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV). San Lorenzo, Paraguay.

Editora jefe:
Griselda A. Meza Ocampos¹, Universidad Nacional de Asunción (UNA). Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT). San Lorenzo, Paraguay.


Co-editora:
Juliana Moura Mendes Arrúa¹, Universidad Nacional de Asunción (UNA). Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT). San Lorenzo, Paraguay.

Recibido:
20 de febrero de 2025

Revisado:
31 de marzo de 2025

Aceptado:
29 de abril de 2025

Recibido en versión modificada:
19 de mayo de 2025

Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una Licencia Creative Commons "CC BY 4.0". 

Declaración de conflicto: Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

e-ISSN 2709 -0817

Como citar: Núñez Yegros, O. L., Narváez Quiñónez, M. L., Araujo Oviedo, A. M., Giménez Bareiro, G., Florentín Ibarra, I. P., & Ramírez Ayala, L. C. (2025). Detección y caracterización molecular de *Anaplasma marginale* ADN de muestras de sangre de bovinos provenientes de Paraguay. *Revista investigaciones y estudios – UNA*, 16(2), pp. 6-17.

Resumen. *Anaplasma marginale* es una bacteria intraeritrocitaria responsable de la enfermedad conocida como anaplasmosis bovina, la misma tiene un gran impacto en la producción ganadera en regiones tropicales y subtropicales. La importancia del uso de PCR convencional (cPCR) radica en la detección temprana de infecciones persistentes, además, otros métodos de estudio pueden presentar limitaciones a la hora de realizar el diagnóstico. La región del gen Msp5, es específica para la detección de infecciones persistentes. El presente trabajo se realizó utilizando 86 muestras de ADN bovino, (sangre entera) mediante la técnica de cPCR para la amplificación del gen Msp5. el 35% (30/86) de las muestras fueron positivas para *Anaplasma marginale*. De las muestras positivas, tres fueron secuenciadas. El análisis determinó que el *A. marginale* obtuvo un nivel de identidad del 99 – 100%. La construcción del árbol filogenético demostró que las muestras obtenidas, se encontraban estrechamente relacionadas a otras secuencias anteriormente reportadas en países de Asia y África.. Este estudio evidencia la prevalencia de la enfermedad en el ganado paraguayo. Además, se destaca como la primera evidencia molecular de *A. marginale* en el Paraguay, por lo que se recomienda ampliar los estudios sobre su patogenicidad, mecanismo de transmisión y distribución geográfica.

Palabras clave: ADN, *Anaplasma marginale*, cPCR, bovino, sangre

Abstract. *Anaplasma marginale* is an intraerythrocytic bacteria responsible for the disease known as bovine anaplasmosis, which has a great impact on livestock in tropical and subtropical regions. The importance of using conventional PCR (cPCR) is the early detection of persistent infections, since other study methods may present limitations when are diagnosed. The region of the Msp5 gene is specific for the detection of persistent infections. The present work was carried out using 86 bovine DNA samples, from whole blood using the cPCR technique for the amplification of the Msp5 gene. Thirty five percent (30/86) of the samples were positive for *Anaplasma marginale*. Of the positive samples, three were sequenced. This analysis determined the presence of *A. marginale* with an identity level of 99 – 100%. The construction of the phylogenetic tree showed that the samples obtained were closely related to other sequences previously reported in countries from Asia and Africa. This study shows prevalence of the disease in Paraguayan cattle. Furthermore, it is noted that this is the first molecular evidence of *A. marginale* in Paraguay done by molecular techniques, so it is recommended to expand studies on its pathogenicity, transmission mechanism and geographical distribution.

Keywords: DNA, *Anaplasma marginale*, cPCR, bovine, blood.

Introducción

Anaplasma marginale es una bacteria intraeritrocítica obligatoria, responsable de la anaplasmosis bovina en animales domésticos y salvajes (Dumler et al., 2001; Rymaszewska & Grenda, 2008; Kocan et al., 2010). La enfermedad está ampliamente distribuida a nivel mundial, con una prevalencia significativa en regiones tropicales y subtropicales, donde representa un serio problema económico y productivo para la ganadería en áreas infestadas de garrapatas enzoóticas (Aubry & Geale, 2010). En Paraguay, estudios anteriores mediante el diagnóstico con frotis sanguíneo revelan una frecuencia de *Anaplasma* spp. en bovinos del 15%, 32% y 43% respectivamente (Balbuena, 2021; Espinoza, 2018; Castro, 2019). Por su parte, en Uruguay, Brasil y Bolivia evidencian una frecuencia de *Anaplasma marginale* del 22,7%, 23% y 30,7% respectivamente. (Parodi et al., 2021; De Souza Ramos et al., 2019; Ogata et al., 2021).

La enfermedad se transmite por garrapatas mediante la transferencia mecánica de sangre fresca del ganado infectado al ganado susceptible a través de moscas que pican o por fómites contaminados con sangre, incluidas agujas, marcas en las orejas, equipos de descornado y castración. En algunas regiones, la transmisión transplacentaria de *Anaplasma marginale* puede contribuir a la epidemiología de la anaplasmosis bovina (Wahba, 2017; Ben Said et al., 2018).

Tras la infección, *A. marginale* invade y se multiplica en los eritrocitos maduros. Durante la fase aguda de la enfermedad, la rickettsemia intraeritrocítica puede alcanzar concentraciones de hasta 10^9 organismos por mililitro de sangre, lo que provoca anemia hemolítica severa y una tasa de mortalidad del 36% (Palmer et al., 2000). Los animales que sobreviven a la fase aguda permanecen infectados de manera persistente, con ciclos fluctuantes de $10^2 - 10^7$ organismos por ml de sangre (French et al., 1998). Esta enfermedad genera pérdidas económicas significativas en las industrias de producción lechera y ganadera de carne a nivel global (Kocan et al., 2003). Se caracteriza por debilidad generalizada, pérdida de peso, fiebre, anemia severa, palidez de las membranas mucosas, aborto, letargo, ictericia, disminución de la producción de leche y, en muchos casos, la muerte de los animales afectados. En países en desarrollo, donde puede haber recursos limitados para el control de garrapatas y la atención veterinaria, la anaplasmosis bovina se convierte en un problema importante. (Zim et al., 2024).

La anaplasmosis bovina se puede detectar directa o indirectamente. Los métodos indirectos evalúan los anticuerpos generados por el contacto previo con los agentes. Las técnicas más comúnmente utilizadas son ELISA, inmunofluorescencia indirecta y aglutinación (Goff et al., 2003; Organización Mundial de Sanidad Animal, 2024). Estas técnicas son útiles para recopilar datos epidemiológicos como la prevalencia de estos agentes en un rebaño; sin embargo, no pueden utilizarse para la detección de enfermedades agudas. Los métodos directos se basan en la visualización de los parásitos dentro de los eritrocitos en frotis teñidos con Giemsa o en la detección del ADN mediante PCR (Parodi et al., 2021). La baciloscopia es la técnica

tradicional para la detección de *A. marginale*. Los parásitos se encuentran fácilmente en los eritrocitos bovinos cuando los animales se encuentran en la fase aguda de la infección (alta parasitemia). Sin embargo, la técnica del frotis tiene menor sensibilidad para detectar animales portadores o animales en las primeras etapas de la enfermedad. Además, la tinción utilizada puede generar artefactos, dando resultados falsos positivos, y requiere personal capacitado. Para superar estos problemas, las herramientas de biología molecular como la PCR pueden ser útiles y tienen mayor sensibilidad y especificidad (Brito et al., 2006).

Seis proteínas de superficie principales (MSP) de *A. marginale* están bien caracterizadas como msp1a, msp1b, msp2, msp3, msp4 y msp5. Estas proteínas están implicadas en la respuesta inmune y la producción de anticuerpos en los animales infectados (Tamekuni et al., 2009). El gen msp5 se caracteriza por su alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico molecular mediante PCR, lo que lo convierte en un marcador clave para la detección de infecciones persistentes. (Torioni de Echaide et al., 1998). Estudios revelan que la amplificación por PCR de los genes msp2 y msp5 tiene un nivel similar de capacidad de detección, no así el gen msp1, que presenta una tasa de positividad baja, la cual podría explicarse en parte por su intenso grado de diversidad de secuencias (Arnuphapprasert et al., 2023).

En Paraguay, el ganado bovino es de gran importancia económica para la industria ganadera. Actualmente en el país, solo unos pocos estudios citológicos han investigado la prevalencia de *Anaplasma* spp. en bovinos y ninguno específicamente *Anaplasma marginale* mediante técnicas moleculares, por lo que faltan informes epidemiológicos detallados que incluyen datos genéticos de este patógeno que circula en la zona. Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo la detección y caracterización molecular de esta bacteria en muestras de bovinos provenientes de Paraguay.

Materiales y Métodos

Área de muestreo

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Asunción (UNA).

Material Biológico

Fueron seleccionadas aleatoriamente 86 muestras del banco de ADN del Laboratorio de Biotecnología, las mismas fueron procesadas previamente durante el primer trimestre del año 2024 a partir de muestras de sangre entera bovina de aptitud de carne y leche que fueron remitidas al laboratorio con el propósito de ser analizadas por la técnica de PCR convencional para la detección de diversos hemopatógenos. Las mismas fueron extraídas mediante el kit comercial GeneJET (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante, obteniendo 50µL de ADN purificado. Posterior a su extracción fueron conservadas a -20 °C hasta su procesamiento. Se utilizó el NanoDrop ND-1000 para cuantificar las 86 muestras evaluadas por triplicado y se determinó el valor promedio de la concentración y pureza del ADN de cada una de las muestras. Se trabajó con muestras de ADN con una concentración promedio de 20 a 90 ng/µL.

PCR convencional (c) para la detección de *Anaplasma marginale*

Las muestras se procesaron mediante la técnica de PCR convencional utilizando los cebadores *msp5F* 5'GTGTTTCGTGGGGTGTGATAGATGAG3' y *msp5R* 5'TAAGAATTAAGCATGTGACCGCTGAC3', que delimitan todos los genes *msp5* de *A. marginale*, y una región no traducida de 3', según Silva et al. (2006), para amplificar una región de 653 pares de bases. Como control positivo se utilizó ADN de un bovino naturalmente infectado previamente secuenciado, y como control negativo, agua ultrapura libre de nucleasas y ADN extraído de muestra de sangre de bovino que resultó negativo para *A. marginale* en frotis sanguíneo. La mezcla de reacción estuvo compuesta por 5 µL de GoTaq® Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, EE.UU.) 200 nM de cada cebador externo (y), 2 µL de ADN molde y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen total de 10 µL. El programa de amplificación utilizado fue: un ciclo de 94°C por 1 minuto; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 53°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto; y la extensión final de 72°C por 10 minutos descrito por Corona y Martínez (2011). Todos los reactivos se manipularon en condiciones de flujo laminar, utilizando puntas con filtros (Eppendorf®; BioPointe Scientific, Mettler Toledo Rainin, EE.UU.).

Electroforesis

Los resultados se visualizaron en geles de agarosa al 1,5% (Agarose Gel Electrophoresis Kit -MB570) de HiMedia (HiMedia Laboratories, India) mediante electroforesis en cámara y fuente (Bio-Rad, modelo V500/150) durante una hora. Para la visualización del ADN, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 mg/mL) en TAE 1X durante 40 minutos y se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta UVP Inc. Digi Doc-It Darkroom (P/N 76-0311-01) con Drawer Assembly (P/N 98-0068-01). La extracción de ADN, amplificación por cPCR y electroforesis se realizaron en tres salas separadas para evitar la contaminación cruzada.

Secuenciamiento y análisis filogenético

Para confirmar los productos obtenidos mediante cPCR, se seleccionaron aleatoriamente tres muestras positivas, que fueron enviadas a Macrogen (Corea del Sur) para su purificación y posterior secuenciación mediante el método Sanger. Las secuencias *forward* y *reverse* se analizaron en el programa MEGA 11 para obtener secuencias consenso. El porcentaje de identidad se determinó utilizando la herramienta BLASTn (Altschul et al., 1990). El análisis filogenético se realizó mediante Maximum likelihood, utilizando el modelo de sustitución de máxima verosimilitud determinada en el software MEGA 11 (Kumar et al., 2018), se estimó mediante un análisis bootstrap con 1000 réplicas.

Números de acceso al Genbank para secuencias de nucleótidos de *Anaplasma marginale*

Los números de acceso de las secuencias de nucleótidos utilizadas para la comparación se indicaron junto al nombre del organismo en la **Figura 2**. Se incluyó la secuencia de *Bartonella henselae* (AM294984) para representar el grupo externo. Las secuencias de nucleótidos obtenidas en este estudio fueron registradas en GenBank con los siguientes números de acceso: genes *msp5* de *A. marginale* (PQ815167, PQ815168 y PQ815166).

Resultados

En la evaluación por cPCR de muestras de ADN basadas en el gen *msp5*, el 35% (30/86) de las muestras de bovinos resultaron positivas para infección por *A. marginale*. Todas las muestras positivas mostraron el producto de PCR esperado de 653 pares de bases. (Figura 1)

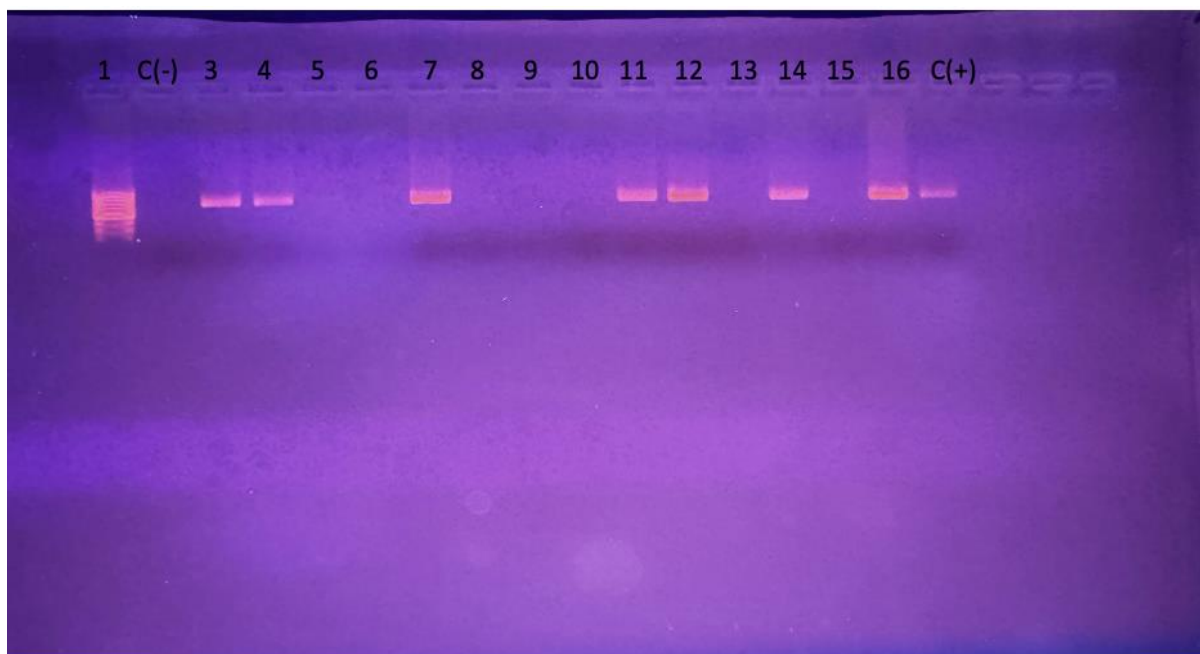


Figura 1. Resultado de electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de productos de amplificación de la cPCR, utilizando cebadores del gen *msp5* específicos para *A. marginale*. 1: marcador de peso molecular de 100 pb; C-: control negativo; pocillo 3,4,7,11,12,14 y 16: muestras positivas a *A. marginale*; C+: control positivo que corresponde a un tamaño de 653 pb.

Para confirmar los resultados de la cPCR, se secuenciaron tres productos de PCR positivos. Un análisis BLAST de las secuencias obtenidas mostró una identidad significativa (99 – 100%) con secuencias de *A. marginale* reportadas en Tailandia (ON456122, ON456120), China (F546443), Benín (ON456120), Nigeria (ON227469) y Sri Lanka (LC467687). El análisis de distancia (Figura 2) utilizando el software MEGA 11 con el método *Maximum Composite Likelihood* reveló tres clados bien definidos de secuencias de *A. marginale*. Las tres secuencias *msp5* detectadas en ganado vacuno de Paraguay se agruparon con secuencias de Tailandia, China, Benín, Nigeria y Sri Lanka. Otro clado incluyó secuencias de Jabotical, Palmeira, Florida y St. Maries, mientras que el tercer clado comprendió aislados de Str. Dawm, Palmeira, Brasil, Uruguay, Italia, Tamaulipas, Jabotical, Colombia y Argentina (Figura 2).

(Canever et al., 2014; Parodi et al., 2021). Para superar estos problemas, las herramientas de biología molecular como la PCR pueden ser útiles y tienen mayor sensibilidad y especificidad. (Brito et al., 2006)

El porcentaje de *A. marginale* detectado en el ADN de bovinos podría explicarse por el hecho de que las garrapatas son vectores biológicos bien conocidos de *Anaplasma* spp. A nivel mundial, se ha documentado que aproximadamente 20 especies de garrapatas son vectores biológicos de estas bacterias. Las garrapatas reportadas en Paraguay, pueden clasificarse como “endémicas o establecidas”, *Ixodes loricatus*, *Rhipicephalus microplus* y *Rb. sanguineus*. La mayoría de las recolecciones de garrapatas paraguayas se han realizado en el dominio fitogeográfico del Chaco, en la parte central del país. *Argas persicus* o una especie relacionada, *Am. cajennense*, *D. nitens*, *Rb. microplus* y *Rb. sanguineus* son parásitos importantes de los animales domésticos. Lo que respecta a *Rhipicephalus microplus* es más común en la Región Oriental y se encuentra ampliamente en el ganado bovino en Paraguay; por lo tanto, probablemente esté establecido en todos los dominios amazónicos y chaqueños (Nava et al., 2007). Además de estos, existen otros medios mecánicos de transmisión, como fómites contaminados, agujas, descornes, pinzas nasales, dispositivos para marcar las orejas, instrumentos de castración y dípteros chupadores de sangre de los géneros *Tabanus*, *Stomoxys* y varias especies de mosquitos que actúan como jeringas biológicas (Kocan et al., 2010). Estos tipos de transmisión están ampliamente distribuidos y son comunes en la práctica ganadera del Paraguay, lo que se correlaciona fuertemente con el alto porcentaje de infección por *A. marginale* en el ganado bovino.

La amplificación del ADN del patógeno mediante PCR tiene ventajas claras sobre otros métodos para la detección en animales persistentemente infectados con *A. marginale*, ya que esta bacteria puede ser difícil de detectar mediante técnicas convencionales como exámenes microscópicos (Melman et al., 2004) cuando los niveles de parasitemia son bajos. Herrero et al. (1998), demostraron que la PCR puede identificar estos bajos niveles de parasitemia en animales persistentes, algo que no es posible con los métodos diagnósticos tradicionales.

La selección del gen *msp5* para la detección de *A. marginale* se basa en estudios previos que han demostrado que las proteínas MSP de estas bacterias son fundamentales en las interacciones del parásito con sus hospedadores vertebrados y sus vectores. *Msp5* también se ha utilizado como diana para detectar *A. marginale* en ganado vacuno en muestras de campo y, con mayor frecuencia, en muestras experimentales (Futse et al., 2003). *Msp5* está muy conservado entre las cepas de *A. marginale* y es un gen de copia única, por lo que ofrece algunas ventajas como diana para garantizar la detección de cepas ampliamente variantes de *A. marginale* (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2024). Estos genes evolucionan más rápidamente que otros debido a la presión selectiva de los sistemas inmunológicos de hospedadores diferentes presentes en el ciclo de transmisión (de la Fuente et al., 2005; Kocan et al., 2003; Kocan et al., 2004; Brayton et al., 2005). El uso del gen *msp5* proporciona una herramienta diagnóstica sensible y específica para detectar *A. marginale* en animales, independientemente de la presencia de síntomas clínicos, para lo cual es crucial tanto para la importación como la exportación de ganado (Corona & Martínez, 2011).

Las secuencias del gen *msp5* detectadas en este estudio se agruparon con las reportadas en muestras de ganado de Tailandia, China, Benín, Nigeria y Sri Lanka, formaron un grupo distinto al de los bovinos de América del Norte y Sudamérica. Estos hallazgos muestran un alto grado de similitud genética con secuencias de diversos países de Asia y África. Un patrón similar fue reportado por Arnuphapprasert et al. (2023), quienes observaron que las secuencias de *A. marginale msp5* de Tailandia, China, Brasil, México, Benín, Japón, Kenia y Sri Lanka se agrupaban en un clado específico. Estos resultados podrían explicarse mediante lo evidenciado por Kocan et al., (2010), en donde explican que se han identificado varias cepas de *A. marginale* en diversas regiones geográficas. Exhiben diferencias morfológicas, secuencias de proteínas únicas, características antigénicas variadas y capacidades de transmisión variables a través de las picaduras de garrapatas. La interacción entre *A. marginale* y las células huésped depende en gran medida de sus principales proteínas de superficie, que determinan su capacidad para causar enfermedades. Se identificaron seis MSP en *A. marginale*, derivadas de eritrocitos bovinos (Barbet et al., 2000). Se descubrió que estaban conservados en organismos derivados de cultivos celulares y garrapatas (Kocan et al., 2003 & Kocan et al., 2004). De estas MSP, MSP1a, MSP4 y MSP5 provienen de genes únicos y no varían antigénicamente dentro de las cepas. Sin embargo, MSP1b, MSP2 y MSP3 pertenecen a familias multigénicas y pueden variar antigénicamente, particularmente en ganado infectado persistentemente (Kocan et al., 2003, Kocan et al., 2010 y de la Fuente et al., 2005). Estudios recientes han sugerido que los diferentes genotipos de *A. marginale* dentro de rebaños en un área endémica pueden explicarse por eventos de transmisión independientes a través de movimientos de ganado infectado, en lugar de movimientos de garrapatas (Kocan et al., 2004; de la Fuente & Kocan, 2000).

La anaplasmosis bovina es una causa importante de morbilidad y mortalidad en el ganado, particularmente en el ganado mestizo en regiones tropicales y subtropicales. La distribución geográfica de la enfermedad depende de la densidad y distribución de las garrapatas vectores y huéspedes reservorios. La distribución de la anaplasmosis puede seguir cambiando debido al calentamiento global, que puede afectar el movimiento del huésped de la garrapata (de Souza Ramos et al., 2019).

Finalmente es importante acotar, que actualmente existen limitaciones en cuanto al control y prevención de *A. marginale*, ya que las vacunas desarrolladas hasta la fecha no son altamente efectivas. Igualmente, el tratamiento con antibióticos no ha sido eficaz en varias granjas, ya que los animales tratados suelen volver a infectarse. Además, los antibióticos también presentan un mayor costo para el agricultor (da Silva et al., 2016). La insuficiente sensibilidad y especificidad de los ensayos de diagnóstico de *Anaplasma* spp., el potencial de reacción cruzada entre especies de este género y la necesidad de determinar el estado de infección de los animales han llevado al desarrollo de ensayos de PCR para el diagnóstico de *Anaplasma marginale*. Sin olvidar que el control de la anaplasmosis, necesita de métodos de diagnóstico que permitan conocer la prevalencia del microorganismo en las diferentes zonas de los países tropicales y subtropicales, además que permitan identificar de forma segura los animales portadores para el movimiento de animales a zonas libres del hemoparásito (Camacho-Nuez et al., 2000).

Conclusión

Este estudio representa el primer reporte de la detección molecular de *Anaplasma marginale* a partir de ADN sanguíneo de bovinos en Paraguay. Sin embargo, se requieren más investigaciones para profundizar en la patogenicidad, distribución geográfica y los ciclos de transmisión de esta bacteria, así como la amplificación de otros genes que permita una mejor clasificación filogenética de las cepas detectadas.

Agradecimientos: Al programa SISNI (Sistema Nacional de Investigadores), del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (Conacyt) del Paraguay.

Contribución de autores: **Conceptualización:** O.L.N.Y., **Curación de datos:** O.L.N.Y., L.C.R.A.; **Análisis formal:** O.L.N.Y., L.C.R.A.; **Adquisición de fondos:** O.L.N.Y., G.G.B. ;**Investigación:** O.L.N.Y., L.C.R.A.; **Metodología:** O.L.N.Y., A.M.A.O., M.L.Q.N.; **Administración del Proyecto:** O.L.N.Y.; **Recursos:** O.L.N.Y., G.G.B. ; **Software:** O.L.N.Y., L.C.R.A. ; **Supervisión:** O.L.N.Y., L.C.R.A.; **Validación:** O.L.N.Y., L.C.R.A. ; **Visualización:** O.L.N.Y., L.C.R.A.; **Redacción-borrador original:** O.L.N.Y.; **Redacción-revisión y edición:** O.L.N.Y., I.P.F.I., M.L.Q.N.

Fuente de Financiamiento: Sin fuente de financiamiento.

Disponibilidad de datos: Los datos utilizados en esta investigación podrán ser solicitados al autor de correspondencia según pertinencia: Lorena Núñez, correo electrónico: lnunez@vet.una.py

Proceso de revisión: Este artículo fue evaluado mediante un proceso de revisión por pares doble ciego.

Referencias Bibliográficas

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Arnuphapprasert, A., Nugraheni, Y. R., Poofery, J., Aung, A., Kaewlamun, W., Chankeaw, W., Tasanaganjanakorn, T., Wattanamethanont, J., & Kaewthamasorn, M. (2023). Genetic characterization of genes encoding the major surface proteins of *Anaplasma marginale* from cattle isolates in Thailand reveals multiple novel variants. *Ticks and tick-borne diseases*, 14(2), 102110. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102110>
- Aubry, P., & Geale, D. W. (2010). A review of bovine anaplasmosis. *Transboundary and emerging diseases*, 58(1), 1–30. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x>
- Balbuena, E. A. (2021). *Frecuencia de Anaplasmosis subclínica en bovinos adultos en el tambo lechero de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Asunción en el año 2021* (Trabajo de grado). Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Asunción. 74 p.
- Barbet, A. F., Lundgren, A., Yi, J., Rurangirwa, F. R., & Palmer, G. H. (2000). Antigenic variation of *Anaplasma marginale* by expression of MSP2 mosaics. *Infection and immunity*, 68(11), 6133–6138. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.11.6133-6138.2000>

- Ben Said, M., Belkahia, H., & Messadi, L. (2018). *Anaplasma* spp. in North Africa: A review on molecular epidemiology, associated risk factors and genetic characteristics. *Ticks and tick-borne diseases*, 9(3), 543–555. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.01.003>
- Brayton, K. A., Kappmeyer, L. S., Herndon, D. R., Dark, M. J., Tibbals, D. L., Palmer, G. H., McGuire, T. C., & Knowles, D. P. (2005). Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(3), 844–849. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406656102>
- Brito, L. G., Sena Oliveira, M. C. de, Fonseca Moura, M. N. da, da Silva Netto, F. G., Cavalcante, F. A., Marim, A. D., Rodrigues de Souza, G. C., & da Silva, J. L. (2006). Extração de DNA a partir de coágulos sanguíneos bovinos. Porto Velho. Embrapa. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/24667/1/bpd43-dnabovinos.pdf>
- Camacho-Nuez, M., de Lourdes Muñoz, M., Suarez, C. E., McGuire, T. C., Brown, W. C., & Palmer, G. H. (2000). Expression of polymorphic msp1beta genes during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia. *Infection and immunity*, 68(4), 1946–1952. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.4.1946-1952.2000>
- Canever, M. F., Vieira, L. L., Reck, C., Richter, L., & Miletto, L. C. (2014). First evaluation of an outbreak of bovine babesiosis and anaplasmosis in Southern Brazil using multiplex PCR. *The Korean journal of parasitology*, 52(5), 507–511. <https://doi.org/10.3347/kjp.2014.52.5.507>
- Castro, L. M. (2019). *Frecuencia de Anaplasma spp. y Babesia spp. en bovinos de carne en un establecimiento ganadero en la ciudad de Caacupú, departamento de Paraguari en el año 2019* (Trabajo de grado). Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Asunción. 78 pag.
- Corona, B. & Martínez, S. (2011). Detección de *Anaplasma marginale* en bovinos, mediante la amplificación por PCR del gen msp5. *Revista de Salud Animal*, 33(1), 24-31. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2011000100004&lng=es&tlng=es.
- da Silva, J. B., André, M. R., & Machado, R. Z. (2016). Low genetic diversity of *Anaplasma marginale* in calves in an endemic area for bovine anaplasmosis in the state of São Paulo, Brazil. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(1), 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.07.018>
- de la Fuente, J., Lew, A., Lutz, H., Meli, M. L., Hofmann-Lehmann, R., Shkap, V., Molad, T., Mangold, A. J., Almazán, C., Naranjo, V., Gortázar, C., Torina, A., Caracappa, S., García-Pérez, A. L., Barral, M., Oporto, B., Ceci, L., Carelli, G., Blouin, E. F., & Kocan, K. M. (2005). Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. *Animal health research reviews*, 6(1), 75–89. <https://doi.org/10.1079/ahr2005104>
- de la Fuente, J., & Kocan, K. M. (2000). *Anaplasma marginale*: biology and control. In: K. M. Kocan (Ed.), *Anaplasma marginale*. Dordrecht. Springer.
- de Souza Ramos, I., Herrera, H. M., Fernandes, S. J., do Amaral, R. B., de Souza Zanatto, D. C., Viera da Silva, T., Le Senechal Horta, B., Vilela Campos, J. B., Almeida Alves, J. V., Carvalho de Macedo, G., Zacarias Machado, R., & Rogério André, M. (2019). Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in beef cattle in the Brazilian Pantanal. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 10(4), 805-814. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.03.015>.
- Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., Rikihisa, Y., & Rurangirwa, F. R. (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and *Anaplasmataceae* in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(6), 2145–2165. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>
- Espinoza, A. J. (2018). *Determinación de Anaplasmosis y Leucosis viral bovina en dos tambos del departamento central (San Lorenzo y Ñemby) en el año 2018* (Trabajo de grado). Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Asunción. 60 pag.

- French, D. M., McElwain, T. F., McGuire, T. C., & Palmer, G. H. (1998). Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. *Infection and immunity*, 66(3), 1200–1207. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.3.1200-1207.1998>
- Futse, J. E., Ueti, M. W., Knowles, D. P., Jr, & Palmer, G. H. (2003). Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: retention of vector competence in the absence of vector-pathogen interaction. *Journal of clinical microbiology*, 41(8), 3829–3834. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.8.3829-3834.2003>
- Goff, W. L., McElwain, T. F., Suarez, C. E., Johnson, W. C., Brown, W. C., Norimine, J., & Knowles, D. P. (2003). Competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on a rhoptry-associated protein 1 epitope specifically identifies *Babesia bovis*-infected cattle. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 10(1), 38–43. <https://doi.org/10.1128/cdli.10.1.38-43.2003>
- Herrero, M. V., Pérez, E., Goff, W. L., Torioni, E. S., Knowles, D. P., McElwain, T. F., Álvarez, V., Álvarez, A., & Buening, G. M. (1998). Prospective study for the detection of *Anaplasma marginale* Theiler, 1911 (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Costa Rica. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 849, 226–233. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb11053.x>
- Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., & Ewing, S. A. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary parasitology*, 167(2-4), 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.012>
- Kocan, K. M., de la Fuente, J., Guglielmono, A. A., & Meléndez, R. D. (2003). Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clinical microbiology reviews*, 16(4), 698–712. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.698-712.2003>
- Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., & Garcia-Garcia, J. C. (2004). *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*, 129 Suppl, S285–S300. <https://doi.org/10.1017/s0031182003004700>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Melman, S., Hartt, Y., & Giardina, S. (2004). El uso de la biología molecular en el diagnóstico de *Anaplasma marginale*. *Croizatia*, 3, 40-52.
- Nava, S., Lareschi, M., Rebollo, C., Benítez Usher, C., Beati, L., Robbins, R. G., Durden, L. A., Mangold, A. J., & Guglielmono, A. A. (2007). The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Paraguay. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 101(3), 255–270. <https://doi.org/10.1179/136485907X176319>.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (2024). *Anaplasmosis bovina: manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres*. Paris. OIE <https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/>
- Ogata, S., Pereira, J. A. C., Jhonny, L. V. A., Carolina, H. P. G., Matsuno, K., Orba, Y., Sawa, H., Kawamori, F., Nonaka, N., & Nakao, R. (2021). Molecular Survey of *Babesia* and *Anaplasma* Infection in Cattle in Bolivia. *Veterinary sciences*, 8(9), 188. <https://doi.org/10.3390/vetsci8090188>.
- Palmer, G. H., Brown, W. C., & Rurangirwa, F. R. (2000). Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Microbes and infection*, 2(2), 167–176. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)00271-9](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)00271-9)
- Parodi, P., Corbellini, L. G., Leotti, V. B., Rivero, R., Miraballes, C., Riet-Correa, F., Venzal, J. M., & Armúa-Fernández, M. T. (2021). Validation of a multiplex PCR assay to detect *Babesia* spp. and *Anaplasma marginale* in cattle in Uruguay in the absence of a gold standard test. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 33(1), 73–79. <https://doi.org/10.1177/1040638720975742>.
- Rymaszewska, A., & Grenda, S. (2008). Bacteria of the genus *Anaplasma* - characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. *Veterinárni medicína*, 53(11), 573-584. doi: 10.17221/1861-VETMED

- Torioni de Echaide, S., Knowles, D. P., McGuire, T. C., Palmer, G. H., Suarez, C. E., & McElwain, T. F. (1998). Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *Journal of clinical microbiology*, *36*(3), 777–782. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.3.777-782.1998>
- Tamekuni, K., Kano, F. S., Ataliba, A. C., Marana, E. R., Venâncio, E. J., Vidotto, M. C., Garcia, J. L., Headley, S. A., & Vidotto, O. (2009). Cloning, expression, and characterization of the MSP1a and MSP1b recombinant proteins from PR1 *Anaplasma marginale* strain, Brazil. *Research in veterinary science*, *86*(1), 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.05.016>.
- Wahba, A. (2017). Serological and microscopical diagnosis of anaplasmosis in some farm animals. *Animal Health Research Journal*, *5* (4), pp. 68–75. https://www.researchgate.net/publication/323726100_Serological_and_microscopical_diagnosis_of_anaplasmosis_in_some_farm_animals
- Zim, M. M. R., Ahmed, N., Ahmed, M., Miah, M. A. H., Sajib, M. M. R., Rabbi, M. R. R., Rahman, M. K., Roy, B. C., & Talukder, M. H. (2024). First seroprevalence survey of bovine anaplasmosis: an emerging tick-borne disease in commercial livestock and dairy farms in Bangladesh. *Parasitology*, *151*(9), 992–1000. <https://doi.org/10.1017/S0031182024001495>. 0