

**Detección molecular de especies de *Anaplasmataceae* en
animales de producción pecuaria en el Departamento del
Atlántico, Colombia**

Mauricio Marín Hurtado

CC: 1143467284

Código estudiantil: 201912215206

Correo: mauricio.marin@unisimon.edu.co

Leidy Norelis Giraldo Soto

CC: 1003499030

Código estudiantil: 201821697516

Correo: leidy.giraldo@unisimon.edu.co

Nicolas José Zarate Perez

CC: 1006572777

Código estudiantil: 201821696989

Correo: nicolas.zarate@unisimon.edu.co

Mayra Alejandra Martínez Valdivieso

CC: 1143171188

Código estudiantil: 20181229374

Correo: Mayra.martinez@unisimon.edu.co

Trabajo de investigación del Programa de Microbiología

Tutor:

María Auxiliadora Badillo Viloría

Steffania de la Rosa Jaramillo

Resumen

Antecedentes: Las enfermedades transmitidas por vectores como las garrapatas son un problema a nivel mundial, esto debido a los costos relacionados con los tratamientos y la disminución en la producción del ganado. Estas enfermedades causan graves problemas de morbi-mortalidad en la salud pública y sanidad animal, como consecuencia de la relación y el contacto frecuente entre los animales domésticos y las personas (Eraso-Cadena et al., 2018). Actualmente en Colombia se han reportado pocos casos donde se evidencie la presencia de hemoparásitos involucrados con animales de producción, de aquí la importancia de estudiar la frecuencia de miembros de la familia Anaplasmataceae.

Objetivo:

Detectar molecularmente especies de Anaplasmataceae en animales de producción pecuaria en el departamento del Atlántico, Colombia.

Materiales y Métodos:

Área de estudio.

Estudio prospectivo de corte transversal realizado entre enero y septiembre del 2022. El departamento del Atlántico se encuentra ubicado al norte del territorio nacional y está enmarcado dentro de las siguientes coordenadas: Latitud norte 10° 15' 36 " Sur de San Pedrito: 11° 06' 37" Bocas de Ceniza Longitud oeste de Greenwich 74° 42' 47" (margen izquierda del río Magdalena) 75° 16' 34" (intersección Santa Catalina y Arroyo grande). Cuenta con una superficie de 3.386 Km², lo que representa el 0.29% del territorio nacional. (*Departamento Del Atlántico*, n.d.). Geográficamente está compuesto por 23 municipios, posee altitudes de 123 m, el clima es tropical, cálido y seco, con temperatura media anual de 27°C; con medias máximas registradas de 29°C, y mínimas de 25°C, entre octubre y noviembre.

Diseño del estudio.

Fueron seleccionados 7 municipios de cada subregión del área de estudio, con mayor población de ganado bovino y equino de acuerdo con el Censo Pecuario nacional (ICA 2020). Se realizó muestreo por conveniencia en 9 granjas teniendo en cuenta la facilidad de transporte y las condiciones ambientales.

Método de muestreo y toma de muestras.

Los animales fueron examinados individualmente en toda la superficie corporal para observar la presencia de garrapatas. De los animales infestados fueron seleccionados un total de 81 animales (62 bovinos, 15 equinos, y 4 mulares).

Las muestras de sangre fueron tomadas por un médico veterinario, con la debida precaución preservando la seguridad y bienestar animal. Las muestras de sangre obtenidas se depositaron en tubos con EDTA, se codificaron respectivamente para su posterior procesamiento, se conservaron a -20°C . Se registró además los datos generales de los animales como sexo y edad e información de la granja como tamaño de la granja, coordenadas, orientación productiva, entre otros.

Análisis molecular.

Se empleó una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional utilizando cebadores dirigidos al gen 16Sr RNA ribosomal que amplificaron un fragmento esperado de 345 pb para especies de la familia Anaplasmataceae.

En cada reacción de PCR se utilizó 10 μl GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega), 1.0 μl de cebadores directos e inversos, 5 μl de DNA y 3 μl agua grado molecular destilada, para un volumen final de 20 μl . La PCR se llevó a cabo utilizando un termociclador T100 Thermal Cycler (BIO-RAD), las etapas de la PCR incluyeron una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, hibridación o anillamiento de 60°C durante 30 segundos, la etapa de extensión de 72°C durante 45 segundos y un paso de extensión final de 72°C durante 5 minutos.

Análisis estadísticos

Los datos se analizaron con el programa estadístico SPSS 25® y GraphPad Prism versión 8.0 (USA), y a Quantum Geographic Information Systems (QGIS; versión 3.4.15) Para el análisis de la distribución espacial de *Anaplasmataceae*. Se empleó un análisis estadístico descriptivo. Para medir la asociación entre las variables epidemiológicas con la probabilidad de positividad de la infección por especies de *Anaplasmataceae*, se evaluaron mediante el test de Chi-cuadrado de Pearson o test de Fisher con un nivel de confianza del 95% y un valor de $p \leq 0.05$.

Resultados:

El ADN de especies de Anaplasmataceae fue detectado en 54/81 (65.9%; IC: 95%; 56 - 77%) de los animales analizados. La distribución geográfica de animales positivos y negativos para la familia Anaplasmataceae muestreados en el área de estudio, La frecuencia más alta de acuerdo al hospedero fue en bovinos 45/62 (72.6%), seguido de equinos 8/15 (53,3) y mulares 1/4 (25%) ($p=0,071$). En cuanto al sitio de ubicación la mayor prevalencia se mostró en el área Sur 17/21 (83.33%), seguido del área Metropolitana 17/21 (81%), Zona Centro 24/33

(71%), Oriental 8/17 (47%) y la Zona Costera que no presentó casos positivos, En bovinos la frecuencia fue mayor en machos 5/6 (83%) frente a las hembras 40/56 (71%) de la población muestreada. El análisis de Chi-cuadrado mostró diferencias significativas ($p < 0,0007$) de la infección por especies de los géneros Ehrlichia y Anaplasma con respecto a la región muestreada

Conclusiones:

Este estudio mostró una alta frecuencia de bacterias de la familia Anaplasmataceae en animales domésticos del departamento del Atlántico. Evidenciando la importancia de técnicas moleculares (PCR) en el diagnóstico de hemoparásitos en el ganado.

La detección de estos microorganismos permite implementar planes de concientización y acción que permitan mitigar la prevalencia de enfermedades zoonóticas que repercuten principalmente en la explotación pecuaria de la región del caribe colombiano y en salud pública. Es necesario realizar más estudios en animales de producción que están estrechamente relacionados con trabajadores para esclarecer el riesgo de esta infección.

Palabras clave: Vectores, análisis molecular, 16s rRNA, familia Anaplasmataceae, hemoparásitos.

ABSTRACT

Background

Vector-borne diseases such as ticks are a worldwide problem, this due to the costs related to treatments and the decrease in livestock production. These diseases cause serious morbidity problems in public health and animal health, as a consequence of the relationship and frequent contact between domestic animals and people (Eraso-Cadena et al., 2018). Currently in Colombia, few cases have been reported where the presence of hemoparasites involved with production animals is evidenced, hence the importance of studying the frequency of members of the Anaplasmataceae family.

Objective:

To detect molecularly Anaplasmataceae species in livestock production animals in the department of Atlántico, Colombia.

Materials and Methods:

Study area.

Prospective cross-sectional study carried out between January and September 2022. The department of Atlántico is located in the north of the national territory and is framed within the following coordinates: North latitude 10° 15' 36" South of San Pedrito: 11° 06' 37" Bocas de Ceniza West longitude of Greenwich 74° 42' 47" (left margin of the Magdalena River) 75° 16' 34" (intersection Santa Catalina and Arroyo Grande). It has an area of 3,386 km², which represents 0.29% of the national territory (Department Del Atlántico, n.d.). Geographically, it is made up of 23 municipalities, with altitudes of 123 m. The climate is tropical, warm and dry, with an average annual temperature of 27°C; with average maximum temperatures of 29°C and minimum temperatures of 25°C between October and November.

Study design.

Seven municipalities were selected from each subregion of the study area, with the largest cattle and horse populations according to the National Livestock Census (ICA 2020). Convenience sampling was carried out in 9 farms taking into account the ease of transportation and environmental conditions.

Sampling method and sampling.

The animals were individually examined individually on the whole-body surface to observe the presence of ticks. A total of 81 animals (62 cattle, 15 horses, and 4 mules) were selected from the infested animals.

The blood samples were taken by a veterinarian, with due precaution to preserve animal safety and welfare. The blood samples obtained were deposited in EDTA tubes, coded respectively for further processing, and stored at -20°C. The general data of the animals, such as sex and age, and farm information such as farm size, coordinates, productive orientation, among others, were also recorded.

Molecular analysis.

Conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) was used using primers targeting the 16Sr ribosomal RNA gene that amplified an expected 345 bp fragment for species of the Anaplasmataceae family.

Each PCR reaction used 10 µl GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega), 1.0 µl of direct and reverse primers, 5 µl of DNA and 3 µl distilled molecular grade water, for a final volume of 20 µl. PCR was performed using a T100 Thermal Cycler (BIO-RAD), PCR steps included an initial denaturation at 95°C for 3 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 sec, hybridization or banding of 60°C for 30 sec, the extension step of 72°C for 45 sec and a final extension step of 72°C for 5 min.

Statistical analysis

Data were analyzed using SPSS 25® statistical software and GraphPad Prism version 8.0 (USA), and Quantum Geographic Information Systems (QGIS; version 3.4.15) for the analysis of the spatial distribution of Anaplasmataceae. Descriptive statistical analysis was used. To measure the association between epidemiological variables with the probability of positivity of infection by Anaplasmataceae species, they were evaluated by Pearson's Chi-square test or Fisher's test with a confidence level of 95% and a value of $p \leq 0.05$.

Results:

DNA of Anaplasmataceae species was detected in 54/81 (65.9%; CI: 95%; 56 - 77%) of the animals tested. The geographical distribution of positive and negative animals for the Anaplasmataceae family sampled in the study area, the highest frequency according to host was in cattle 45/62 (72.6%), followed by equines 8/15 (53.3) and mules 1/4 (25%) ($p=0.071$). Regarding the site of location, the highest prevalence was shown in the Southern area 17/21 (83.33%), followed by the Metropolitan area 17/21 (81%), Central area 24/33 (71%), Eastern area 8/17 (47%) and the Coastal area that did not present positive cases, In bovines the frequency was higher in males 5/6 (83%) compared to females 40/56 (71%) of the sampled population. The Chi-square analysis showed significant differences ($p < 0.0007$) of infection by species of the genera Ehrlichia and Anaplasma spp with respect to the sampled region

Conclusions:

This study showed a high frequency of bacteria of the Anaplasmataceae family in domestic animals in the department of Atlántico. Evidencing the importance of molecular techniques (PCR) in the diagnosis of hemoparasites in cattle.

The detection of these microorganisms allows the implementation of awareness and action plans to mitigate the prevalence of zoonotic diseases that mainly affect livestock exploitation in the Colombian Caribbean region and public health. It is necessary to carry out more studies in production animals that are closely related to workers to clarify the risk of this infection.

Key words: Vectors, molecular analysis, 16s rRNA, Anaplasmataceae family, hemoparasites.

Referencias

- Badillo-Viloria, M., Díaz-Perez, A., Orozco-Sánchez, C., & de Lavelle-Galvis, R. (2017). Infección por Ehrlichia canis y Anaplasma sp. en caninos atendidos en clínicas veterinarias en Barranquilla, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 22(supl), 6023–6033. <https://doi.org/10.21897/RMVZ.1072>
- Benavides Ortiz, E., Polanco Palencia, N., Vizcaíno Gerds, O., & Betancur Hurtado, Ó. (n.d.). *CRITERIOS Y PROTOCOLOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE HEMOPARÁSITOS EN BOVINOS*. Retrieved October 28, 2022, from www.produccion-animal.com.ar
- Blanco Martínez, R., Cardona Álvarez, J., & Vargas Viloria, M. (2016). Prevalencia de parásitos hematópicos endoglobulares en bovinos gyr puros en Córdoba, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, 31, 67–74. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-93542016000100007&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Cardona-Álvarez, J., Ensuncho-Hoyos, C., & Vergara-Garay, O. (2012). *Frequency of Hematropics in Three Farms of Buffaloes (Bubalus bubalis) from Department of Córdoba, Colombia*. XXII, 530–536.
- Chorattanakawee, S., Wofford, R. N., Takhampunya, R., Katherine Poole-Smith, B., Boldbaatar, B., Lkhagvatseren, S., Altantogtokh, D., Musih, E., Nymadawa, P., Davidson, S., Hertz, J., Fiorenzano, J., Gray, G. C., & von Fricken, M. E. (2022). Tracking tick-borne diseases in Mongolian livestock using next generation sequencing (NGS). *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 13(1), 101845. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2021.101845>
- Departamento del Atlántico. (n.d.). Retrieved May 24, 2022, from <https://www.atlantico.gov.co/index.php/departamento/presentaciondepartamento-45237>
- Eraso-Cadena, M. P., Molina-Guzmán, L. P., Cardona, X., Cardona-Arias, J. A., Ríos-Osorio, L. A., & Gutierrez-Builes, L. A. (2018). Serological evidence of exposure to some zoonotic microorganisms in cattle and humans with occupational exposure to livestock in Antioquia, Colombia. *Cadernos de Saúde Pública*, 34(10), e00193617. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00193617>
- Inokuma, H., Raoult, D., & Brouqui, P. (2000). Detection of Ehrlichia platys DNA in Brown Dog Ticks (Rhipicephalus sanguineus) in Okinawa Island, Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(11), 4219. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.11.4219-4221.2000>
- Jaimes-Dueñez, J., Triana-Chávez, O., & Mejía-Jaramillo, A. M. (2018). Genetic, host and environmental factors associated with a high prevalence of Anaplasma marginale. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 9(5), 1286–1295. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2018.05.009>
- Kocan, K., Fuente, J., & Cabezas, A. (2015). *The genus Anaplasma: new challenges after reorganization* | DIGITAL.CSIC. <https://digital.csic.es/handle/10261/142274>

Low, V. L., Tan, T. K., Khoo, J. J., Lim, F. S., & AbuBakar, S. (2020). An overview of rickettsiae in Southeast Asia: Vector-animal-human interface. *Acta Tropica*, 202, 105282. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2019.105282>

Máttar Salim, & Parra Miguel. (2006). *DETECTION OF ANTIBODIES TO ANAPLASMA, BARTONELLA AND COXIELLA IN RURAL INHABITANTS OF THE CARIBBEAN AREA OF COLOMBIA*. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682006000200002

McCown M, Alleman A, Sayler K, C. R., Thatcher B, Tyrrell P, Stillman B, Beall M, & Barbet A. (2014). *Point prevalence survey for tick-borne pathogens in military working dogs, shelter animals, and pet populations in northern Colombia* / Ramaswamy Chandrashekar - Academia.edu. https://www.academia.edu/20545612/Point_prevalence_survey_for_tick_borne_pathogens_in_military_working_dogs_shelter_animals_and_pet_populations_in_northern_Colombia?auto=citation&from=cover_page

Muñoz-Leal, S., Lopes, M. G., Marcili, A., Martins, T. F., González-Acuña, D., & Labruna, M. B. (2019). Anaplasmataceae, Borrelia and Hepatozoon agents in ticks (Acari: Argasidae, Ixodidae) from Chile. *Acta Tropica*, 192, 91–103. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2019.02.002>

Parola, P., Roux, V., Camicas, J. L., Baradji, I., Brouqui, P., & Raoult, D. (2000). Detection of ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(6), 707–708. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(00\)90243-8](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90243-8)

Pérez de León, A. A., Mitchell, R. D., & Watson, D. W. (2020). Ectoparasites of Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 36(1), 173–185. <https://doi.org/10.1016/J.CVFA.2019.12.004>

Pesapane, R., Foley, J., Thomas, R., & Castro, L. R. (2019). Molecular detection and characterization of Anaplasma platys and Ehrlichia canis in dogs from northern Colombia. *Veterinary Microbiology*, 233, 184–189. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2019.05.002>

Rar, V., Tkachev, S., & Tikunova, N. (2021). Genetic diversity of Anaplasma bacteria: Twenty years later. *Infection, Genetics and Evolution*, 91, 104833. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2021.104833>

Ríos Leonardo, Zapata Richard, Reyes Julián, Mejía Jaime, & Baena Armando. (2010). *Vista de Estabilidad enzoótica de babesiosis bovina en la región de Puerto Berrío, Colombia*. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/15590/15564>

Ríos, R., Franco, S., Mattar, S., Urrea, M., & Tique, V. (2008). Seroprevalencia de Leptospira sp., Rickettsia sp. Ehrlichia sp. en trabajadores rurales del departamento de Sucre, Colombia. *Infectio*, 12(2), 90–95. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922008000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=es

Rotondano, T. E. D. F., de Almeida, A. M. P., Lustosa, E. M. C., Cordeiro, A. A., Camboim, E. K. A., de Azevedo, S. S., de Andrade, P. P., & de Melo, M. A. (2012). An assessment of whole blood and fractions by nested PCR as a DNA source for diagnosing canine ehrlichiosis and anaplasmosis. *The Scientific World Journal*, 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/605743>

Simon, G. E., Hoar, B. R., & Tucker, C. B. (2016). Assessing cow–calf welfare. Part 1: Benchmarking beef cow health and behavior, handling; and management, facilities, and producer perspectives. *Journal of Animal Science*, 94(8), 3476–3487. <https://doi.org/10.2527/JAS.2016-0308>

Tumwebaze, M. A., Lee, S. H., Adjou Moumouni, P. F., Mohammed-Geba, K., Sheir, S. K., Galal-Khallaf, A., Abd El Latif, H. M., Morsi, D. S., Bishr, N. M., Galon, E. M., Byamukama, B., Liu, M., Li, J., Li, Y., Ji, S., Ringo, A. E., Rizk, M. A., Suzuki, H., Ibrahim, H. M., & Xuan, X. (2020). First detection of *Anaplasma ovis* in sheep and *Anaplasma platys*-like variants from cattle in Menoufia governorate, Egypt. *Parasitology International*, 78, 102150. <https://doi.org/10.1016/J.PARINT.2020.102150>

Vargas-Hernandez, G., André, M. R., Cendales, D. M., de Sousa, K. C. M., Gonçalves, L. R., Rondelli, M. C. H., Machado, R. Z., & Tinucci-Costa, M. (2016). Molecular detection of *Anaplasma* species in dogs in Colombia. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 25(4), 459–464. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016066>

Vargas-Hernández, G., André, M. R., Faria, J. L. M., Munhoz, T. D., Hernandez-Rodriguez, M., Machado, R. Z., & Tinucci-Costa, M. (2012). Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. *Veterinary Parasitology*, 186(3–4), 254–260. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2011.11.011>