

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
Colegio de Ciencias Agropecuarias
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Maestría en Ciencias Agropecuarias



TESIS:

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Anaplasma* spp.
EN VENADOS COLA BLANCA (*Odocoileus virginianus*)
EN CAUTIVERIO, EN SINALOA”**

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA:

M.V.Z. Lucio Ricardo Ibáñez Garduño

DIRECTORA

Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho

CO-DIRECTORA

Dra. Idalia Enríquez Verdugo

ASESORES

M.C. Jaime Eleazar Borbolla Ibarra
Dra. Nohemí Castro del Campo.
Dr. Miguel Ángel Rodríguez Gaxiola

Culiacán, Sinaloa a Enero del 2020

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR EL C. **LUCIO RICARDO IBÁÑEZ GARDUÑO**,
BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO
APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTORA

Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho

CO-DIRECTORA

Dra. Idalia Enríquez Verdugo

ASESOR

MC. Jaime Eleazar Borbolla Ibarra

ASESOR

Dra. Nohemí Castro del Campo

ASESOR

Dr. Miguel Ángel Rodríguez Gaxiola

CULIACÁN, SINALOA, ENERO DE 2020.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA CULIACÁN
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL FUERTE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL CARRIZO

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 20 de enero del año 2020, la que suscribe Lucio Ricardo Ibáñez Garduño, alumno del Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias, con número de cuenta 236745, de la Unidad Académica Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la UAS, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Zoila Maribel Gaxiola Camacho y de la Dra. Idalia Enríquez Martínez Verdugo cede los derechos del trabajo titulado "CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Anaplasma* spp. EN VENADOS COLA BLANCA (*Odocoileus virginianus*) EN CAUTIVERIO, EN SINALOA" a la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Sinaloa, para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales, todo esto en apego al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ATENTAMENTE

M.V.Z. LUCIO RICARDO IBÁÑEZ GARDUÑO

CONTENIDO	página
ÍNDICE DE CUADROS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I.- INTRODUCCIÓN.....	3
II.- REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.- Características del género <i>Anaplasma</i>.....	5
2.1.-Características de <i>Anaplasma marginale</i>	6
2.1.1.-Signos Clínicos.....	7
2.1.2.- Ciclo evolutivo.....	8
2.2.-Características de <i>Anaplasma centrale</i>	9
2.3.- Características de <i>Anaplasma ovis</i>	10
2.4.-Mecanismos de patogenicidad de las especies del género <i>Anaplasma</i>	10
2.5.-Técnicas de laboratorio para el diagnóstico de <i>Anaplasma</i>	10
2.6.- Aspectos epizootiológicos de la Anaplasmosis en rumiantes.	11
2.7.- Impacto económico de la Anaplasmosis en la producción animal.	11
2.8.- Principales vectores de las especies de <i>Anaplasma</i>	12
2.9.- Géneros y especies de garrapatas reportadas en México.	12
2.10.- Importancia de los distintos géneros y especies de garrapatas como vectores de <i>Anaplasma</i>	13
2.11.- Influencia del medio ambiente en el ciclo biológico de los vectores.	13
2.12.- Géneros y especies de tábanos de importancia médica reportadas en México, Son variadas las especies de tábanos reportados para el país, los cuales incluyen:.....	14
2.13.- Importancia de los distintos géneros y especies de tábanos como vectores de <i>Anaplasma</i>	15
2.14.- Influencia de los rumiantes silvestres en la epizootiología de la Anaplasmosis. ..	16
2.15.- Importancia del venado cola blanca (<i>Odocoileus virginianus</i>) en la epizootiología de la Anaplasmosis en los rumiantes domésticos.	16
2.16.- Antecedentes directos.....	17
III. - HIPÓTESIS.....	19
IV. - OBJETIVOS.....	20
Objetivo general.....	20

Objetivos específicos	20
V. - MATERIAL Y MÉTODOS	21
5.1 Tipo de estudio.....	21
5.2 Sitio de muestreo	21
5.3 Procesos de laboratorio	22
5.4 Toma de Muestra.....	22
5.5 Extracción de ADN	23
5.6 Amplificación del ADN por PCR.....	24
VI. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
6.1.- Resultados por Frotis en Microscopia Óptica	25
6.2.- Amplificación a partir del gen <i>rpoB</i>	28
6.3.- Amplificación del gen <i>msp1a</i> de <i>Anaplasma marginale</i>	29
VII. - CONCLUSIÓN	31
VIII. - LITERATURA CITADA	32

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1.	Características de los géneros de <i>Anaplasma</i> y su reclasificación	12
2.	Especies de tábanos reportados en México	20
3.	Georeferenciación de muestreo de venados.....	28
4.	Resultados obtenidos	31
5.	Cuantificación de ADN obtenido de sangre de venado	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
6.	Venado hembra con Signología clínica de <i>Anaplasma</i>	14
7.	Ciclo biológico de la Anaplasmosis vector-hospedero.....	15
8.	Presencia de garrapata <i>Boophilus</i> spp en México.....	19
9.	Georreferenciación de sitios de muestreo.	
10.	Visualización de eritrocitos parasitados con <i>Anaplasma</i> spp por tinción de Wright (aumento 100x)	27
11.	Gel de agarosa al 1% teñido con gel red carril 1: marcador de 1 Kb. Carril 2: blanco (agua), carril 3: Control positivo (ADN de bovino), Carril 7: (ADN de Venado), Carril 8: (ADN de Venado), Carril 12: (ADN de Venado), Carril 14: (ADN de bazo), Carril 15: (ADN de bazo), Carril 17: (ADN de garrapata)	34
12.	Gel de agarosa al 1% teñido con gel red, carril 1: marcador de 1 Kb. Carril 2: blanco (agua), carril 3: Control positivo (ADN de bovino), Carril 5: (ADN de Venado), Carril 6: (ADN de Venado) Carril 8: (ADN de Venado), Carril 9: (ADN de bazo), Carril 10: (ADN de bazo), Carril 11: (ADN de garrapata).....	35

RESUMEN

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Anaplasma spp.* EN VENADOS COLA BLANCA (*Odocoileus virginianus*) EN CAUTIVERIO, EN SINALOA”

M.V.Z. LUCIO RICARDO IBÁÑEZ GARDUÑO

Los venados cola blanca son rumiantes silvestres considerados como reservorios naturales de Anaplasmosis; la cual afecta a la ganadería intensiva como extensiva en el estado de Sinaloa. Se ha descrito que *Anaplasma marginale* es el agente causal de la Anaplasmosis en venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*). El objetivo de este trabajo fue caracterizar *Anaplasma spp* en venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en cautiverio en Sinaloa, utilizándose un diseño observacional, transversal, descriptivo por conveniencia; se colectaron 10 muestras de sangre de venados, 2 muestras de baso de venados así como de una muestra de garrapatas obtenida de un ejemplar de venado en cautiverio, estas muestras se trasladaron a 4°C para procesarla en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, donde se les realizó un frotis sanguíneo al cual se le aplicó la tinción de Wright y se observó en un microscopio compuesto. Se obtuvo el ADN del total de muestras a los cuales se les realizó PCR semianidado para el gen *msp1 α*. De las diez muestras de venado cola blanca 7 de 10 (70%) resultaron positivas por morfología. Por PCR se obtuvo 3 positivos para el género *Anaplasma* por el gen *rpoB* y 3 para el gen *msp1 α* específico para *Anaplasma marginale* por lo cual se corrobora la presencia de *Anaplasma marginale* y está presente en venados cola blanca en cautiverio, los cuales pueden ser reservorios de la bacteria en Sinaloa.

Palabras clave: *Anaplasma marginale*; Venados; morfología; frotis; PCR.

ABSTRACT

White tail deer are wild ruminants considered as natural reservoirs of Anaplasmosis; which affects intensive and extensive livestock in the state of Sinaloa. *Anaplasma marginale* has been described as the causative agent of Anaplasmosis in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). The objective of this study was to characterize the species of *Anaplasma* spp in white tail deer that are in captivity in Sinaloa, using an observational, cross-sectional, descriptive design for its convenience; 10 samples of peripheral deer blood were taken, 2 samples of deer spleen as well as a sample of ticks obtained from a deer in captivity. These samples were transferred at 4 ° C to be processed in the Parasitology laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, where a blood smear was performed to which Wright's stain was applied and observed in a compound microscope. The DNA was obtained from the total samples to which semi-nested PCR was performed for the *msp1α* gene. Of the ten samples of white-tailed deer, 7 out of 10 (70%) were positive by morphology. By PCR, 3 positives were obtained for the *Anaplasma* genus by the *rpoB* gene and 3 for the *msp1α* gene specific for *Anaplasma marginale* whereby the presence of *Anaplasma marginale* is corroborated and it is present in captive white-tailed deer, which can be the reservoirs for the bacteria in Sinaloa.

Keywords: *Anaplasma marginale*; deer; morphology; smear; PCR.

I.- INTRODUCCIÓN

El venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) es el ungulado con mayor área de distribución en el continente Americano. En México, se le encuentra en todo el territorio excepto la península de Baja California, algunas áreas del norte de Chihuahua y norte de Sonora (Mandujano, Delfín-Alfonso y Gallina, 2010), es una especie de cérvido mediano, caracterizado por un cuello largo y grueso, patas largas, hocico alargado y orejas grandes. Generalmente de color café castaño brillante a grisáceo y más pardo en el invierno; la porción inferior de la cola es de color blanco, cuando son juveniles presentan manchas blancas (moteados), los venados pierden las astas entre enero y marzo y las nuevas empiezan a crecer entre abril y mayo (Álvarez-Romero y Medellín, 2005). Los venados cola blanca son considerados reservorios de la Anaplasmosis una enfermedad causante de pérdidas en la producción pecuaria y es transmitida por vectores (garrapatas, tábanos, entre otros) (Silva-Iturriza *et al.*, 2013). De igual manera estos vectores transmiten patógenos protozoarios, rickettsiales y virales que impactan en la salud humana (Estrada-Peña y Jongejan, 1999; Parola *et al.*, 2001). Las pérdidas en la actividad pecuaria asociadas a la Anaplasmosis, están comprendidas directamente por la muerte de animales, tratamientos farmacológicos o bien por el combate de sus principales vectores (Silva-Iturriza *et al.*, 2013). Brayton, (2012), menciona que las enfermedades infecciosas transmitidas por garrapatas a los animales son consideradas las más importantes a nivel mundial con costos económicos anuales estimados en \$7 mil millones, dentro de los EE.UU., se cree que la anaplasmosis es responsable de al menos 50-100,000 muertes de ganado por año, con pérdidas económicas que van desde 30 hasta 60 millones de dólares. La infección ocurre a través de la picadura de una garrapata portadora de la bacteria, las especies de Garrapatas *Rhipicephalus spp.*, *Dermacentor spp* e *Ixodes spp* son la fuente principal de transmisión, aunque otras fuentes de transmisión mecánica han sido reportados (Lbacha *et al.*, 2017). La incubación de la bacteria en el hospedero dura de 7 a 60 días después de los cuales si la parasitemia de los glóbulos rojos excede el 15% del umbral, aparecen los signos clínicos, la severidad de los signos observados durante la fase clínica varían según la virulencia de la cepa y el estado inmune de los animales infectados (Lbacha *et al.*, 2017). Los principales agentes etiológicos de este

padecimiento son *Anaplasma ovis* (*A. ovis*) y *Anaplasma marginale* (*A. marginale*) cuyo cuadro clínico incluye: depresión, debilidad, disminución de la producción de leche, pérdida de peso, aborto y anemia severa en áreas endémicas (Yasini *et al.*, 2012). Epidemiológicamente la enfermedad se transmite por una variedad de factores que incluyen la geografía y el clima, los cuales determinan la variedad de garrapatas o moscas mordedoras responsable de los casos locales de infección (Foil, 1989). *Anaplasma* es un microorganismo intracelular obligado, de tipo Gram negativo, se replica en las células sanguíneas de los mamíferos; donde diversos rumiantes silvestres son reconocidos como reservorios, sin embargo, en muchos casos, las bacterias del género *Anaplasma* spp afectan a los animales domésticos, incluso a personas (Rymaszewska *et al.*, 2008). Diversos estudios dan cuenta de que tanto el ganado bovino como los venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*) son responsables de mantener poblaciones importantes de garrapatas en los agostaderos y estos últimos están considerados como hospedadores (González-V *et al.*, 2010). Tana-Hernández *et al.* (2017), refieren uno de los métodos más utilizado para diagnosticar ésta bacteria hemotrófica es el examen directo en frotis de sangre. Como lo refieren Silva-Iturriza *et al.* (2013) donde por medio de este examen determinaron en su estudio la infección activa por *Anaplasma* spp en 2 ejemplares de venado cola blanca mientras que Li *et al.* (2013) realizaron en china frotis sanguíneo de ciervos rojos y venados sika de los cuales obtuvieron muestras positivas para *Anaplasma* spp. Silva Iturriza *et al.* (2013), en Venezuela detectaron morfológicamente cuerpos de inclusión de *Anaplasma* spp por frotis sanguíneo teñido por Giemsa, donde 2 de 5 venados cola blanca resultaron positivos. Mehrpad *et al.* (2018), en Filipinas, realizaron pruebas moleculares de muestras de sangre de 138 cervidos silvestres, donde 11 (8%) venados fueron positivos para *Anaplasma marginale*. Tomando en cuenta que ésta enfermedad está presente en la mayoría de los animales productivos y en los animales silvestres como el venado cola blanca y estos últimos considerados hospedadores, el presente trabajo tiene como objetivo general, caracterizar las especies de *Anaplasma* en venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en cautiverio en Sinaloa.

II.- REVISIÓN DE LITERATURA

2.- Características del género *Anaplasma*

En 1894 aparecieron los primeros informes sobre *A. marginale* derivado de estudios realizados por Salmon y Smith, quienes detectaron la presencia de cuerpos de inclusión en células de los eritrocitos de ternero. Sin embargo la primera descripción completa fue por parte de Sir Arnold Theiler, quien observó bacterias en los eritrocitos del ganado sudafricano en 1910 (Kocan *et al.*, 2003). Él descubrió dos subespecies de *Anaplasma*: el primero presentando "puntos marginales" en los eritrocitos (*A. marginale*) y el otro más frecuentemente encontrado con mayores concentraciones en la parte central de las células sanguíneas, de ahí el nombre *A. centrale*. Considerado como el menos patógeno en los animales domésticos (Kocan *et al.*, 2003). Posteriormente se descubrieron otras especies de *anaplasmas* patógenas para los animales (cuadro 1), como *A. ovis*, *A. platys* (anteriormente conocido como *E. platys*) y *A. bovis* (Harvey *et al.*, 1978; Kuttler, 1984). Sin embargo después de algunas investigaciones, se demostró que la Anaplasmosis puede afectar a los humanos; reportándose el primer caso en 1994 en los Estados Unidos, la cual fue causada por *A. phagocytophilum* (agente de la Anaplasmosis granulocítica humana, descrita al principio como ehrlichiosis granulocítica) (Chen *et al.*, 1994, Dumler *et al.*, 2001). En 1996 ésta enfermedad también fue diagnosticada en Europa, en Eslovenia (Petrovec *et al.*, 1997) e informado en Polonia en 2001 (Tylewska-Wierzbanowska *et al.*, 2001).

Cuadro 1. Características de los géneros de Anaplasma y su reclasificación.

AGENTE ETIOLÓGICO antes de 2001	AGENTE ETIOLÓGICO después de 2001	ENFERMEDAD	VECTOR	ORGANISMO INFECTADO O HUESPED	CÉLULA INFECTADA
<i>Ehrlichia bovis</i>	<i>Anaplasma bovis</i>	Anaplasmosis bovina	<i>Haemaphysalis sp</i> <i>Rhipicephalus sp</i> <i>Amblyomma sp</i>	Rumiantes pequeños y mamíferos	Monocitos
<i>Anaplasma ovis</i>	<i>Anaplasma ovis</i>	Anaplasmosis bovina	<i>Dermacentor sp.</i>	Pequeños rumiantes (ovejas, cabras)	Eritrocitos
<i>Anaplasma marginale</i>	<i>Anaplasma marginale</i>	Anaplasmosis bovina	<i>Ixodes sp</i> <i>Dermacentor sp.</i>	Rumiantes domésticos y silvestres	Eritrocitos
<i>Anaplasma centrale</i>	<i>Anaplasma centrale</i>	Anaplasmosis bovina	<i>Ixodes sp</i> <i>Haemaphysalis sp.</i>	Rumiantes	Eritrocitos
<i>E. equi</i> <i>E. phagocytophila</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (HGA agente)	Anaplasmosis granulocítica humana y animal	<i>Ixodes sp</i> <i>Dermacentor sp.</i>	Pequeños rumiantes, especies silvestres, caballos, perros, humanos	Granulocitos
<i>E. platys</i>	<i>Anaplasma platys</i>	Trombocitopenia cíclica canina	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Perros	Plaquetas

(Rymaszewska et al., 2008)

2.1.-Características de *Anaplasma marginale*

Anaplasma marginale se consideró como un protozoo hemático durante mucho tiempo, investigaciones demostraron que se clasifica dentro del Orden *Rickettsiales*, Familia *Anaplasmataceae*, Género *Anaplasma*, tiene forma esférica, tamaño de 0.2 a 1 µm y se transmite por garrapatas de distintos géneros (Corona et al., 2004), posee la capacidad de multiplicarse en la sangre de rumiantes y hemolinfa de garrapatas (de la Fuente et al., 2006). Los organismos pertenecientes a este orden fueron reclasificados con base a los genes del 16S RNAr, los genes groESL y los que codifican para las proteínas de superficie fueron asignados a dos Familias: *Anaplasmataceae* y *Rickettsiae*. Dentro de la familia *Anaplasmataceae* se incluyeron los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Wolbachia*, *Neorickettsia* (Corona et al., 2014). *A. marginale* se distribuye en regiones tropicales y subtropicales del mundo, lo que resulta en una pérdida económica considerable para los productos industriales de lácteos y carne de vacuno. *A. marginale* reside dentro de los eritrocitos de los

rumiantes, e induce pirexia, anemia, pérdida de peso, aborto, letargo, ictericia, esplenomegalia y hepatomegalia, y con frecuencia la muerte. *A. marginale* se transmite horizontalmente por las garrapatas *ixódidas*, mientras que la transmisión ocurre cuando la sangre infectada se transfiere al ganado susceptible por picaduras de moscas o fómites contaminados con sangre (Santos *et al.*, 2012). Se ha demostrado que *A. marginale* es transmitida por garrapatas *ixodidas*, incluyendo *Dermacentor andersoni* y *D. variabilis* en los EE.UU., siendo *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, el vector más importante en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. (Brayton, 2012).

2.1.1.-Signos Clínicos

A medida que avanza el proceso infeccioso, los animales sufren diferentes manifestaciones clínicas, primeramente provoca fiebre (superior a 39.5°C), depresión, anemia hemolítica progresiva e ictericia, debilidad, baja de apetito, estreñimiento, pérdida de peso, anorexia, letargo taquipnea, taquicardia, dificultad de mantenerse en pie y disminuye el hematocrito (fig. 1). Las hembras pueden llegar a abortar, mientras que los machos suelen ser infértiles temporalmente (Aubry y Geale, 2011; Zivkovic *et al.*, 2007; Hofmann-Lehmann *et al.*, 2004). En la segunda fase, los venados desarrollan atonía gastrointestinal, estasis del rumen y estreñimiento, que se asocian a la deshidratación y la pérdida de peso, ictericia. Algunos animales presentan déficit neurológico, que se han atribuido a los episodios de anoxia cerebral (Aubry y Geale, 2011). En la tercera fase, los animales pierden peso, abortan y se da la recuperación lentamente, pero en los casos en que los ejemplares mueren en la necropsia se observa anemia severa, ictericia, esplenomegalia y hepatomegalia, hemorragias petequiales en las superficies serosas del corazón y el pericardio (Coetzee *et al.*, 2005; Aubry y Geale, 2011). En la última fase se observa a el animal asintomático y sirve como reservorio para la transmisión del microorganismo (Kocan *et al.*, 2010).



Figura 1. Venado hembra con signología clínica de Anaplasmosis destacando la pérdida de peso y el letargo.

2.1.2.- Ciclo evolutivo

Anaplasma marginale, ingresa en forma reticular a las células del intestino medio de la garrapata, donde se divide por fisión binaria y se transforma a forma densa, que es su forma patógena, después la bacteria pasa a las glándulas salivales, lo que permite la transmisión a hospederos susceptibles mediante la mordedura durante su proceso de alimentación (Kocan *et al.*, 2010). Dentro del organismo, la bacteria se adhiere a los glóbulos rojos y por invaginación de la membrana celular se forma una vacuola y penetra; el microorganismo se divide por fisión binaria para formar un cuerpo de inclusión que contiene hasta ocho cuerpos unidos entre sí, como se ilustra en la fig. 2 (Kocan *et al.*, 2003), provocando así el padecimiento de la Anaplasmosis, el cual está dividido en 4 etapas. La primera etapa oscila entre 3 – 8 semanas, en la segunda etapa dura de 4 – 9 días después, en la tercera etapa dura de semanas a meses y la cuarta etapa puede durar años (Stokka *et al.*, 2000).

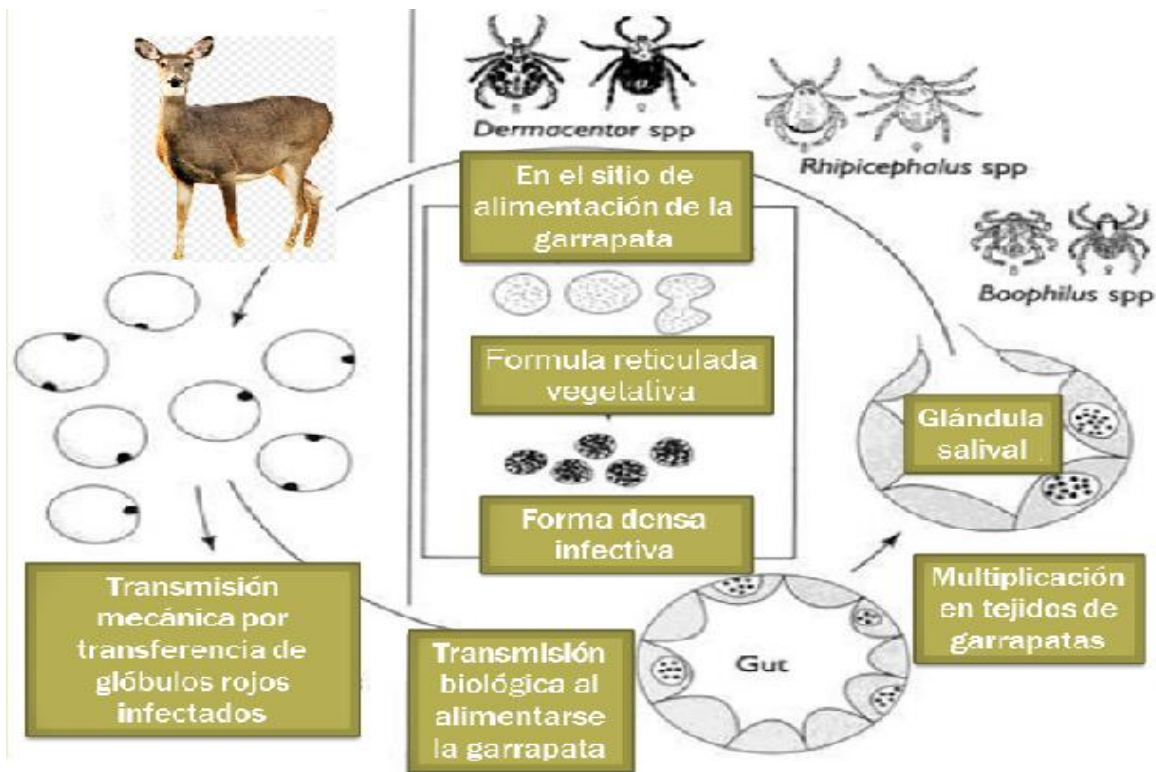


Figura 2. Ciclo biológico de la Anaplasmosis vector-hospedero.

2.2.-Características de *Anaplasma centrale*.

Anaplasma centrale es considerado tradicionalmente como una especie separada de *A. marginale*, al determinarse que las diferencias antigénicas y genéticas no son lo suficientemente marcadas como para justificar esta separación siendo ésta considerada al menos por ahora como una variante de *A. marginale*. Palomar *et al.*, (2015) mostraron en un estudio el primer informe de *A. centrale* en *Haemaphysalis punctata* y proporciona la primera evidencia de ésta bacteria en garrapatas de Europa. Secuencias similares fueron detectadas en muestras de sangre de venado de la misma área de estudio. (Portillo *et al.*, 2011). *Anaplasma marginale* subespecie *centrale* también infecta al ganado; sin embargo, causa una forma más leve de anaplasmosis y se usa como vacuna viva contra *A. marginale*. Existe menos interés en la epidemiología de *A. marginale* subsp. *centrale* (Khumalo *et al.*, 2016).

2.3.- Características de *Anaplasma ovis*.

Anaplasma ovis es un patógeno rickettsial transmitido por artrópodos que induce anemia aguda en ovejas y cabras después de la invasión y replicación dentro de los eritrocitos, experimentalmente la inoculación de cabras con *A. ovis* ha demostrado inducir una enfermedad aguda caracterizada por depresión, anorexia, fiebre, y anemia progresiva, aunque se le atribuye a *A. ovis* la causa de infecciones que se han reportado cabras en el mundo (Ndjng'u 1995).

2.4.-Mecanismos de patogenicidad de las especies del género *Anaplasma*.

Después de la transmisión, las bacterias de *Anaplasma* invaden y se replican en los eritrocitos maduros y, durante la fase aguda de la enfermedad, la rickettsemia intraeritrocítica aumenta dramáticamente por mililitro de sangre. Esto se traduce en anemia hemolítica severa y una tasa de mortalidad del 36 %. Los animales que sobreviven a la enfermedad aguda, permanecen infectados persistentemente con ciclos con niveles fluctuantes de organismos por mililitro (Brayton, 2012).

2.5.-Técnicas de laboratorio para el diagnóstico de *Anaplasma*.

El método más utilizado para diagnosticar esta bacteria hemotrófica es el examen directo en frotis de sangre, la sensibilidad y la especificidad es limitada en comparación con otros métodos como PCR. Esta técnica descrita por Mullis en 1983, supuso un gran avance para la universalización de las técnicas moleculares, el método posee características especiales de sensibilidad, especificidad, versatilidad, rapidez y accesibilidad que la hacen útil en identificación y diagnóstico (Bolívar, 2013). En un estudio se utilizaron dos PCR para amplificar regiones específicas de *Rickettsias* para su identificación molecular de las distintas especies del género *Anaplasma* (Tana-Hernández *et al.*, 2017).

Bolívar (2013), refiere en su estudio que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) confiere sensibilidad y especificidad, de ahí su gran valor para la identificación de

patógenos. Por otra parte Figueroa *et al.* (1993), desarrollaron un PCR múltiple para la detección de *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* a partir de sangre de bovinos; mientras que Corona *et al.* (2014), realizaron la detección de *Anaplasma marginale* en bovinos sin presencia de signos clínicos de la enfermedad utilizando la amplificación por PCR del gen *msp5* de este hemoparásito. Torioni *et al.*, (1998), optimizaron un PCR anidado (PCRn) acoplado con análisis de secuencia e hibridación para identificar el gen *msp5* de *A. marginale*, capaz de detectar hasta 30 eritrocitos infectados por mililitro de sangre, lo cual lo hace de 10 a 100 veces más sensible que los ensayos de PCR previamente descritos. El PCRn unido con la hibridación resulta un método altamente sensible y específico para detectar animales infectados con *A. marginale*.

2.6.- Aspectos epizootiológicos de la Anaplasmosis en rumiantes.

El estatus epizootiológico de los rebaños puede variar desde una condición de inestabilidad enzoótica de bajo porcentaje de animales infectados con alta susceptibilidad a la infección clínica hasta una condición de estabilidad enzoótica con un alto porcentaje de animales infectados y baja susceptibilidad del rebaño a enfermar clínicamente (Bolívar, 2013).

2.7.- Impacto económico de la Anaplasmosis en la producción animal.

La Anaplasmosis bovina es una enfermedad endémica en áreas tropicales y subtropicales. Es causada por la bacteria *Anaplasma marginale*, y representa un problema económico para los ganaderos debido a las altas pérdidas económicas que genera, tales como: mortalidad, disminución de la producción, medidas de cuarentena, tratamientos y control de vectores Brayton, (2012), además menciona que las enfermedades infecciosas transmitidas por garrapatas a los animales son consideradas las más importantes a nivel mundial con costos económicos anuales estimados en \$ 7 mil millones, dentro de los EE.UU., se cree que la Anaplasmosis es responsable de al menos 50-100,000 muertes de ganado por año, con pérdidas económicas que van desde 30 hasta 60 millones de dólares (Brayton, 2012).

2.8.- Principales vectores de las especies de *Anaplasma*.

En epidemiología, un vector es un organismo que contribuye a la propagación de un patógeno en una población, las garrapatas son las que juegan un papel de mayor importancia en la epidemiología de la enfermedad transmisión. La Anaplasmosis es una enfermedad típica transmitida por garrapata, la cual puede llegar a provocar una zoonosis, en la que las garrapatas son los vectores, es decir, transferir bacterias a la sangre de los vertebrados superiores en el que se alimentan (Rymaszewska *et al.*, 2008).

2.9.- Géneros y especies de garrapatas reportadas en México.

Rodríguez-Vivas *et al.*(2014) reportan que en México se han registrado 82 especies de garrapatas tanto en animales silvestres como domésticos siendo *Rhipicephalus microplus* la que mayor impacto tiene en la ganadería debido a su amplia distribución en regiones tropicales y subtropicales, siendo la de mayor impacto en el derrame económico (disminución de los parámetros productivos de los animales y los costos de control), aunado a los problemas de resistencia a ixodicidas, y a las enfermedades que trasmite (*Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale*).



Figura 3. Presencia de garrapata *Boophilus spp* en México (SENASICA 2018).

2.10.- Importancia de los distintos géneros y especies de garrapatas como vectores de *Anaplasma*.

Se ha demostrado que *A. marginale* es transmitida por garrapatas Ixodidas, incluyendo *Dermacentor andersoni* y *D. variabilis* en los EE.UU., y siendo quizá *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, el vector más importante en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Brayton, 2012). Sin embargo *Borrelia burgdorferi* y *Anaplasma phagocytophilum* son parásitos intracelulares obligados que mantienen sus ciclos de vida en ciclos enzoonóticos vector-huésped con *Ixodes scapularis* como vector. Además de las garrapatas, los huéspedes comúnmente están infestados con insectos de la familia *Hippoboscidae* (Buss *et al.*, 2016).

2.11.- Influencia del medio ambiente en el ciclo biológico de los vectores.

Se sabe que las condiciones medio ambientales modulan las relaciones del patógeno, vector/hospedador con el clima, condiciones meteorológicas, hábitats, ecosistemas,

urbanización y contaminación. Los cambios climáticos parecen influir sobre la distribución temporal y espacial, así como sobre la dinámica estacional e interanual de patógenos, vectores, hospedadores y reservorios (Sánchez *et al.*, 2009). Por otra parte refieren que muy probablemente, el efecto del cambio climático sobre las enfermedades transmitidas por artrópodos se observará al variarse los límites de temperatura de transmisibilidad: 14-18°C como límite inferior y 35-40°C como límite superior. Un leve aumento del límite inferior podría dar lugar a la transmisión de enfermedades, mientras que un incremento del límite superior podría suprimirlo. También, Sánchez *et al.* (2009) mencionan que la temperatura es un factor crítico del que depende tanto la densidad como la capacidad vectorial; aumenta o disminuye la supervivencia del vector, condiciona la tasa de crecimiento de la población de vectores, cambia la susceptibilidad del vector a los patógenos, modifica el periodo de incubación extrínseca del patógeno en el vector y cambia la actividad y el patrón de transmisión estacional.

2.12.- Géneros y especies de tábanos de importancia médica reportadas en México, Son variadas las especies de tábanos reportados para el país, los cuales incluyen:

Cuadro 2. Especies de tábanos reportados en México.

AUTOR	ESPECIE	DISTRIBUCIÓN
Fairchild (1942, 1961, 1971 y 1986)	<i>Chrysops variegatus.</i>	Región Neo tropical desde Chile y norte de Argentina hasta el sur de México,
Fairchild (1971)	<i>Diachlorus ferrugatus</i>	Sur de Estados Unidos de América, Bahamas, México y América Central hasta el sur de Costa Rica.
	<i>Leucotabanus canithorax.</i>	Colombia, Trinidad, Guyana, Panamá, Belice y México.
	<i>Leucotabanus itzarum</i>	Esta especie es endémica de México (la Península de Yucatán)

Ibáñez-Bernal (1992)	<i>Tabanus colombensis</i>	Sian Ka'an Quintana Roo Campeche y Yucatán.
	<i>Tabanus commixtus</i>	México hasta Venezuela,
	<i>T. commixtus</i>	Sian ka'an, Quintana Roo.
	<i>T. commixtus</i>	Chichen Itzá, Yucatán bajo el nombre de T. maya,
Manrique-Saide <i>et al.</i> , (2012)	<i>Tabanus haemagogus.</i>	Dentro de la Península de Yucatán ha sido encontrada en Yucatán y Quintana Roo desde Tabasco, México, hasta Guatemala
	<i>Tabanus oculus</i>	En la Península de Yucatán, se ha colectado en Yucatán, Quintana Roo

(Sala *et al.*, 2015).

2.13.- Importancia de los distintos géneros y especies de tábanos como vectores de *Anaplasma*.

En la infección natural intervienen los insectos que se alimentan de sangre (insectos hematófagos). Dentro de los insectos hematófagos, los tábanos parecen ser los más eficientes, ya que pueden pasar de un animal a otro y picar inmediatamente. Estos insectos actúan mecánicamente en el contacto sangre-sangre entre un animal portador crónico (fuente de infección) y un animal susceptible. Para que se produzca la transmisión la sangre debe permanecer fresca, ya que al secarse *A. marginale* muere. Foil (1989) en su estudio menciona a los vectores Tabanidae a quienes se les consideran una de las principales plagas dípteros del hombre y los animales en todo el mundo, pero este grupo es, sin duda, el menos estudiado. Se han descrito al menos 137 géneros y 4154 especies de tabanidos los transmisores mecánicos de enfermedades. (Sala *et al.*, 2015).

2.14.- Influencia de los rumiantes silvestres en la epizootiología de la Anaplasmosis.

Aparentemente, el ganado no es el principal para mantener poblaciones importantes de garrapatas en los agostaderos, ya que especies de fauna silvestre como el venado cola blanca y animales ungulados exóticos pueden ser hospederos. Esto complica los programas de control de garrapata, ya que la fauna silvestre es más difícil de monitorear y tratar. Además, la población de especies de ungulados exóticos parece ir en aumento a lo largo de la zona fronteriza de México y los Estados Unidos, los cuales pueden ser hospederos de garrapatas transmisoras de la fiebre de Texas (González-V *et al.*, 2010). Además Khumalo *et al.* (2016) mencionan que *A. marginale* infecta a una amplia gama de rumiantes, incluido el búfalo (*Bubalus bubalis* y *Syncerus caffer*), ñu (*Connochaetes gnou* y *Connochaetes taurinus*), bisonte americano (*Bison bison*), venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), venado bura (*Odocoileus hemionus hemionus*), venado cola negra (*Odocoileus hemionus columbianus*) y el alce de las Montañas Rocosas (*Cervus elaphus nelsoni*).

2.15.- Importancia del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en la epizootiología de la Anaplasmosis en los rumiantes domésticos.

Se reconoce que es *Anaplasma marginale* el agente que afecta al venado cola blanca en norte América, causando anemia progresiva y muerte (Zaugg, 1988). Aunado a lo anterior este mamífero se une a las muchas especies de rumiantes silvestres susceptibles a contraer Anaplasmosis y fungir como portador de la misma. Por otro lado Buss *et al.* (2016), mencionan a *Borrelia burgdorferi* y *Anaplasma phagocytophilum* como parásitos intracelulares obligados que mantienen sus ciclos de vida en ciclos enzoonóticos vector-huésped con *Ixodes scapularis* como vector. Además de las garrapatas, los huéspedes comúnmente están infestados con insectos de la familia *Hippoboscidae*. Buss *et al.* (2016) en su estudio confirman la presencia de *B. burgdorferi* y *A. phagocytophilum* en ciervos keds (*Lipoptena cervi*) eliminados del venado de cola blanca mediante PCR (Buss *et al.*, 2016). La detección de estos patógenos en ciervos ked representa una posible nueva susceptibilidad de la vida

silvestre y también sugiere el riesgo de transmisión de estos patógenos a humanos y animales por la mordedura de un ectoparásito infectado.

2.16.- Antecedentes directos.

En un estudio realizado en Venezuela por Silva Iturriza *et al.* (2013), detectaron morfológicamente cuerpos de inclusión de *Anaplasma* spp por frotis sanguíneo teñido por Giemsa, donde 2 de 5 venados cola blanca resultaron positivos.

Li *et al.* (2013) en un estudio realizado en China observaron en frotis sanguíneo 8 muestras positivas de ciervos rojos (*Cervus elaphus*) salvajes (18.2%, 8/44) de la montaña Qilian y 4 muestras positivas de venados sika (*Cervus nippon*) domesticado (10%, 4 /40) de la montaña Long, donde se observaron patógenos similares a *Anaplasma* spp.

En un trabajo realizado en Cuba por Corona *et al.* (2011) en bovinos, se diagnosticó de un total de 113 animales donde obtuvieron 22 casos positivos a *Anaplasma* spp por tinción con Giemsa en frotis de sanguíneo pesentandose una frecuencia de un 19.46%. Además, amplificaron el gen *msp5* para *Anaplasma marginale* por PCR en bovinos, donde encontraron un total de 84.95 % (96/113) animales positivos.

Escobar *et al.* (2015) en Ecuador, realizaron un estudio con 170 garrapatas a las cuales se les extrajo el ADN para realizar PCR anidado utilizando el gen *msp4* para *Anaplasma marginale* en donde obtuvieron un porcentaje de 13.46 % positivos a partir de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Amplificando dentro de los 200 pb.

Mehrpada *et al.* (2018), en Filipinas, realizaron pruebas moleculares de muestras de sangre de 138 cervidos silvestres, donde 11 (8%) venados fueron positivos para *Anaplasma* spp. El análisis de secuencia reveló que los ciervos estaban infectados con tres especies de *Anaplasma*, incluidas *A. marginale*, *A. phagocytophilum* y *A. platys*.

Yucatán, México, Rodríguez-Vivas *et al.* (2013), detectó *Anaplasma marginale* en bovinos y venados en un 17% y 10% de las muestras. Además se discutió el papel del ciervo como huésped de *R. microplus* en la importancia de la relación huésped-parásito en relación con la epidemiología de las enfermedades transmitidas por la garrapata.

Ojeda-chi *et al.* (2019) llevaron a cabo un estudio en Yucatán México con 25 venados cola blanca, de los cuales presentaron un 20 % (5/25) de prevalencia para agentes rickettsiales (*A. phagocitophilum*, *A. odocoilei*), amplificando el gen 16S de ARN ribosómico, por medio de PCR esta prevalencia se le atribuye a la transmisión por medio de las garrapatas principalmente *Rhipicephalus microplus* ya que se detectó una frecuencia de infección del 28.4% encontrándose 25.2 garrapatas por venado.

III. HIPÓTESIS

Anaplasma marginale es el agente causal de la Anaplasmosis en venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en cautiverio en Sinaloa.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar *Anaplasma* spp en venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en cautiverio en Sinaloa.

Objetivos específicos

- 1.- Detectar *Anaplasma* spp. en sangre de venados cola blanca.
- 2.- Identificar *Anaplasma* spp. por técnicas de biología molecular
3. Caracterizar molecularmente las especies de *Anaplasma* presentes en sangre de venado cola blanca.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Tipo de estudio

Observacional, Transversal, Descriptivo, Por conveniencia (Manterola y Otzen, 2014)

5.2 Sitio de muestreo

Se muestrearon 7 predios como se observa en la fig.4 con venados cola blanca de los municipios de Culiacán, Badiraguato, San Ignacio y Cosalá (cuadro 3), de los cuales 2 son unidades de manejo para la conservación de la vida silvestre (UMA's) previamente autorizadas por la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y los otros 4 establecimientos no contaron con registro al momento del muestreo, determinándose para la toma de muestra aquellos animales que se apreciaban bajos de peso, y previamente autorizado por el propietario, además 2 muestras de bazo de venado cola blanca fueron donados para este estudio, y se colectaron dos muestras de garrapata de un venado.

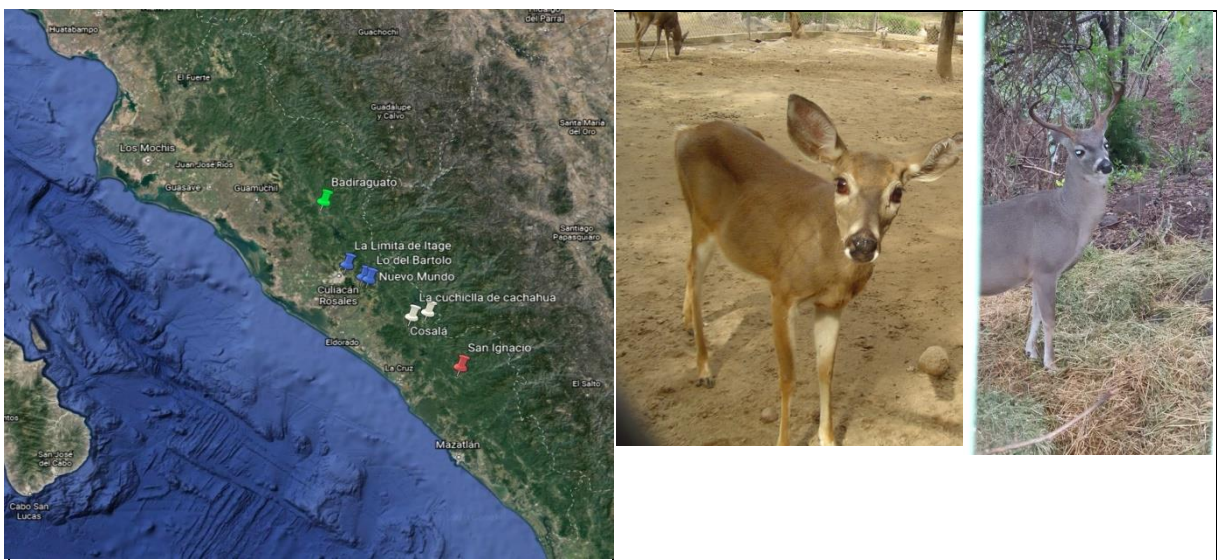


Figura 4 Georreferenciación de sitios de muestreo.

Cuadro 3. Georeferenciación de muestreo de venado

PROCEDENCIA	COMUNIDADES	NÚM. MUESTRAS	COORDENADAS
Culiacán	Ejido lo de Bartolo	1	24.694444, -107.175000
	Ejido Nuevo Mundo	1	24.713333, -107.223611
	La limita de Itage	1	24.818889, -107.356667
Badiraguato	Badiraguato	1	25 03' - 26° 09', y 106° 57' - 107° 48'
San Ignacio	Piactla	2	105° 44' 45" y 106° 44' 01"
Cosalá	Cosalá	1	24.4125, -106.691 24° 24' 45" , 106° 41' 28"
	La cuchilla de cachahua	3	24.374444, -106.823889

5.3 Procesos de laboratorio

El presente estudio se realizó en el laboratorio de parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa en el municipio de Culiacán Sinaloa, localizado entre los paralelos 24° 02' y 25° 17' de latitud norte; los meridianos 106° 52' y 107° 49' de longitud oeste; altitud entre 0 y 1800 m con rango de temperatura de 18-26°C y rango de precipitación de 400-1100mm (INEGI, 2011).

5.4 Toma de Muestra

Los venados muestreados fueron contenidos de manera química (Silva-Iturriza *et al.*, 2013); con dardos de 3 ml, utilizando un protocolo para anestesia correspondiente a la mezcla de ketamina, xylacina y Zoletil 100, la dosis se inyectó a distancia mediante un equipo Telin jectl. La muestra de sangre periférica se colectó de la vena yugular utilizando jeringas de 5ml y tubos con EDTA; las muestras se prepararon para realizarles extensiones (frotis) sanguíneo para posteriormente teñirlas con el colorante de Wright, útil para identificar la presencia de microorganismos hemáticos, (Gaxiola *et al.*, 2011) y se observaron al microscopio. La tinción de Wright es una técnica que se

emplea generalmente para la diferenciación de elementos celulares de la sangre y es clasificada como una tinción policromática, dado que puede teñir compuestos ácidos o básicos presentes en una célula (Lopez-Jacome *et al.*, 2014). La muestra de sangre periférica se colectó de la vena yugular utilizando jeringas de 5ml y tubos con EDTA. El procedimiento de toma de muestras fue por la mañana sin sobrepasar las 14 h (De la Cruz, 2017). Una vez obtenida la sangre, ésta se agitó suavemente y se colocaron en hieleras con refrigerantes para su conservación y envió al laboratorio de parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; concluido los procedimientos se le aplicó a los ejemplares anestesiados Tolazoline (antagonista de receptor α -adrenérgico) por vía endovenosa para revertir el efecto de la anestesia. Por otro lado se extrajeron de dos garrapatas del genero *R. microplus* recolectadas de uno de los ejemplares de venado cola blanca.

5.5 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó por la técnica fenol-cloroformo, esta técnica es ampliamente usada por su economía y facilidad, lo que permite el aislamiento de ADN de buena calidad para su uso en diversas técnicas moleculares (Salazar, *et al.*, 2013).

El protocolo de extracción de ADN, consistió en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. El ADN está constituido por dos cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice. Durante la extracción, el ADN cargado negativamente se adsorbe o une a la matriz selectiva de manera reversible y se mantiene unido a ésta (Alejos *et al.*, 2015). La extracción se llevó a cabo a partir de 300 μ l de sangre periférica. Se agregaron 1000 μ l de TE (Tris 100 mM, EDTA 10 mM) se mezcló por inversión, se incubó por 1h a 37 °C en incubadora; inmediatamente después se incubó a 56 °C durante 1h en termobañó. Se centrifugó la muestra durante 10 min a 12 000 rpm y se recuperó la fase acuosa en otro tubo, donde se agregaron 500 μ l de fenol en proporción 1:1, se agitó y se centrifugó la muestra a 12 000 rpm y se recuperó la fase acuosa en otro tubo, donde se agregó cloroformo (1:1), se agito por inmersión, después se centrifugo a 12 000 rpm, se recuperó la fase acuosa y se añadió etanol

absoluto frío (1:2), se incubó a -20 °C toda la noche, posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm por 15 min. Para recuperar el ADN, después de la evaporación del etanol se adicionaron 50 µl de agua libre de nucleasas. Las muestras fueron congeladas a -20 °C hasta su uso (Sambrook *et al.*, 1989)

5.6 Amplificación del ADN por PCR.

El ADN forma parte de una mezcla de reacción para PCR a 15 µl (Buffer 10X MgCl₂, dNTPs, H₂O inyectable estéril, Taq Polimerasa, oligonucleótidos y ADN). La reacción se lleva a cabo en un termociclador (BIORAD T100) para la amplificación del gen *rpo B* para *Anaplasma* spp, fue durante 40 ciclos, la temperatura inicial fue de 95°C por 5:00 min., la desnaturalización a 95°C por 1 min., la alineación a 57°C por 1 min., con una extensión a 72 por 1 min., y con una extensión final de 72°C por 7 min. Con los oligonucleótidos: Ana-rpoBF 5'-GTCGTTCCCTAGGCTYTCTTACGCGA-3' y Ana-rpoBr 5'-AATCRAGCCAVGAGCCCCTRTAWGG-3'esperandose una amplificación dentro de los 525 pares de bases. (de la Fuente *et al.*, 2006). Para *Anaplasma marginale* se utilizarán los oligonucleótidos del *Msp1F*: 5'-GTGCTTATGGCAGACATTTCC-3'; *Msp1r*: 5' CTCAACTCGCAACCTTGG-3. Se aplicaron las siguientes condiciones del PCR semianidado para *A. marginale*, se utilizó a 94°C por 5.00 min., para la temperatura de desnaturalización, 94°C por 30s para alineación, 59°C por 50s para extensión 72°C durante 35s repetir 30 ciclos, con una extensión final de 70°C por 7 min. y finalmente 72 °C infinito con oligonucleótidos internos: *msp1* α: 5'-CGCATTACACGTTCCGTATG-3' y *msp1r*: 5' CTCAACTCGCAACCTTGG-3', se precalentó la mezcla por 5 min a 94 °C, la desnaturalización de 94 °C por 35 s, la alineación a 65 °C por 58 s y 72 °C por 30 s, respectivamente y la extensión a 72 °C por 10 min., con una extensión final de 4 °C infinito (Molad *et al.*, 2006). Los productos de PCR se revelaron en geles de agarosa al 1% teñido con Gel Red y se visualizó en un transluminador ultravioleta utilizando un marcador de tamaño de 1 Kb (Huang *et al.*, 2010).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El examen microscópico por frotis sanguíneo permitió la observación directa de cuerpos de inclusión dentro del eritrocito, compatibles con *Anaplasma* spp., como se observa en la fig.5 lo que permitió identificar 7 muestras positivas de venado cola blanca pertenecientes a 4 municipios de Sinaloa como se observa en el cuadro 4.

6.1.- Resultados por Frotis en Microscopia Óptica

Cuadro 4. Resultados obtenidos en el laboratorio de parasitología de la FMVZ UAS de muestras de venados cola blanca utilizando la técnica de frotis con tinción de wright.

MUESTRA	TOTAL EJEMPLARES	NÚM. EJEMPLARES MUESTREADOS	PROCEDENCIA	SEXO	RESULTADOS	
					<i>Anaplasma marginale</i>	<i>Babesia</i>
1	3	1	Uma El Apomito (Culiacán)	H	+	+
2	1	1	Ejido Nuevo Mundo (Culiacán)	M	+	+
3	1	1	Cosalá	H	+	+
4	15	1	La Cuchilla De Cachahua (Cosalá)	H	-	+
5		1	La Cuchilla De Cachahua (Cosalá)	H	-	
6	2	1	Piactla (San Ignacio)	H	+	-
7		1	Piactla (San Ignacio)	H	+	-
8	15	1	La Cuchilla De Cachahua (Cosalá)	M	-	+
9	2	1	La limita de Itage (Culiacán)	H	+	-
10	1	1	Badiraguato (Badiraguato)	M	+	-

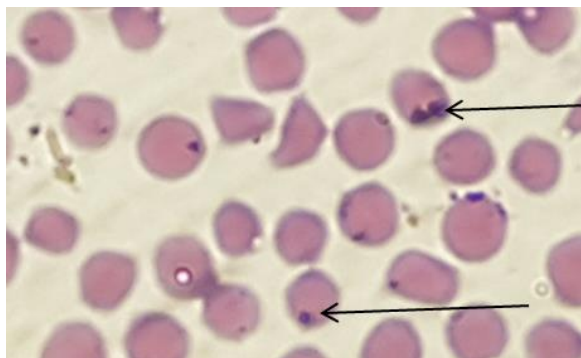


Figura 5. Visualización de eritrocitos parasitados mediante la tinción de Wright (aumento 100x).

El análisis por microscopía óptica realizada en la observación de sangre de venado el 37.5 % (3/8) de los animales pertenecían a las UMA's y el 28% (7/25) de los ejemplares de los predios no registrados con edad entre 1 y 7 años.

De las 10 muestras de sangre de venado cola blanca, procesadas por medio de frotis sanguíneo, 7/10 (70%) resultaron positivas *Anaplasma* spp, lo cual demuestra la presencia de esta bacteria en sangre. Estos resultados son similares a lo reportado por Silva-Iturriza *et al.* (2013) en Venezuela, donde determinaron la infección activa por *Anaplasma* spp en 2 ejemplares de venado cola blanca (40%) de un grupo de 5 animales capturados; considerando que los porcentajes positivos son similares debido a la presencia activa de esta bacteria y proporcional a la cantidad de muestras.

Sin embargo el estudio de Li *et al.* (2013) realizado en China observaron en frotis sanguíneo 8 muestras positivas de ciervos rojos (*Cervus elaphus*) silvestres (18.2%, 8/44) de la montaña Qilian y 4 muestras positivas de venados sika (*Cervus nippon*) domesticado (10%, 4 /40) de la montaña Long, donde se observaron patógenos similares a *Anaplasma* spp. La diferencia en el porcentaje de individuos positivos con *Anaplasma* spp con respecto a lo reportado en el presente estudio puede obedecer al tamaño de muestra, así como que no existe correspondencia con la región y el tipo de especies analizadas.

La extracción de ADN realizada por fenol cloroformo (Sambrook *et al*, 1989) se cuantificó y se observó la pureza de las muestras de sangre venado, bazo de venado y garrapata en un Nanodrop.

Cuadro 5. Cuantificación de ADN obtenido de muestras de sangre de venado

MUESTRA	ng/μl	CONCENTRACIÓN ADN
1	140	2.44
2	833	1.69
3	273	1.8
4	65.6	1.41
5	54	1.31
6	906	1.95
7	1593	2.05
8	1963	2.04
9	299	2.3
10	299	1.99
11	2381.5	1.80
12	614.3	1.47
GARRAPATA	660.5	2.04
BOVINO	2004	2.06

La amplificación obtenida por PCR para *Anaplasma* spp se observa en la Fig. 6 donde se indican 3 amplicones correspondientes a sangre de venado, 2 amplicones de las muestras de bazo de venado y 1 amplicón para la muestra de ADN de garrapata.

6.2.- Amplificación a partir del gen *rpoB*.

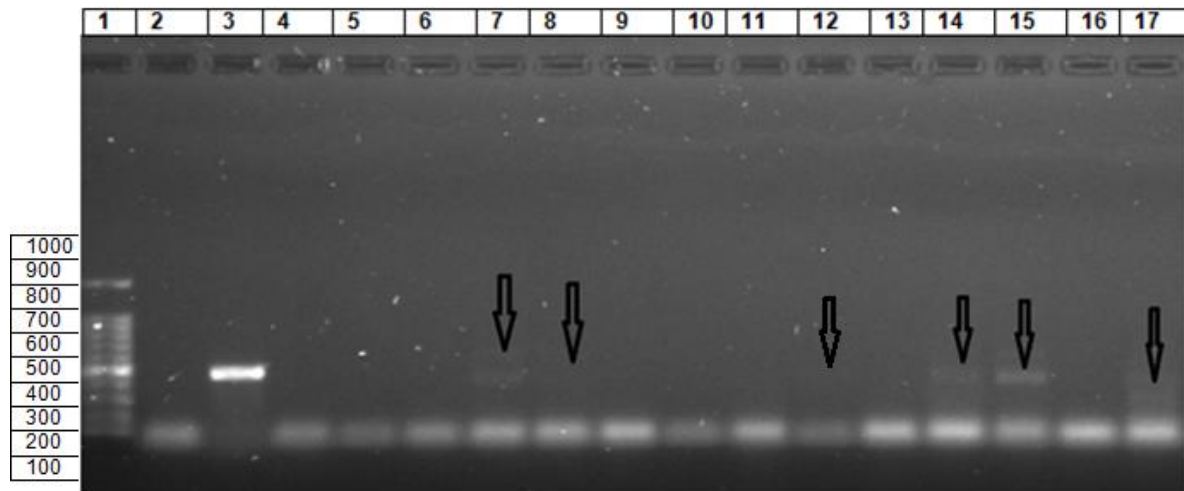


Figura 6. Gel de agarosa al 1% teñido con gel red carril 1: marcador de 1 Kb. Carril 2: blanco (agua), carril 3: Control positivo (ADN de bovino), Carril 7: (ADN de Venado), Carril 8: (ADN de Venado), Carril 12: (ADN de Venado), Carril 14: (ADN de bazo), Carril 15: (ADN de bazo), Carril 17: (ADN de garrapata).

6.3.- Amplificación del gen *msp1a* de *Anaplasma marginale*

La amplificación del gen *msp1a* de *Anaplasma marginale* se mostró aproximadamente a 500 pb como se observa en la fig. 7, donde se observa amplificación para 3 muestras de sangre de venado, 2 muestras de bazo y dos garrapatas lo cual corresponden al fragmento esperado, por lo que se corrobora por técnicas moleculares la presencia de *A. marginale* en Venado de cola blanca en cautiverio en el estado de Sinaloa.

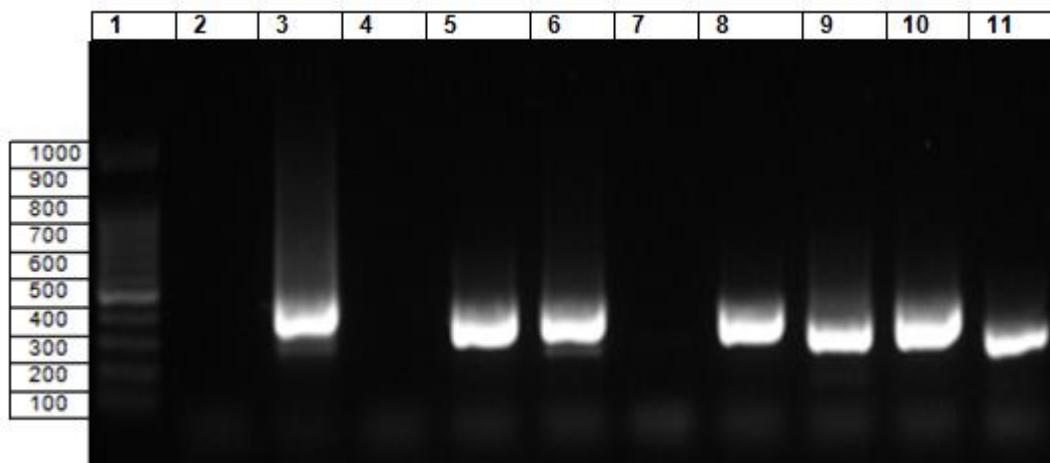


Figura 7. Gel de agarosa al 1% teñido con gel red, carril 1: marcador de 1 Kb. Carril 2: blanco (agua), carril 3: Control positivo (ADN de bovino), Carril 5: (ADN de Venado), Carril 6: (ADN de Venado), Carril 8: (ADN de Venado), Carril 9: (ADN de bazo), Carril 10: (ADN de bazo), Carril 11: (ADN de garrapata).

Los venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*) son los rumiantes silvestres que encontramos en Sinaloa y se tiene el reconocimiento de estos ejemplares como reservorios de enfermedades en vida silvestre, solo que no se han hecho estudios previos para la identificación de esas enfermedades. Este estudio arrojó resultados positivos para el agente Rickettsiales de *Anaplasma* tanto en sangre, órganos y vector, ya que de 10 muestras de sangre, obtuvimos 3 muestras positivas 30% (3/10) *Anaplasma marginale* para el gen *msp1a* amplificando alrededor de 500 pb., en este sentido este resultado fue similar en base el total de muestras positivas para el género

de *Anaplasma*, a los estudios realizados por Ojeda-chi *et al.* (2019) donde encontraron 4 ejemplares positivos 16%% (4/25) estudio llevado a cabo en Yucatán, México, en venados cola blanca, de los cuales presentaron un 20 % (5/25) de prevalencia para agentes rickettsiales (*A. phagocitophilum*, *A. odocoilei*), amplificando el gen 16S de ARN ribosómico, por medio de PCR esta prevalencia se le atribuye a la transmisión por medio de las garrapatas principalmente *Rhipicephalus microplus* ya que se detectó una frecuencia de infección del 28.4% encontrándose 25.2 garrapatas por venado. Así mismo, Mehrpad *et al.* (2018), en Filipinas, realizaron pruebas moleculares de muestras de sangre de 138 cervidos silvestres, donde 11 (8%) venados fueron positivos para *Anaplasma* spp. El análisis de secuencia reveló que los ciervos estaban infectados con tres especies de *Anaplasma*, incluidas *A. marginale*, *A. phagocytophilum* y *A. platys*.

Otro estudio realizado en Yucatán, México, Rodríguez-Vivas *et al.* (2013), detectaron *Anaplasma marginale* en bovinos y venados en un 17% y 10% de las muestras. Además se discutió el papel del ciervo como huésped de *R. microplus* en la importancia de la relación huésped-parásito en relación con la epidemiología de las enfermedades transmitidas por la garrapata.

VII. CONCLUSIÓN

El presente estudio corrobora la presencia de *Anaplasma marginale*, en venado de cola blanca (*O. virginianus*) en cautiverio en el estado de Sinaloa, tanto por microscopia óptica en frotis sanguíneo, así como por medio de PCR, la presencia de esta bacteria hemotrópica en los venados cola blanca en Sinaloa, coloca a estos ungulado silvestres como potenciales transmisores y/ reservorios de la enfermedad de Anaplasmosis hacia el ganado, con riesgo particular para aquella ganadería extensiva en agostaderos donde venados, vectores, *A. marginale* y ganado convergen.

VIII. LITERATURA CITADA

- Álvarez-Romero, J. y R. A. Medellín. 2005. *Odocoileus virginianus*. Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto U020. México. D.F.
- Bolívar A.M. 2013. "Metodología diagnóstica para hemoparásitos dentro de la ganadería bovina con énfasis en la reacción en cadena de la polimerasa y su variante múltiple" *Rev. Salud Anim.* 35. (1): 1-9.
- Buss M., Case L., Kearney B., Coleman C., Henning J. D. 2016. "Detection of Lyme disease and anaplasmosis pathogens via PCR in Pennsylvania deer ked". *Journal of Vector Ecology*, 41, 292-294.
- Coetzee, J.F., Apley, M.D., Kocan, K.M., Rurangirwa, F.R., Van Donkersgoed, J. 2005. Comparison of three oxytetracycline regimens for the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infections in beef cattle. *Vet. Parasitol.* 127: 61–73.
- Corona B., Martínez S. 2011. "Detección De Anaplasma Marginale En Bovinos, Mediante La Amplificación por PCR del Gen *Msp5*". *Rev. Salud Anim.* Vol. 33 No. 1: 24-31
- Corona González B., Obregón D., Alemán Y., Alfonso P., Vega E., Díaz A., Martínez S. 2014: "Tendencias en el diagnóstico de la anaplasmosis bovina". *Rev. Salud Anim.* 36 (2): 73-79.
- Corona, B. Rodríguez, M. Martínez, S. 2004. Anaplasmosis Bovina. *Revista Electronica de Veterinaria REDVET.*
- De La Cruz B.E. 2017. Uso de Sucsnilcolina para inmovilización química de Venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en Jalisco. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria* 18 (7):1-5.
- De la Fuente, J., Torina, A., Naranjo, V., Nicosia, S., Alongi, A., La Mantia, F., Kocan, K.M. 2006. Molecular characterization of *Anaplasma platys* strains from dogs in Sicily, Italy. *BMC Vet Res* 2, 24.
- Delfín-Alfonso, C. A., S. Gallina y C. A. López-González. 2009. Evaluación del hábitat del venado cola blanca utilizando modelos espaciales y sus implicaciones para el manejo en el centro de Veracruz, México. *Tropical Conservation Science* 2: 215-228.
- Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C.
- Escobar A., Ceballos O., Villarreal P., Carvanza M. 2015 "Prevalencia y detección por PCR anidada de *Anaplasma marginale* en bovinos y garrapatas en la zona central del Litoral ecuatoriano" Ecuador. *Ciencia y Tecnología* 8(1): 11-17

- Estrada-Peña A., F. Jongejan, "Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission", *Exp. Appl. Acarol.* 23 (1999) 685–715.
- Figuroa J.V., Chieves L, P., Johnson G, S., Buening G.M. 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.
- Foil L.D. 1989."Tabanids as vectors of disease agnents". *Parasitology Today* 5 (3):88-96.
- Gallina, S. 2010. UMAs, retos para la conservación: situación, problemática y perspectivas, con el ejemplo del aprovechamiento del venado cola blanca. XII Simposio sobre Venados en México.
- Gaxiola-M. J., Pérez-C. A., Borbolla-I. J.E., Quintero-O. I., Rubio-R. M C. 2011."Prevalencia de parásitos hemáticos en caninos de Culiacán, Sinaloa, transmitidos por garrapatas". XIX congreso nacional de parasitología Mazatlán Sinaloa.
- González-V, E.A.; Hewitt D.G.; Ortega-Santos J. A.; DeYoung R.W.; Campbell, T. Bryant F.C. 2010. "Ganadería y Fauna Silvestre del Noreste de México y Sur de Texas e Implicaciones de la Garrapata *Boophilus*: Opción de los Ganaderos" *USDA National Wildlife Research Center - Staff Publications.* 1255.
- Harvey J.W., Simpson C.F., Gaskin J.M. 1978. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsiae-like agent in dogs. *Journal of Infectious Diseases*, 137, 182–188.
- Hofmann-Lehmann, R., Meli, M.L., Dreher, U.M., Gonczi, E., Deplazes, P., Braun, U., Engels, M., Schupbach, J., Jorger, K., Thoma, R., Griot, C., Stark, K.D., Willi, B., Schmidt, J., Kocan, K.M., Lutz, H. 2004. Concurrent infections with vector-borne pathogens associated with fatal hemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland. *J Clin Microbiol.* 42: 3775-80.
- Huang Q., Baum L., Fu W.L. 2010. "Simple and Practical Staining of DNA with GelRed in Agarosa Gel Electrophoresis". *Clin Lab* 56: 149 – 152.
- INEGI. 2011. Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática. Gobierno de México. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos, Sinaloa. <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/>.
- Kelly A. B. 2012 Tick Transmission of *Anaplasma marginale*/ *Rev Mex Cienc*: 41-50
- Khumalo Z.T.H., Catanese H.N., Liesching N., Hove P., Collins N.E., Chaisi M.E., Gebremedhin A.H., Oosthuizen M.C., Brayton K.A. 2016. "Characterization of *Anaplasma marginale* subsp. *centrale* strains by use of *msp1aS* genotyping" reveals a wildlife reservoir. *54:2503–2512.*
- Kocan K.M., de la Fuente J., Guglielmone A.A., Melendez R.D. 2003. "Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle". *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 698–712.

- Kocan KM., De la Fuente J., Blouin EF., Coetzee JF., Ewing SA. 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol.* 167(2-4): 95-107. PMID:19811876. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.012>.
- Kuttler K.L. 1984. Anaplasma infection in wild and domestic ruminants: a review. *Journal of Wildlife Diseases*, 20, 12–20.
- Lbacha H. A., Zouagui Z., Alali S., Rhalem A., Petit E., Ducrotoy M. J., Boulouis H. J. & Maillard R. 2017. "Candidatus *anaplasma cameli* in onehumped camels (*Camelus dromedarius*) in Morocco: a novel and emerging anaplasma species?" *Infectious Diseases of Poverty*, 6.
- Li, Y., Chen, Z., Liu, J., Yang, J., Li, Q., Li, Y., Luo, J., Yin, H. (2013) "Molecular Survey of Anaplasma and Ehrlichia of Red Deer and Sika Deer in Gansu, China", *Medline*, 228–236, doi:10.1111/tbed.12335.
- Lobanov V.A., Gajadhar A.A., A.-Adhami B., Schwantje H.M. 2012. "Molecular Study of Free-ranging Mule Deer and White-tailed Derr from British Columbia, Canada", for Evidence of *Anaplasma* spp. And *Ehrlichia* spp. *Transboundary and Emerging Diseases* 59:233-243.
- López-Jácome, L.E., Hernández-Durán M., Colín-Castro C.A., Ortega-Peña S., Cerón-González G., Franco-Cendejas R., 2014 "Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología", México D.F. Vol. 3, 10-18.
- Mandujano, S., T. J. Pérez-Pérez, L. A. Escobedo-Morales, C. A. Yañez-Arenas, A. González-Zamora, L. A. Pérez-Solano, A. I. Ortiz-García y M. Ramos-Robles. 2010. Venados: Animales de los Dioses. Serie de libros: para la docencia, Secretaria de Educación de Veracruz, Xalapa, Ver., México. 53 pp.
- Manrique-Saide, P.C., Briceno-Uc, A.R., Ibáñez-Bernal, S. & Sandoval-Ruiz, C.A. 2012, "Tábanos de la selva mediana del sur de Yucatán, México", *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*, 28, (3): 497.
- Mehrpad S, Cleveland CA, DeNicola A, Dubey JP, Yabsley MJ. 2018. Survey for Selected Pathogens in Philippine Deer (*Rusa Marianna*) From Guam, Marianna Islands, USA. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 11: 36-40. DOI: 10.1016/j.vprsr.2017.11.010
- Manterola C., Otzen T. 2014. Estudios Observacionales. Los Diseños Utilizados con Mayor Frecuencia en Investigación Clínica. *Int. J. Morphol.*, 32(2):634-645.
- Ndung'u L.W., C Aguirre., Rurangirwa F.R., McElwain T.F., McGuire T.C., Knowles D.P., Palmer G.H.1995 Detection of Anaplasma ovis infection in goats by major surface protein 5 competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *journal of clinical microbiology*, p. 675–679.
- Ojeda-Chi MM, Rodriguez-Vivas RI, Esteve-Gasentb MD, Pérez de León A, Modarellid,JJ, Villegas-Perez S. 2019. Molecular detection of rickettsial tick-borne agents in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus yucatanensis*), mazama deer (*Mazama temama*), and the ticks they host in Yucatan, Mexico. *Ticks and Tick-borne Diseases.* 10(2):365-370.

- Palomar A.M., Portillo, A., Santibáñez, P., mazuelas, D., Roncero, L., García-Álvarez, L., Santibáñez, S., Gutiérrez, Ó. & Oteo, J.A. 2015, "Detection of tick-borne *Anaplasma bovis*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma centrale* in Spain", *Medical and Veterinary Entomology*, 3: 349-353.
- Parola P., Raoult D. 2001. "Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe", *Clin. Microbiol. Infect.* 7 80–83.
- Pérez-Arellano, J.L., Bolaños-Rivero, M., Fernández-Soto, P., Muro, A. 2010, "Artrópodos y enfermedades", *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada acreditado*, vol. 10, no. 55, pp. 3747-3756.
- Rodríguez-Vivas R.I., Rosado-Aguilar J.A., Ojeda-Chi M.M., Pérez-Cogollo. L.C., Trinidad-Martínez I.T., Bolio-González M.E. 2014 Control Integrado de Garrapatas en la Ganadería Bovina 1:295-308.
- Rodríguez-Vivas RI, Ojeda-Chi MM, Rosado-Aguilar JA, Trinidad-Martínez IC, Torres-Acosta JFJ, Ticante-Perez V, Castro-Marín JM, Tapia-Moo CA, Vázquez-Gómez A. 2013. Red Deer (*Cervus Elaphus*) as a Host for the Cattle Tick *Rhipicephalus Microplus* (Acari: Ixodidae) in Yucatan, Mexico. *Exp Appl Acarol.* 60 (4), 543-52. DOI: [10.1007/s10493-013-9672-z](https://doi.org/10.1007/s10493-013-9672-z)
- Rymaszewska A., Grenda S. 2008. "Bacteria of the genus *Anaplasma* characteristics of *Anaplasma* and their vectors" review, *Veterinarian Medicine*, 53: 573–584.
- Sala J.M., Zimmer P., Caspe G. 2015 Cómo prevenir la Anaplasmosis Bovina <http://www.todoagro.com.ar/noticias/nota.asp?nid=29778>.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2da Edition, Cold spring harbor laboratory press.
- Sánchez L.L., M.Sc., Mattar.S., V. Ph.D., González T. M. 2009 Cambios Climáticos y Enfermedades Infecciosas: Nuevos Retos Epidemiológicos revista mvz córdoban 14:3.
- Santos P.S., Nascimento, R., Rodríguez, L.P., Santos F.A.A., Faria P.C.B., Martins J.R.S., Brito-Madurro A G., Madurro Joao M., Goulart L.R. 2012. "Functional Epitope Core Motif of the *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1a and Its Incorporation onto Bioelectrodes for Antibody Detection". 7(3).
- Silva-Iturriza A., Panier E., Reyna-Bello A., Perrone T., Aso P. 2013. "Evaluación Parasitológica y Serológica de Infecciones Hemotrópicas en Venados de Cola Blanca (*Odocoileus virginianus*) en Venezuela" *Revista Científica, FCV-LUZ II*, Nº 1, 37 – 41.
- Stokka, G.L., Falkner, R., Van Boening, J. 2000. *Anaplasmosis*. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service. Obtenido en Enero del 2013 en <http://www.ksre.ksu.edu/bookstore/pubs/MF2212.pdf>.

- Tana-Hernández L., Navarrete-Arroyo K., Ron-Román J., Reyna-Bello A. Chávez-Larrea M. A. 2017. "PCR-diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle populations of Ecuador and its molecular identification through sequencing of ribosomal 16S fragments" BMC Veterinary Research BMC series open, inclusive and trusted Brayton K. A. 2012. "Tick Transmission of *Anaplasma marginale*". Rev Mex Cienc Pecu. 3:41-50.
- Torioni E.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 an endemic region using nested PCR and recombinant MSP5-cELISA". Clin Microbiol.36: 777-782.
- Tylewska-Wierzbanowska S., Chmielewski T., Kondrusik M., Hermanowska-Szpakowicz T., Sawicki W., Sulek K. 2001. "First cases of acute human granulocytic ehrlichiosis in Poland". European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 20, 196–198.
- Yasini SP, Khaki Z., Rahbari S., Kazemi B., Salar-Amoli J., Gharabaghi A. 2012. "Hematologic and clinical aspects of experimental ovine anaplasmosis caused by *Anaplasma ovis* in Iran". Iran J Parasitol; 7: 91-8.
- Zaugg, J. L. 1988, "Experimental Anaplasmosis in mule deer: Persistence of Infection of *Anaplasma marginale* and Susceptibility to a. ovis" Journal of Wildlife Diseases, 24: 120-126.
- Zivkovic, Z., Nijhof, A.M., de la Fuente, J., Kocan, K.M., Jongejan, F. 2007. Experimental transmission of *Anaplasma marginale* by male *Dermacentor reticulatus*. BMC Vet Res. 3: 32.