

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

Colegio en Ciencias Agropecuarias

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Maestría en Ciencias Agropecuarias



TESIS:

“DETERMINACIÓN DE *Mycoplasma haemocanis* EN SANGRE DE CANINOS DE CULIACÁN, SINALOA, MÉXICO.”

Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA:

MVZ. NOYRA CRISTINA CORONA SOTO

DIRECTORA:

DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

CO-DIRECTORA:

DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

ASESORES:

DRA. NOHEMÍ CASTRO DEL CAMPO

DR. MARIO CÉSAR RUBIO ROBLES

DR. ARNULFO MONTERO PARDO

Culiacán, Sinaloa, México; a 21 enero de 2020

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **NOYRA CRISTINA CORONA SOTO**, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTORA

DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

CODIRECTORA

DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

ASESORA

DRA. NOHEMÍ CASTRO DEL CAMPO

ASESOR

DR. MARIO CÉSAR RUBIO ROBLES

ASESOR

DR. ARNULFO MONTERO PARDO

CULIACÁN, SINALOA, A 21 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 Noyra Cristina Corona Soto, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias, con número de cuenta 850025, de la Unidad Académica Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la UAS, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Idalia Enríquez Verdugo y del Dr. Soila Maribel Gaxiola Camacho y cede los derechos del trabajo titulado “Determinación de *Mycoplasma haemocanis* en sangre de caninos de Culiacán, Sinaloa, México”, 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

Noyra Cristina Corona Soto

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2. 1. Historia de los hemoplasmas.....	3
2. 2. Reclasificación de <i>Haemobartonella</i> spp. al género <i>Mycoplasma</i> spp.	3
2. 3. Características de los hemoplasmas	5
2. 4 Características morfológicas y moleculares de <i>Mycoplasma haemocanis</i> ...	6
2. 4. 1. Genoma y secuencias descritas de <i>Mycoplasma haemocanis</i>	7
2. 5. Patogenicidad de los hemoplasmas	8
2. 5. 1. Factores de virulencia de los hemoplasmas	10
2. 6. Infección clínico-patológica de los hemoplasmas caninos.....	10
2. 7. Hemoplasmas que afectan al perro	11
2. 8. Transmisión de <i>Mycoplasma haemocanis</i> al perro.....	11
2. 9. Epidemiología de <i>Mycoplasma haemocanis</i>	12
2. 10. Técnicas de detección de <i>Mycoplasma haemocanis</i>	13
2. 11. Antecedentes directos	14
III. HIPÓTESIS	17
IV. OBJETIVOS	18
V. MATERIAL Y MÉTODOS	19
5. 1 Tipo de estudio	19
5. 2 Sitio de muestreo	19
5. 3 Toma de muestra.....	19
5. 4 Análisis de las muestras	19
5. 4. 1 Frotis sanguíneo	20
5. 4. 2 Extracción de ADN.....	20
5. 4. 3. Amplificación del ADN por PCR.....	20
5. 4. 4 Secuenciación	21
5. 4. 5 Análisis <i>In Silico</i>	21
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
VII. CONCLUSIÓN	25
VIII. LITERATURA CITADA	27

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	TÍTULO	PÁGINA
1.	Clasificación científica de los hemoplasmas caninos.....	5
2.	Frecuencia de <i>Mycoplasma</i> spp en perros domésticos y salvajes y humanos, en latino América	12
3.	Cuadro de estudios realizados en México en perros positivos a <i>Mycoplasma</i> spp.....	15
4.	Resultados positivos a <i>Mycoplasma</i> spp. y en coinfección con otros hemoparásitos de muestras procesadas en el laboratorio de la FMVZ de la UAS.....	16
5.	Secuencia de las muestras amplificadas para la identificación de <i>Mycoplasma haemocanis</i>	24

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1.-	<i>Mycoplasma haemocanis</i> en la superficie de los eritrocitos.....	7
2.-	Estructuras compatibles a <i>Mycoplasma</i> spp. en la superficie de los eritrocitos en frotis sanguíneos teñidos por Wright y hemocolorante rápido, observadas por la técnica de microscopía óptica 100x.....	25
3.-	Amplificación de bandas de <i>Mhc</i> en gel de agarosa al 1%. Carril 1 marcadores de tamaño 100 a 1000 pb. Carriles 5, 6 y 9 Amplificación del gen 16S ARNr de <i>Mycoplasma haemocanis</i> de alrededor de 300 pb. Carriles 3, 4, 7, 8 negativos, carril 2 vacío.....	25

RESUMEN

Determinación de *Mycoplasma haemocanis* en sangre de caninos de Culiacán, Sinaloa, México.

NOYRA CRISTINA CORONA SOTO

Los hemoplasmas son parásitos que se alojan en la superficie de los eritrocitos, pudiendo infectar solo o en co-infección con otros parásitos, afectando así el estado de salud del animal. Con el objetivo de determinar la presencia de *Mycoplasma haemocanis* (Mhc) en sangre de caninos de Culiacán, Sinaloa; se muestrearon 59 perros obteniendo sangre total. Los análisis de las muestras fueron por frotis sanguíneo y por PCR con el gen 16S ARNr, se obtuvieron las secuencias y se realizó el análisis *In Silico* en el programa Blastn. De los frotis analizados por morfología se obtuvieron 13 muestras positivas a *Mycoplasma* spp.. Del proceso de PCR para la identificación con los iniciadores específicos a *Mhc*, 3 muestras amplificaron una banda de alrededor de 300 pb; de estos productos la secuencia fue de 58pb y el análisis *In Silico* tuvo una homología del 93.94%. Por lo cual se determina la presencia de *Mycoplasma haemocanis* en sangre de caninos de la ciudad de Culiacán.

Palabras claves: *Mycoplasma haemocanis*, Micoplasmas hemotrópicos, perros, Hemoplasmas.

ABSTRACT

Determination of *Mycoplasma haemocanis* in canine blood from Culiacán, Sinaloa, México.

NOYRA CRISTINA CORONA SOTO

Haemoplasmas are erythrocytes parasites, which might infect the cells alone or co-infecting with other parasites, thus affecting status health of the animal. The aim of this study is to determine presence of *Mycoplasma haemocanis* (*Mhc*) in canine blood from Culiacán, Sinaloa; 59 dogs were sample getting complete blood. The analysis of the samples was by blood smear and PCR with 16S rRNA gene, sequences were achieve and *In Silico* analysis was get by Blastn program. Of blood smears analyzed by morphology, 13 positive samples to *Mycoplasma* spp. were found. From PCR process to identify *Mhc*-specific initiators, 3 samples amplified a nearby 300 bp band, the sequence obtained by these products was 58 bp, *In Silico* analysis had a 93.94% homology. Whereby presence of *Mhc* in blood of canines from Culiacan city is determined.

Keywords: *Mycoplasma haemocanis*, *Haemobartonella*, Haemotropic Mycoplasma, dogs, Haemoplasmas.

I. INTRODUCCIÓN

Mycoplasma haemocanis (*Mhc*) es el agente etiológico de la hemoplasmosis en los perros (Kemming *et al.*, 2004). La primera descripción de este parásito fue en eritrocitos de gatos anémicos, hecha por Flint y Moss en 1953 en Estados Unidos de Norteamérica; sin embargo, los casos ocasionales de hemoplasmosis en perros fueron reconocidos en 1935 (Messick, 2003). Los hemoplasmas son bacterias Gram-negativas de tamaño pequeño, pleomórficas y sin pared celular, que no crecen *in vitro*, detectadas en la sangre de varios mamíferos, se replica por fisión binaria y se desconoce su ciclo de vida; una característica para *Mhc* es su distinción al formar cadenas con mayor frecuencia en la superficie de los eritrocitos (Soto *et al.*, 2017, Mazaheri *et al.*, 2014; Messick, 2004). Dependen estrictamente de las células del hospedador, pueden llegar a infectar a varias especies de animales (Leite *et al.*, 2016). En perros se describen dos especies: *Mycoplasma haemocanis* (*Mhc*) y *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* (*CMhp*) (Soto *et al.*, 2017). Las infecciones por hemoplasmas usualmente son desde una anemia severa a una enfermedad crónica y oculta sin signos clínicos (Maggi *et al.*, 2013; Biondo *et al.*, 2009). Los animales que generalmente se infectan por la forma oculta, se convierten en portadores y fuentes de infección (Mazaheri *et al.*, 2014). La observación microscópica de la bacteria en los frotis sanguíneos teñidos con Romanowsky, incluidos Giemsa, Wright y Wright-Giemsa, es el método más común para detectar micoplasmas, sin embargo, este método tiene una alta tasa de obtener resultados falsos positivos; el método por PCR es un diagnóstico altamente sensible, mostrando resultados más confiables (Mazaheri *et al.*, 2014). El estudio de *Mhc* se basa en la secuencia del gen de 16S ARNr, la cual fue base para su reclasificación al género *Mycoplasma* (Lira-Amaya *et al.*, 2015; Mazaheri *et al.*, 2014), con una identidad del 99% comparada con *M. haemofelis*, haciendo alusión que son el mismo organismo el cual infecta diferentes especies animales, pero al mostrar menor identidad con otros genes, indica que son especies diferentes (Guimaraes *et al.*, 2014; Tártara *et al.*, 2013; Cruz, 2005). El genoma descrito para *Mhc* es la cepa Illinois con un cromosoma circular completo de un tamaño de 919, 992 pb (do Nascimento *et al.*,

2012). *Mhc* ha sido descrita en el mundo (Leite *et al.*, 2016) y presenta una ocurrencia entre el 1.2% y 44.7%, con una tasa de coinfección del 0.5% - 2.6% con otros hemoparásitos (Soto *et al.*, 2017). En un estudio realizado en el estado de Morelos, México, se observó a *Mhc* en muestras analizadas por PCR en sangre de perro (Lira-Amaya *et al.*, 2015). No se conoce con exactitud la transmisión natural al perro (Soto *et al.*, 2017), sin embargo, se puede transmitir principalmente por artrópodos hematófagos, donde las garrapatas son el vector principal de *M. haemocanis* entre los perros (Messick, 2003). Sin embargo no ha sido definido claramente como causa de la enfermedad en humanos, pero al ser un patógeno zoonótico emergente puede plantear un problema de salud pública. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *Mycoplasma haemocanis* en sangre de caninos de Culiacán, Sinaloa, México.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2. 1. Historia de los hemoplasmas

Por primera vez en Alemania en 1928, fueron observados micoplasmas hemotrópicos en ratones y en perros; y se reportaron de manera oficial en 1930 en cerdos de Estados Unidos e identificada en ganado en 1941 (Mazaheri *et al.*, 2014). En 1934 se realizó la primera aparición documentada de micoplasmas hemotrópicos en perros (Chalker, 2005), presentando casos esporádicos en perros desde 1935, en Estados Unidos. En 1942, Clark informó la infección por micoplasmosis en sangre de un gato anémico en Sudáfrica. Flit y Moss informaron en 1953 un microorganismo que causaba anemia infecciosa en los gatos de Estados Unidos. En 1955 Flint y Mckelvie sugieren el nombre de *Haemobartonella felis*, referente a la micoplasmosis hemotrópica en gatos. En 1959 se describe una infección causante de anemia en perros por micoplasmas hemotrópicos (Messick, 2004). Alrededor del año 2000 se seguía nombrando por el término *Haemobartonella* spp al patógeno, llamándolo actualmente como micoplasmas hemotrópicos o hemoplasmas (Mazaheri *et al.*, 2014; Messick, 2003).

2. 2. Reclasificación de *Haemobartonella* spp. al género *Mycoplasma* spp.

En 1997 se informa por primera vez las secuencias del 16S ARNr de *Haemobartonella* spp mediante PCR, comparando la secuencia con unas de bacterias conocidas, mostrando poca similitud con la de otros organismos rickettsiales, indicando una estrecha relación con *Mycoplasma* spp (Messick, 2004; 2003). El género *Mycoplasma* se reclasificó con base en las secuencias del gen 16S ARN ribosomal (Lira-Amaya *et al.*, 2015). Estas bacterias hemotrópicas se clasificaron como miembros de la familia *Anaplasmataceae* del orden Rickettsiales (Cruz, 2005; Kenny *et al.*, 2004; Neimark *et al.*, 2002). Esta organización se basó en su pequeño tamaño, propiedad de tinción de Gram negativa y aparente parasitismo obligado de los glóbulos rojos (Messick, 2003). La supuesta transmisión de especies de *Haemobartonella* por artrópodos hematófagos, también estaba en relación con su clasificación rickettsial; sin embargo, existe la sospecha de que estos parásitos están estrechamente

relacionados con los organismos micoplasmáticos; esto se basaba principalmente en su falta de pared celular y flagelos (Cruz, 2005; Messick, 2003). Los genes de las especies *Haemobartonella* tienen poca similitud de secuencias del gen 16S ARNr de organismos rickettsiales; están más estrechamente relacionados con parásitos sin paredes celulares de la clase Mollicutes (piel: suave) (Messick *et al.*, 2004; Messick, 2003; Neimark *et al.*, 2002). Sobre la base de su relación molecular y características fenotípicas (tamaño pequeño de la bacteria y su genoma, falta de pared celular y flagelos, resistencia a la penicilina y sus análogos, y susceptibilidad a la tetraciclina) (Neimark *et al.*, 2002). Los géneros *Haemobartonella* fueron eliminados de la orden Rickettsiales, colocándolos en la clase Mollicutes, donde definen un nuevo grupo de parásitos de glóbulos rojos en el género *Mycoplasma* (Guimaraes *et al.*, 2014; Suárez, 2011; Messick, 2003). Los nombres de los parásitos que infectan al gato y al perro cambiaron; el aislante de Ohio (forma grande) de *H. felis* del gato y *H. canis* del perro se transfirieron al género *Mycoplasma* como *Mycoplasma haemofelis* y *Mycoplasma haemocanis*, respectivamente. Por el contrario, el aislado de California (forma pequeña) de *H. felis* del gato se designó *Candidatus M. haemominutum* (Messick, 2003; Neimark *et al.*, 2002). La designación de *Candidatus* se agregó aquellos hemoplasmas que fueron descritos recientemente e incompletos (Messick, 2004; 2003). El nombre de hemoplasmas o micoplasmas hemotrópicos se le designó a este nuevo grupo de micoplasmas que se dirigen a los glóbulos rojos (Mazaheri *et al.*, 2014), separando el género *Mycoplasma* en dos grupos, el de neumonía (micoplasmas de mucosas) y el de los hemoplasmas, debido a las diferencias en características filogenéticas y propiedades biológicas específicas (Grazziotin, 2011; Peters *et al.*, 2008; Messick, 2004; 2003). En el siguiente cuadro se muestra la clasificación de la bacteria:

Cuadro 1. Clasificación científica de los hemoplasmas caninos (Suaréz, 2011).

CLASIFICACIÓN	MICROORGANISMO	
Reino	Bacteria	
Filo	Tenericutes	
Clase	<i>Mollicutes</i>	
Orden	<i>Mycoplasmateles</i>	
Familia	<i>Mycoplasmataceae</i>	
Género	<i>Mycoplasma</i>	<i>Candidatus Mycoplasma</i>
Especie	<i>haemocanis</i>	<i>haematoparvum</i>

2. 3. Características de los hemoplasmas

Los micoplasmas son pertenecientes a la Clase *Mollicute* y se caracterizan por carecer de pared celular o precursores químicos del peptidoglucano, presentando formas pleomórficas; la familia *Mycoplasmataceae* requiere de colesterol para su crecimiento, algunos hidrolizan urea, oxidan ácidos grasos de cadenas cortas a través de la beta-oxidasa o degradan azúcares durante sus procesos glucolíticos (Rivera-Tapia *et al.*, 2001). Los micoplasmas hemotrópicos no se han cultivado *in vitro* y sus características ultraestructurales no son típicas de las bacterias, falta de pared celular, falta de flagelos, resistencia a la penicilina y sus análogos, y susceptibilidad a las tetraciclinas, llegan a tener un tamaño aproximado de 0.3-0.8 μm y pasan fácilmente por membranas de 450 y 300 nm (Chalker, 2005; Messick, 2004). Los micoplasmas hemotrópicos contienen ARN y ADN circular bicatenario que incluye la información necesaria para la síntesis de proteínas esenciales, se replican mediante fisión binaria intracitoplasmática y se desconoce su ciclo de vida (Pérez e Iglesias, 2017; Ortiz *et al.*, 2015; Mazaheri *et al.*, 2014). Dentro de sus características morfológicas se pueden observar mediante luz como organismos redondos o alargados de 0.3 a 3 μm de diámetro, y encerrados por una única membrana limitante, sin núcleo, con pequeños gránulos y algunas estructuras filamentosas en el citoplasma; se adhieren a los eritrocitos sin penetrarlos, encontrándolos en depresiones superficiales e inflorescencias profundas en las superficie, con una zona despejada de 15 a 25 nm entre la

bacteria y el eritrocito, sus fimbrias delgadas de la bacteria parecen extenderse a través de esta zona clara, uniéndose así al eritrocito; aunque por sus características les permite infestar a los eritrocitos, también pueden infestar los tejidos reproductivos, una manifestación importante de infección crónicas (Mazaheri *et al.*, 2014; Messick, 2004).

2. 4 Características morfológicas y moleculares de *Mycoplasma haemocanis*

Son pequeñas bacterias pleomórficas que parasitan los glóbulos rojos de una amplia gama de animales vertebrados, con un genoma tan pequeño de 745 kb, son organismos Gram-negativas (Mazaheri *et al.*, 2014; Messick, 2004). Las características morfológicas de *Mhc* se distinguen por formar cadenas con mayor frecuencia (Pérez e Iglesias, 2017), se presentan en forma de varilla, esféricas o en forma de anillo y se encuentran individualmente o en cadenas a través de la superficie de los glóbulos rojos (Figura 1) (Mazaheri *et al.*, 2014; Messick, 2004). El ADN de esta especie se extrajo de perros con bacteriemia (Mazaheri *et al.*, 2014). Cruz (2005) menciona que el gen 16S ARNr de *Mycoplasma haemocanis* es homólogo en un 99% con *Mycoplasma haemofelis*, incluso en algunos aislados de esta bacteria son más similares a *Mycoplasma haemocanis*, por lo que se alude a que son el mismo organismo infectando a diferentes especies animales, sin embargo otros genes mostraron menor identidad, lo que sugiere que son especies diferentes (Guimaraes *et al.*, 2014; Tártara *et al.*, 2013; Cruz, 2005).

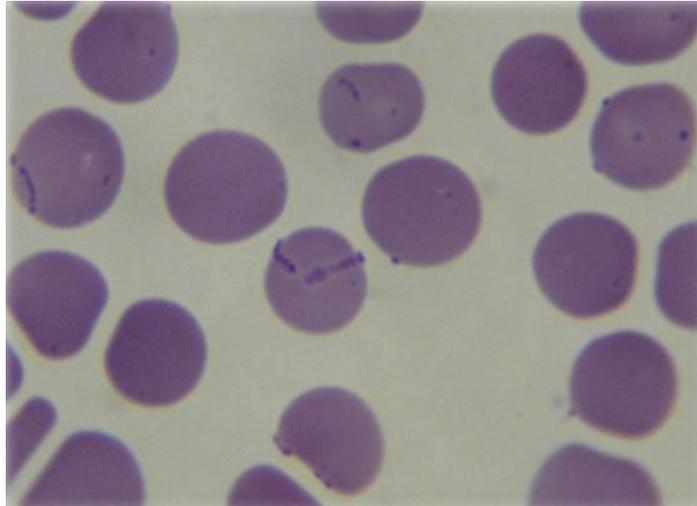


Figura 1. *Mycoplasma haemocanis* en la superficie de los eritrocitos (coloración: Diff-Quick, $\times 1000$) (Beaufils, 2012).

2. 4. 1. Genoma y secuencias descritas de *Mycoplasma haemocanis*

El genoma descrito para *Mycoplasma haemocanis* cepa Illinois se encuentra en GenBank con número de acceso CP003199. La secuencia tiene 15,700,000 millones de pares de bases lectura filtrada de alta calidad con una longitud de lectura promedio de 2,100 nucleótidos y una cobertura equivalente a 3,400 genomas; el cromosoma circular completo tiene un tamaño de 919,992 pb y un contenido de G+C del 35%, características genómicas compatibles con otras especies de hemoplasmas secuenciadas; *Mycoplasma haemocanis* utiliza el codón de parada opal (UGA) para triptófano. Los genes 16S, 23S y 5S ARNr están presentes como copias individuales y comparten el mismo operón. La notación del genoma sugiere la presencia de 1,157 secuencias de codificación de proteínas pronosticadas (CDS) 31 ARN t; la mayoría de los CDS están representados como proteínas hipotéticas (76%), que podrían estar relacionados con un gran repertorio de genes parálogos; mediante la recombinación de estos genes, *Mhc* puede variar sus antígenos de superficie para evadir con éxito el sistema inmune del huésped. Como se sugirió para otros hemoplasmas, es probable que *Mhc* aproveche el metabolismo de los glóbulos rojos al eliminar los nutrientes, lo que conduce a una

disminución de la vida útil de los glóbulos rojos y agravar la anemia durante la enfermedad aguda (do Nascimento *et al.*, 2012).

Las secuencias descritas para *Mycoplasma haemocanis* con los genes 16S, 23S y 5S, de las cuales encuentran reportadas en GenBank, solo dos presentan una secuencia completa, que son: *Mycoplasma haemocanis* cepa Illinois gen 23S ARNr con 2,898 pb, con número de acceso: NR_076944.1 y *Mycoplasma haemocanis* str. Illinois cepa Illinois gen 5S ARNr con 114 pb, con número de acceso: NR_075963.1; las secuencias descritas con el gen 16S, fueron de secuencias parciales y una en conjunto con el gen 23S con número de acceso: KJ858514.1. (GenBank, 2019).

2. 5. Patogenicidad de los hemoplasmas

Los hemoplasmas afectan principalmente a los animales (Messick, 2004). Estas bacterias no se encuentran en el ambiente y se transmite principalmente por artrópodos infectados; los hemoplasmas al perder su pared celular y sistemas biosintéticos durante su evolución, solo parte de su genoma es importante al proporcionar características de transcripción, traducción y síntesis de proteínas, conteniendo una molécula de ADN circular de doble cadena con la información que necesita para la síntesis de proteínas esenciales; estos pueden contener genes específicos que lo protegen contra el estrés oxidativo y aumentar la biosíntesis de aminoácidos en un microorganismo (Mazaheri *et al.*, 2014; Messick, 2004). Los hemoplasmas parasitan los eritrocitos por medio de adhesinas, lo cual conduce a pérdida de colesterol y fosfolípidos que alteran su osmolaridad y morfología (Ortiz *et al.*, 2015). La vida media de los eritrocitos infestados se reduce, debido a la destrucción y eliminación temporal en la circulación durante el secuestro por el sistema fagocítico mononuclear, en especial por el bazo; el daño de los hemoplasmas realizado a la superficie de los eritrocitos de manera mecánica, afecta directo a la membrana por las erosiones de la superficie, alterando las concentraciones de lípidos para aumentar la fragilidad de la membrana y que surja un rompimiento de esta, de igual forma provocando hemólisis intravascular (respuesta inmune directa) o extravascular (fagocitosis en

bazo) (Barker y Tasker, 2013). Algunos de los mecanismos mencionados sobre patogenicidad de los hemoplasmas son: producción de radicales libres para el daño de la membrana celular en el huésped, agotamiento de nutrientes, liberación de precursores biosintéticos provenientes de la célula dañada, alteración del sistema inmunológico por provocar auto anticuerpos, codificación de antígenos que se unen a las principales moléculas del MHC (complejo mayor de histocompatibilidad), estimulando a un gran número de linfocitos, activación de linfocitos, producción de citocinas inflamatorias, proteínas que ayudan a la unión de la bacteria a la membrana de la célula (Mazaheri *et al.*, 2014; Messick, 2004). Con la capacidad de establecer infecciones crónicas, falla de la respuesta inmune del hospedador, así como con los tratamientos otorgados (Messick, 2004). Los animales con eritrocitos infestados por hemoplasmas, al ser o no captados por macrófagos en el bazo, crean nuevos ciclos de multiplicación, elevando la parasitemia y modificando el hematocrito (Cabazas, 2008). El bazo cumple un papel fundamental en la eliminación de los eritrocitos infestados, por lo cual sin él, se dificulta el control de la bacteria en el hospedador (Tártara *et al.*, 2013). Tiene un periodo de incubación de 1 a 5 semanas, el término de un tratamiento no garantiza que el animal obtenga inmunidad contra una reinfección (Ortiz *et al.*, 2015). La enfermedad tiene cuatro etapas: 1) etapa de preparasitemia: no se muestran signos, ni parásitos; 2) en la etapa aguda: la presencia de la bacteria aumenta en sangre y se manifiestan los signos clínicos, también se presenta una variación en la cantidad de bacterias que circulan en sangre que va desde un 90% a ningún eritrocito infectado, ocurriendo en menos de una hora (se desconoce el motivo de tales hechos), con un hematocrito en recuperación, se ha acordado que los hemoplasmas llegan a ser secuestrados por el bazo o pulmón; 3) en la etapa de recuperación, en el caso que se haya presentado anemia, se puede presenciar la bacteria en sangre; 4) en la etapa de portador el perro presenta un hematocrito normal sin manifestar enfermedad y las bacterias es posible detectarlos en frotis, si no se observan, es debido a la capacidad de la bacteria de cambiar de antígenos de superficie con efecto de no adhesión en el eritrocito; con esta capacidad de la bacteria se puede iniciar un nuevo ciclo de infección. (González,

2014; Cabazas, 2008; Cruz, 2005). Los mecanismos de patogenicidad de los hemoplasmas aún no se han definido por completo (Messick, 2004).

2. 5. 1. Factores de virulencia de los hemoplasmas

Existe una variedad de factores de virulencia en los hemoplasmas, los cuales provocan infecciones más graves en el perro, que incluyen toxinas y citolisinas. En una revisión realizada por Mazaheri *et al.* (2014) mencionan que se han investigado dos genes que se asocian a los factores de virulencia, el primero llamado gen asialoglicoproteína dipeptidasa, enzima involucrada en la lisis de los glóbulos rojos; el segundo, el gen superóxido dismutasa, el cual protege contra daños causados por oxidantes. Al no ser captados por el bazo, los eritrocitos infectados regresan a circulación, aumentando el nivel de parasitemia en el animal, los hemoplasmas al estar unidos a los eritrocitos conlleva a una pérdida del colesterol y fosfolípidos, afectando la osmolaridad y morfología, acentuando la fragilidad de los eritrocitos infectados, causando hemólisis, provocando la aparición de la enfermedad. Esta afección en la membrana ocasiona que algunos antígenos de superficie se oculten y aparezcan otros, generando una reacción antígeno-anticuerpo-complemento, aumentando la hemólisis (Ortiz *et al.*, 2015; Cabazas, 2008).

2. 6. Infección clínico-patológica de los hemoplasmas caninos

La enfermedad incluye signos leves, excepto pacientes esplenectomizados que muestran pérdida de apetito, encías pálidas e infertilidad (Mazaheri *et al.*, 2014). La presentación de los signos en etapa aguda se caracteriza por: anemia, que de manera continua se despliega, mostrándose mayormente en perros inmunocomprometidos o esplenectomizados, además de la anemia otros signos son: esplenomegalia, pirexia, mucosas pálidas o ictericas, depresión, debilidad, letargo, anorexia, pérdida de peso y artritis (Aktas y Ozubek, 2018; Mazaheri *et al.*, 2014; Cabazas, 2008; Chalker, 2005; Chalker y Brownlie, 2004), durante esta fase se observa una marcada bacteriemia con un 90% de eritrocitos infestados (Maggi *et al.*, 2013). En casos más graves, se produce anemia hemolítica aguda,

que generalmente se resuelve, sin embargo, en algunos perros esto puede llegar hasta la muerte (Aktas y Ozubek 2018; Chalker, 2005; Chalker y Brownlie, 2004). Las enfermedades por hemoplasmas en animales sanos siguen un curso crónico, con manifestaciones clínicas variadas (Messick, 2004). El diagnóstico en perros puede ser posible por los veterinarios a través de la historia clínica, pruebas bioquímicas, serológicas, frotis sanguíneo y pruebas moleculares (Mazaheri *et al.*, 2014).

2. 7. Hemoplasmas que afectan al perro

Los micoplasmas hemotrópicos que infectan a los perros son dos tipos: *Mycoplasma haemocanis* y *Candidatus M. haemotoparvum* (CMhp) (Hii *et al.*, 2012). Aunque también se han descrito otras especies: *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, *Candidatus Mycoplasma turicensis* y *Mycoplasma ovis* (Valle *et al.*, 2014).

2. 8. Transmisión de *Mycoplasma haemocanis* al perro

No se conoce con exactitud la transmisión natural al perro, sin embargo, se ha demostrado que la transmisión puede producirse principalmente por artrópodos hematófagos, siendo las garrapatas el vector principal de *M. haemocanis* entre los perros; llegando ser una transmisión transestadial y transovárica (Soto *et al.*, 2017; Beaufils, 2012; Messick, 2003). Existen por lo tanto diferentes maneras transmisión de la bacteria como: iatrogénica por jeringas reutilizadas, transfusiones, peleas (Cabazas, 2008) y de madre a cría, siendo posible la transmisión por vía transvaginal (con contacto de sangre durante el parto) o transmamaria, siendo así el perro un reservorio (Lashnits *et al.*, 2019). Beaufils (2012) demostró de manera experimental, la transmisión de *M. haemocanis* por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*; así como también, la transmisión de manera transestadial y transovárica entre garrapatas de esta especie. Estudios realizados en China respaldan un mayor riesgo de infección por micoplasmas hemotrópicos entre los agricultores, veterinarios y otras personas con contacto frecuente y cercano a animales domésticos y artrópodos (Maggi *et al.*, 2013). Existiendo una

alta prevalencia de hemoplasmas en donde las condiciones ambientales son favorables para los vectores que los transmiten (Biondo *et al.*, 2009).

2. 9. Epidemiología de *Mycoplasma haemocanis*

Los micoplasmas hemotrópicos que infectan al perro tienen una distribución mundial, contando con una ocurrencia entre el 1.2% - 44.7%, donde la prevalencia en perros varía entre el 0.48% y 44.7% para *Mycoplasma haemocanis* y 0.3% a 33.3% para *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*, los datos fueron obtenidos de varios estudios realizados por PCR de diferentes países de Europa 206/1621, Asia 372/907, África 192/578, América 555/2166 y tiene una tasa de coinfección del 0.5% - 2.6% (Soto *et al.*, 2017). En Latinoamérica se presenta una ocurrencia del 117.7% de hemoplasmas en caninos, y entre los países que lo reportan son Argentina, Brasil, Islas del caribe, Chile, Ecuador y México (Cuadro 2) (Maggi y Krämer, 2019; Lira-Amaya *et al.*, 2015; Martínez *et al.*, 2003).

Cuadro 2. Frecuencia de *Mycoplasma* spp en perros domésticos y salvajes y humanos, en latino América (Maggi y Krämer, 2019; Lira-Amaya *et al.*, 2015; Martínez *et al.*, 2003).

País	Hospedador	Frecuencia
Argentina	Perros	48.5%
	Carnívoros salvajes	
Brasil	Perros	17.7%
	Humanos	
	Carnívoros salvajes	
Islas del caribe	Perros	34.7%
Chile	Carnívoros salvajes	16.2%
Ecuador	Perros	1%
México	Perros	72.2%

2. 10. Técnicas de detección de *Mycoplasma haemocanis*

La observación microscópica de los frotis sanguíneos es el método más común de detectar micoplasmas. El frotis de sangre se puede teñir con tintes como Romanowsky, incluidos Giemsa, Wright y Wright-Giemsa. La observación microscópica demuestra la presencia de bacterias en pares o cadenas en la superficie de los eritrocitos, pero raramente libres en el plasma. Sin embargo, este método tiene una alta tasa de obtener resultados falsos positivos. Esto puede ser debido a los sedimentos del tinte causado por manchas o fijación inadecuada puede confundirse con la bacteria. Otros errores incluyen gotas de agua y cuerpos de Howell-Julie y Heimer-Papen. Para la observación por microscopio fluorescente, se utilizan los métodos de tinción con Acridina naranja y con anticuerpo fluorescentes; sin embargo, ambos métodos son más sensibles para detectar bacterias que los tintes Romanowsky. No obstante, los cuerpos de Howell-Julie pueden confundirse con las bacterias y causar resultados falsos positivos. Aunque en fases agudas la bacteria está en la sangre, puede eliminarse de sangre en pocas horas, resultando una muestra como falso negativo. El uso de anticoagulantes en muestras de sangre y re muestreo reduce los resultados falsos negativos. Si se usa EDTA altamente concentrado, las bacterias pueden separarse de los eritrocitos. Por eso es mejor realizar el frotis inmediatamente después del muestreo de sangre o usar otros anticoagulantes como EDTA. Aunque los estudios serológicos no son el método de diagnóstico de rutina (Mazaheri *et al.*, 2014), se han empleado para la detección antígenos de *Mycoplasma haemofelis*, sugiriendo la posibilidad de desarrollo de una prueba serológica en base de uno o más antígenos, sin embargo, todavía se debe trabajar en determinar que antígenos son reconocidos por el suero inmune de animales infectados con organismos estrechamente relacionados, dado a su sensibilidad y especificidad de antígenos particulares en la detección de animales infectados sigue siendo desconocida (Alleman *et al.*, 1999). El método por PCR es un diagnóstico altamente sensible que amplifica ciertos fragmentos del ADN para identificar los microorganismos, los estudios han demostrado que las tasas de diagnóstico de citopatología y PCR son de casi 37.5 y 100%, con el gen 16S

ARNr; el PCR muestra resultados más confiables después de completar de tres a 35 días de tratamiento con antibióticos, por lo general, los resultados de PCR pueden permanecer positivos durante mucho tiempo en animales asintomáticos; los resultados positivos no siempre reflejan la aparición de síntomas clínicos, pero pueden mostrar infecciones previas (Mazaheri *et al.*, 2014). La técnica de Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP) es una alternativa a la PCR para la detección de hemoplasmas, debido a que su sensibilidad es mayor, ya que para la amplificación de ADN usa una incubación de velocidad constante en lugar de ciclos térmicos, la turbidez causada por el pirofosfato de magnesio se puede detectar en la reacción por fotómetro para detectar productos amplificados; LAMP es una herramienta de diagnóstico simple de enfermedades y estudios epidemiológicos (Mazaheri *et al.*, 2014).

2. 11. Antecedentes directos

En varias partes del mundo se han realizado estudios enfocados en la detección de micoplasmas hemotrópicos en perros, donde han usado tres tipos de técnicas, siendo el PCR el más utilizado para la detección de hemoplasmas, con el gen 16S ARNr, como se muestran en los estudios hechos por Viera *et al.* (2015) con 44.7%, Novacco *et al.* (2010) con 40%, Soto *et al.* (2017) con 24.8%, Torkan *et al.* (2012) con 23%, Valle *et al.* (2014) con 6.9%, Compton *et al.* (2012) con 1.3% y Hamel *et al.* (2012) con 1.2%, positivos a *Mhc*.

En Latinoamérica existen bajos reportes de hemoplasmas (Maggi y Krämer, 2019), en México son contados los estudios que se han realizado, Lira-Amaya *et al.* (2015) en su estudio obtuvo el 66.6% en perros positivos a *Mycoplasma spp.*, y Martínez *et al.* (2003) con el 72.6% (Cuadro 3).

Cuadro 3. Cuadro de estudios realizados en México en perros positivos a *Mycoplasma* spp.

AUTORES	MUESTRAS	ANÁLISIS	GEN	RESULTADOS
CD. De México Osorno y Ristic (1973)	3 perros	Esplenectomía Inoculación Microhematocrito Frotis sanguíneo	—	Se reportó presencia y reproducción de <i>Haemobartonella canis</i>
Boca del Río, Veracruz Martínez <i>et al.</i> (2003)	252 perros	Frotis sanguíneo	—	183 perros positivos
Cuautla, Morelos Lira-Amaya <i>et al.</i> (2015)	30 perros	PCR Frotis sanguíneo	16S ARNr	20 perros positivos

En el estado de Sinaloa, en la ciudad de Culiacán Gaxiola *et al.* (1996) realizaron un estudio de prevalencia de *Babesia* spp. y *Haemobartonella* spp. en perros, observando por frotis sanguíneo la presencia de hemoplasmas en los eritrocitos. Algunos reportes de diagnóstico de *Mycoplasma* spp. en coinfección con otros microorganismos se han realizado en el Laboratorio de Parasitología de la FMVZ de la UAS (Cuadro 4), donde del 2007 al 2018 se ha observado el 4.8% del microorganismo como monoinfección y el 21.8% como coinfección.

Cuadro 4. Resultados positivos a *Mycoplasma spp.* y en coinfección con otros hemoparásitos de muestras procesadas en el laboratorio de la FMVZ de la UAS.

Año	Muestras	<i>Mycoplasma spp.</i>
2007	127	11%
2008	704	8.4%
2009	623	10.3%
2010	495	4.2%
2011	384	3%
2012	515	2.3%
2013	705	3.4%
2014	243	1.6%
2015	457	0.9%
2016	300	2%
2017	198	5%
2018	225	3.6%
Total	4976	4.8%

Algunas especies de hemoplasmas encontradas en perros, también han sido observadas en humanos y otros animales (Viera *et al.*, 2015; Maggi *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2009; Chalker, 2005); Viera *et al.* (2015) en su estudio detectaron *Mycoplasma spp* en una persona, Maggi *et al.* (2013) mostraron que las personas con más cercanía animales y a sus ectoparásitos, tienen más posibilidad de infección, más si son personas que trabajan con animales, como lo son veterinarios, técnicos veterinarios y personas cercanas a ellos, Hu *et al.* (2009) mencionan la transmisión vertical de madres a fetos. De acuerdo al Diario Oficial de la Federación, *Mycoplasma spp.* se encuentra dentro de las enfermedades de notificación obligatoria (DOF, 2019).

III. HIPÓTESIS

Mycoplasma haemocanis se encuentra presente en sangre de los caninos de la ciudad de Culiacán, Sinaloa, México.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de *Mycoplasma haemocanis* en sangre de caninos de Culiacán, Sinaloa, México.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Identificar morfológicamente *Mhc* en sangre de caninos.
- 2) Caracterizar genéticamente *Mhc* en sangre de caninos.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5. 1 Tipo de estudio

Observacional, transversal por conveniencia (Manterola y Otzen, 2014).

5. 2 Sitio de muestreo

El presente trabajo se realizó en la ciudad de Culiacán, Sinaloa, México, localizada entre los paralelos 24° 2' 4.92" y 25° 16' 33.6" latitud norte y los meridianos 107° 49' 22.8" y 106° 52' 15.6" longitud oeste; altitud entre 2,100 m., con rango de temperatura de 18-26°C y rango de precipitación de 400-1100 mm., con clima seco muy cálido y cálido (37.40%), semiseco muy cálido y cálido (31.96%), cálido subhúmedo con lluvias en verano de humedad media (29.11%), cálido subhúmedo con lluvias en verano de menor humedad (1.49%), y semicálido subhúmedo con lluvias en verano de menor humedad (0.04%), (INEGI, 2019).

Las muestras de sangre fueron donadas de diferentes clínicas veterinarias de la ciudad de Culiacán, las cuales fueron: hospital de pequeñas especies de la FMVZ, y veterinarias cooperantes, así como algunas muestras que dieron positivas o con cuerpos sugerentes a hemoplasmas, analizadas en el Laboratorio de parasitología de la FMVZ.

5. 3 Toma de muestra

El muestreo se realizó durante el año 2018, entre los meses de junio y noviembre, obteniendo 59 muestras sanguíneas de perros. La sangre se obtuvo mediante la punción de la vena cefálica de la extremidad anterior o de la vena safena de la extremidad posterior y/o de la yugular, se depositaron en tubos Vacutainer® con EDTA, previamente identificados y se conservaron a 4°C, hasta su procesamiento.

5. 4 Análisis de las muestras

Los análisis de cada muestra fueron realizados en el laboratorio de la FMVZ.

5. 4. 1 Frotis sanguíneo

Se realizaron dos extensiones sanguíneas de cada muestra, se tiñeron con tinción de Wright y hemocolorante rápido, posteriormente se observaron por técnica de microscopía óptica 100x (Martínez *et al.*, 2003).

5. 4. 2 Extracción de ADN

Se extrajo el ADN de las muestras de sangre de los caninos muestreados, por medio de la técnica fenol-cloroformo, utilizando 300 µl de sangre completa de caninos, colocando cada muestra en tubos Eppendorf de 1.5 ml, a los cuales se les agregó amortiguador de lisis (TE: tris 100mM y EDTA 10mM), dodecilsulfato de sodio (SDS) al 20%, se incubaron a 37°C con calor seco y a 56°C a calor húmedo por una hora respectivamente. Se agregó fenol (1:1), se centrifugaron por dos min a 12,000 RPM, se obtuvo el sobrenadante y se añadió cloroformo (1:1), se centrifugaron por dos min a 12,000 RPM se obtuvo el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol, se refrigeraron a -20°C durante 2 h (20 min a -80°C), posteriormente se centrifugaron por 20 min a 12,000 RPM, se decantó el sobrenadante y se ventiló en la cámara de extracción. A la pastilla obtenida se le agregó 50 µl de agua inyectable estéril (Green y Sambrook, 2012), de esta solución de ADN se tomó 5 µl y se homogenizó con 2 µl de azul de bromo fenol para detectar la presencia de ADN, en un gel de agarosa al 1% teñido con gel red revelado en cámara de electroforesis a 80 V, 250 mA durante 30 min y se observó con luz ultravioleta (Huang, 2010).

5. 4. 3. Amplificación del ADN por PCR

La amplificación del ADN obtenido se realizó por PCR en un termociclador (BIO-RAD Icyler), con una mezcla de reacción a un volumen de 25 µl que contenía la enzima Polimerasa Go Taq Green Master Mix, 2X (PROMEGA) 50 pM de cada oligonucleótido y aproximadamente 100 ng de ADN genómico. Se procedió a la detección de la especie *Mhc* mediante la amplificación de la porción variable del gen 16S ARNr (309pb) utilizando un conjunto de oligonucleótidos, sentido (5'-GAAACTAAGGCCATAAATGACGC-3') y anti-sentido (5'-

ACCTGTCACCTCGATAACCTCTAC-3') (Aktas y Ozubek, 2018); bajo las condiciones de ciclado a: 94°C durante 5 min, seguidos por 32 ciclos a 94°C durante 1 min, recocado a 60°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min, con un paso de extensión final a 72°C durante 5 min (Torkan *et al.*, 2012).

5. 4. 4 Secuenciación

Las muestras positivas resultantes de la amplificación por PCR de los genes 16S ARNr, fueron secuenciadas mediante el sistema 3730XL Applied Biosystems®, en la empresa MacroGen inc., Seul, Korea: <http://www.bionity.com/en/companies/16588/macrogen-inc.html>.

5. 4. 5 Análisis *In Silico*

El análisis *In Silico* de las secuencias genéticas obtenidas se llevó a cabo en el programa en línea BLASTn: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearchs, donde se comprobaron las identidades de las secuencias amplificadas.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis por microscopia permitió identificar el 24.5% (13/53) de las muestras positivas a *Mycoplasma* spp. en frotis sanguíneo, observándose sobre los eritrocitos en forma individual o cadena (Figura 2), el 38.4% (5/13) de las muestras positivas, pertenecían a perros con signos clínicos y el 30.7% (4/13) con ausencia de estos. De los 59 perros muestreados en este estudio, 14 (23.7%) presentaron signos de enfermedad, de estos, 10 fueron los que se diagnosticaron por microscopia como positivos, y de los 46 perros con resultado negativo en frotis, 31 perros no manifestaban signos clínicos y de estos, 3 muestras fueron diagnosticadas por microscopía como positivas; esto comparado con el estudio realizado por Tártara *et al.* (2013) en el cual, el 75% (75/100) de perros que acudieron a consulta dermatológica, en el frotis sanguíneo dieron positivo a *Mycoplasma* spp, y en otro estudio Martínez *et al.* (2003) diagnosticaron el 12.57% (23/252) de muestras positivas a *Mycoplasma* spp, estos datos fueron obtenidos de registros documentados de muestras de laboratorio. Las estructuras compatibles a *Mycoplasma* spp (Figura 2) que se observaron en los frotis, coincide a lo observado en un caso clínico de un perro que presentaba manifestaciones clínicas a hemoparásitos reportado por Beaufils (2012), diagnosticado después de la quinta visita médica, al igual que el caso clínico comunicado por Pérez e Iglesias (2017). El diagnóstico por frotis sanguíneo es utilizado para la detección de *Mycoplasma* spp, mediante la observación de la bacteria sobre el eritrocito, ya sea solo, en pares o cadenas (Mazaheri *et al.*, 2014), para contar con un diagnóstico por medio de extensiones sanguíneas con más probabilidad de

encontrar a la bacteria, se debe realizar el frotis inmediatamente después de la toma de muestra, ya que la ausencia en él no lo excluye del diagnóstico, nombrándolo como un falso negativo (Villiers y Blackwood, 2005), como el caso del estudio realizado por AbdRani *et al.* (2011) de 525 muestras de sangre de perros (entre animales enfermos y sanos), en ningún frotis se observó la bacteria.

La técnica por PCR que por su sensibilidad al momento de detección, da un resultado más confiable, es una técnica con una tasa de efectividad del 100%, aun si el perro no manifiesta signología de enfermedad (Mazaheri *et al.*, 2014). Los amplicones obtenidos en este estudio por medio de PCR anidado realizados con los iniciadores (MhcF y MhcR) para la especie *Mycoplasma haemocanis* permitió la amplificación de 3 muestras de sangre (Figura 3), con un tamaño de alrededor de 300 pb, representando el 5% del total de muestras del estudio, que por microscopía dieron positivo a *Mycoplasma* spp, lo cual coincide con el tamaño descrito en los estudios con la amplificación de alrededor de 308 pb del gen 16S ARNr de Aktas y Ozubek (2018 y 2017) y Torkan *et al.* (2012) con 309 pb; el resultado de las muestras que amplificaron en el estudio, se asemeja a los descritos por Sousa *et al.* (2017) con 4.7% (2/42), Leite *et al.*, (2016) con 4.2% (4/94) y Compton *et al.* (2012) con 1.3% (7/506), y en contraste con el estudio de detección en sangre realizado por Lira-Amaya *et al.* (2015) con el 66.6% (20/30); el gen 16S ARNr es el más utilizado para el análisis por PCR en estudios para la detección de *Mycoplasma* spp o las especies en sangre de perros en varias regiones del mundo, por ejemplo en Europa Roura *et al.* (2010) obtuvieron 26/182 positivos a *Mhc*; Novaco *et al.* (2010) 82/850 positivos a *Mycoplasma* spp. y 43/82

positivos a *Mhc*; Kenny *et al.* (2004) con 15/71 positivos a *Mhc*, en Asia Liu *et al.* (2016) con 60/181 perros positivos a *Mycoplasma* spp; Inpankaew *et al.* (2016) con 10/101 perros positivos a *Mhc*; Torkan *et al.* (2012) con 13/100 perros positivos a *Mhc*, en África Aquino *et al.* (2016) con 18/245 perros positivos a *Mhc*; Marié *et al.* (2009) con 4/114 perros con *Mhc* y en América Soto *et al.* (2017) obtuvieron 69/278 perros positivos a *Mycoplasma* spp. y 33/69 positivos a *Mhc*; Lira-Amaya *et al.* (2015) 20/30 perros positivos a *Mycoplasma* spp; Viera *et al.* (2015) 59/132 perros dieron positivos a *Mycoplasma* spp. y 21/59 se identificaron con *Mhc*; Compton *et al.* (2012) detectaron *Mhc* en 3 de 7 muestras que amplificaron a *Mycoplasma* spp. La secuencia obtenida del gen 16S ARNr (Cuadro 5), de las muestras amplificadas, no fue del tamaño esperado, pero el gen se encuentra dentro de las secuencias que se compararon con *Mycoplasma haemocanis* Isolate (KY117653 y KY117654) con un 93.94% de identidad.

Cuadro 5.- Secuencia de las muestras amplificadas para la identificación de *Mycoplasma haemocanis*.

Gen	Secuencia	Pares de Bases	Homología
16S	GAGTAATaTCGTAGAGGTTATCGAGGTGACA	58	93.94%
ARNr	GGTAGAGTTCGGACGTCTAAGAAGCTG		

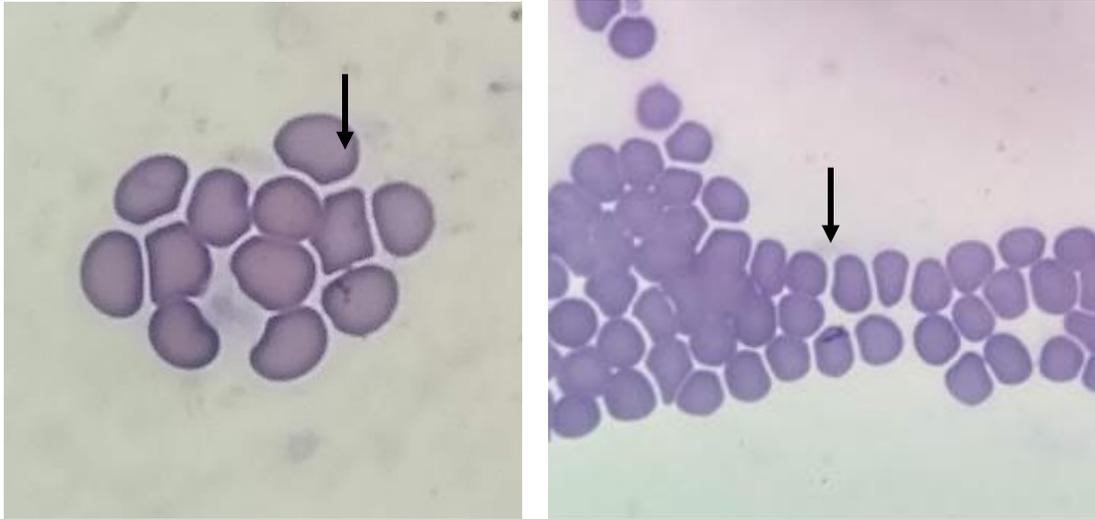


Figura 2. Estructuras compatibles a *Mycoplasma* spp. en la superficie de los eritrocitos en frotis sanguíneos teñidos por Wright y hemocolorante rápido, observadas por la técnica de microscopía óptica 100x.

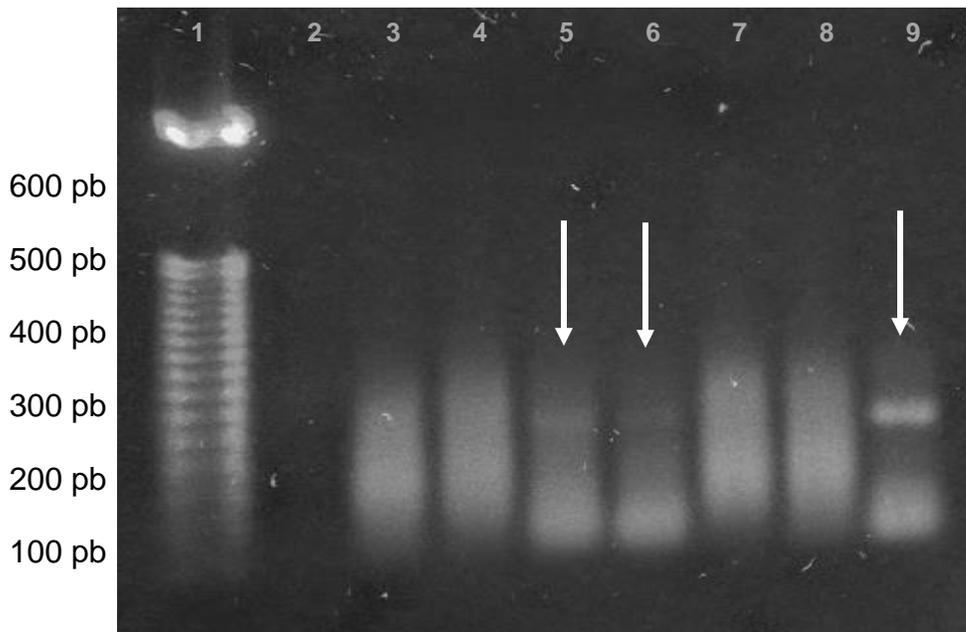


Figura 3. Amplificación de bandas de *Mhc* en Gel de agarosa al 1%. Carril 1 marcadores de tamaño 100 a 1000 pb. Carriles 5, 6 y 9 Amplificación del gen 16S ARNr de *Mycoplasma haemocanis* de alrededor de 300 pb. Carriles 3, 4, 7, 8 negativos, carril 2 vacío.

VII. CONCLUSIÓN

Mycoplasma haemocanis es la especie de hemoplasmas que infecta a perros en la ciudad de Culiacán, Sinaloa, comprobándose morfológicamente y molecularmente. Esto sugiere que la bacteria puede ser causal de micoplasmosis en perros con riesgo zoonótico en la ciudad tanto en animales de compañía como en humanos.

VIII. LITERATURA CITADA

- AbdRani P.A.M., Irwin P.J., Coleman G.T., Gatne M., Traub R.J. 2011. A survey of canine tick-borne diseases in India. *Parasites & Vectors*. 4:141.
- Aktas y Ozubek, 2018. A molecular survey of hemoplasmas in domestic dogs from Turkey. *Veterinary Microbiology*. 221:94-97.
- Aktas y Ozubek, 2017. Molecular survey of haemoplasmas in shelter dogs and associations with *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*. *Medical and Veterinary Entomology* 31:457 - 461.
- Alleman A.R., Melanie G.P., Harvey J.W., Gaskin J.M., Barbet A.F. 1999. Western Immunoblot Analysis of the Antigens of *Haemobartonella felis* with Sera From Experimentally Infected Cats. *Journal of Clinical Microbiology*. 37 (5): 1474-1479.
- Aquino L. C., Kamani J., Haruna A. M., Paludo G. R., Hicks C. A., Helps C. R., Tasker S. 2016. Analysis of risk factors and prevalence of haemoplasma infection in dogs. *Veterinary Parasitology*. 221:111–117.
- Barker E., Tasker S. 2013. Haemoplasmas: Lessons learnt from cats. *New Zealand Veterinary Journal*. 61(4): 184-192.
- Beaufils J.-P. 2012. Anémie hémolytique chez un chien infecté par *Mycoplasma haemocanis*. *Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie*. 47:43-47.
- Biondo A.W., Pires S. A., Sá G.A.M., Vieira R.F., Vidotto O., Barros M.D., Pereira A.N.R., Beltrão M.M., Timenetsky J., Aufran M.H., Díaz G.F.H., Messick J.B. 2009. A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal*. 18 (3): 1-7.
- Cabazas Z.I. 2008. Hemobartonelosis canina. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*. IX (2).
- Chalker V.J. 2005. Canine mycoplasmas. *Research in Veterinary Science*. 79: 1-8.
- Chalker V.J., Brownlie J., 2004. Taxonomy of the canine *Mollicutes* by 16S rRNA gene and 16S/23S rRNA intergenic spacer region sequence comparison. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 537-542.
- Compton S.M., Maggi R.G., Breitschwerdt E.B. 2012. Candidatus *Mycoplasma haematoparvum* and *Mycoplasma haemocanis* infections in dogs from the

United States. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 35:557–562.

Cruz E.A.J. 2005. Detección de *Mycoplasma haemofelis* y “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” por PCR en CHILLÁN. <http://virusberriostecheGARAY.blogspot.com/2012/03/deteccion-de-mycoplasma-haemofelis-y.html>

DOF. 2019. Diario Oficial de la Federación. Enfermedades de reporte obligatorio. Acceso: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5545304&fecha=29/11/2018 (Consulta: Octubre, 19)

do Nascimento N.C., Guimaraes A.M.S., Santos A.P., SanMiguel P.J., Messick J. 2012. Complete genome sequence of *Mycoplasma haemocanis* strain Illinois. *Journal of Bacteriology*. 1605-1606.

Gaxiola C.S.M., Obregón J.F., Domínguez J.E., Pérez J.A., Rubio R.M.C. 1996. Prevalencia de *Babesia* spp. y *Haemobartonella* spp. en perros en la ciudad de Culiacán, Sinaloa. XI Jornada Médica, curso sobre odontología en perros y gatos.

GenBank, 2019. Base de datos de secuencias genéticas. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. (Consultado: Diciembre 2019)

González R.E.G. 2014. Determinación de la presencia de *Mycoplasma haemofelis* en felinos de la parroquia ximena de la ciudad de Guayaquil. Trabajo tesis de la Universidad de Guayaquil, en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/6922/1/Gonzalez%20Rodriguez%20Eliana.pdf>

Grazziotin A.L. 2011. Hemoplasmas (micoplasmas hemotrópicos): prevalencia / frecuencia de infección, caracterización molecular y filogenia de hemoplasmas en cérvidos brasileños en cautiverio y vida libre. Tesis, Universidad Federal de Paraná, Sector de Ciencias Biológicas, Departamento de Biología Celular. <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/25593>

Green R. M., Sambrook J. 2012. En: *Molecular cloning. Laboratory manual*. 4ta. Edition. Cold spring Harbor, New York, p. 2028.

Guimaraes A.M.S., Santos A.P., do Nascimento N.C., Timenetsky J., Messick J.B. 2014. Comparative genomics and phylogenomics of hemotrophic mycoplasmas. *PLOS ONE*. 9(3): e91445.

- Hamel D., Silaghi C., Lescai D., Pfister K. 2012. Epidemiological aspects on vector-borne infections in stray and pet dogs from Romania and Hungary with focus on *Babesia* spp. *Parasitol Res.* 110:1537–1545. DOI: 10.1007/s00436-011-2659-y
- Hii S.F., Kopp S.R., Thompson M.F., O’Leary C.A., Rees R.L., Traub R.J. 2012. Canine vector-borne disease pathogens in dogs from south-east Queensland and north-east Northern Territory. *Australian Veterinary Journal.* 90:130–135.
- Hu Z., Yin J., Shen K., Kang W., Chen Q. 2009. Outbreaks of hemotropic mycoplasma infections in China. *Emerging Infectious Diseases.* 15 (7): 1139-1140.
- 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. 2019. 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/>. (Consulta: Julio, 2019)
- Macrogen, 2019. Empresa de biotecnología pública. <http://www.bionity.com/en/companies/16588/macrogen-inc.html>. (Consultada: Junio 2019).
- Blast, 2019. Herramienta de búsqueda de alineación local. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearchs. (Consulta: Junio 2019).
- Inpankaew T., Hii S.F., Chimnoi W., Traub R.J. 2016. Canine vector-borne pathogens in semi-domesticated dogs residing in northern Cambodia. *Parasites & Vectors.* 9:253.
- Kemming G. I., Messick J. B., Enders G., Boros M., Lorenz B., Muenzing S., Kisch-Wedel H., Mueller W., Hahmann-Mueller A., Messmer K., Thein E. 2004. *Mycoplasma haemocanis* Infection – A kennel disease?. *American Association for Laboratory Animal Science.* 54 (4):404-409.
- Kenny J., Shaw E., Beugnet F., Tasker S. 2004. Demonstration of two distinct hemotropic mycoplasmas in french dogs. *Journal of Clinical Microbiology.* 42: 5397-5399.

- Lashnits E., Grant S., Thomas B., Quorollo B., Breitschwerdt E.B. 2019. Evidence for vertical transmission of *Mycoplasma haemocanis*, but not *Ehrlichia ewingii*, in a dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 33:1747–1752.
- Leite S. R., Teles E. J., Pazzuti G., Kellerman C. H. P., Babo-Terra V. J., Friozi E., do Nascimento R. C. A. 2016. "Occurrence of *Mycoplasma haemocanis* in dogs infested by ticks in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil". *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 25(3):359-363.
- Lira-Amaya J. J., Álvarez-Martínez J. A., Rojas-Martínez C., Martínez F., Figueroa-Millán J. V., Bautista-Garfias C. R. 2015. Detección de parásitos hemotrópicos caninos en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ingurgitadas. *Entomología Veterinaria. Entomología Mexicana*. 2: 714-720.
- Liu M., Ruttayaporn N., Saechan V., Jirapattharasate C., Vudriko P., Moumouni P.F.A., Cao S., Inpankaew T., Ybañez A.P., Suzuki H., Xuan X. 2016. Molecular survey of canine vector-borne diseases in stray dogs in Thailand. *Parasitology International*. 65:357–361.
- Maggi R. G., Compton S. M., Trull C. L., Mascarelli P. E., Mozayeni R., Breitschwerdt. 2013. Infection with hemotropic *Mycoplasma* species in patients with or without extensive arthropod or animal Contact. *Journal of Clinical Microbiology*. 51(10):3237–3241.
- Maggi RG, Krämer F. 2019. A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. *Parasites Vectors*. 12:145.
- Manterola C., Otzen T., 2014. Estudios observacionales. Los diseños utilizados con mayor frecuencia en investigación clínica. *Int. J. Morphol*. 32 (2):634-345.
- Marié J.L., Shaw S.E., Langton D.A., Bourry O., Gomez J., Davoust B. 2009. Sub-clinical infection of dogs from the Ivory Coast and Gabon with *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Mycoplasma* and *Rickettsia* species. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 15: 284–285.
- Martínez H.D.I., Peniche C.A.E.J., Reyes V.P., Abeledo G.M.A., Rivera R.E.L. 2003. Determinación de hemoparásitos en perros domésticos de la zona Conurbada Veracruz – Boca del Río, Veracruz, México. Proceedings of the 10th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, Viña del Mar, Chile, Companion animal epidemiology session 883, ISVEE 10. <http://www.sciquest.org.nz/elibrary/search/simple?resubmit=1>

- Mazaheri N.F.R., Vahedi S., Mohammadkhan F. 2014. Haemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review. *International journal of Advanced Biological and Biomed.* 2 (5): 1484-1503.
- Messick J. B. 2003. New perspectives about *Hemotropic micoplasma* (formerly, *Haemobartonella* and *Eperythrozoo* species) infections in dogs and cats. *Veterinary Clinics Small Animal Practice.* 33: 1453-1465.
- Messick J.B. 2004. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Veterinary Clinical Pathology*, Vol. 3, número 1: 2-13.
- Neimark H., Johansson K.E., Rikihisa Y., Tully J.G. 2002. Revision of haemotropic *Mycoplasma* species names. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 52: 683.
- Novacco M., Meli M. L., Gentilini F., Ceci C., Grazia M., Lombardo G., Lloret A., Santos L., Carrapico T., Willi B., Wolf G., Lutz H., Hofmann-Lehmann R. 2010. Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. *Veterinary Microbiology.* 142: 276–284.
- Ortiz J., Yanina M., Pérez R.E., Cagnoli C.I. 2015. Presentación de un caso compatible con micoplasmosis en un canino. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias. Tesis. <https://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/535/ORTIZ%20JONES,%20MARA%20YANINA%20Facultad%20de%20Ciencias%20Veterinarias.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Osorno M., Ristic M. 1973. Aislamiento e identificación de *Haemobartonella canis* en México. *Técnica Pecuaria*, p. 23-24. <https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/article/download/1858/3633>
- Pérez T.G., Iglesias M.F. 2017. Presentación clínica crítica de *Mycoplasma haemocanis* en un canino. *Veterinaria Argentina.* XXXIV (349): 1-6.
- Peters I.R., Helps C.R., McAuliffe L., Neimark H., Lappin M.R., Gruffydd-Jones T.J., Day M.J., Hoelzle L.E., Willi B., Meli M., Hofmann-Lehmann R., Tasker S. 2008. RNase P RNA Gene (*rnpB*) Phylogeny of hemoplasmas and other *Mycoplasma* species. *Journal of Clinical Microbiology.* Vol. 46 (5): 1873-1877.

- Rivera-Tapia J.A., Cedillo-Ramírez M.L., Vega-Benítez M. 2001. Micoplasmas y su importancia médica. Revista Biomédica. 12(4):262-271. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=21684>
- Roura X., Peters I. R., Altet L., Tabar M.-D., Barker E. N., Planellas M., Helps C. R., Francino O., Shaw S. E., Tasker S. 2010. Prevalence of hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain, J. Vet. Diagn. Invest. 22: 270–274.
- Soto F., Walker R., Sepulveda M., Bittencourt P., Acosta-Jamett G., Müller A. 2017. Occurrence of canine hemotropic Mycoplasmas in domestic dogs from urban and rural areas of the Valdivia Province, southern Chile. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 50: 70–77.
- Sousa K.C.M., Herrera H.M., Secato C.T., Oliveira A.V., Santos F.M., Rocha F.L., Gomes B.W.T., Carvalho M. G., Estrela AP.P.C., Zacarias M.R., Tinucci C.M., Rogério A.M. 2017. Occurrence and molecular characterization of hemoplasmas in domestic dogs and wild mammals in a Brazilian wetland. Acta Trópica. 171: 172-181.
- Suárez P.A. 2011. Estudio taxonómico polifásico de bacterias del género *Mycoplasma* en aves silvestres. Descripción de una nueva especie: *Mycoplasma neophronis*. Tesis. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria. <https://accedacris.ulpgc.es/handle/10553/7142>
- Tártara G., Pereyra N., Salvador F., González B. 2013. Detección de estructuras compatibles con micoplasmas hemotrópicos en extendidos sanguíneos de perros de la ciudad de Rosario. Veterinaria Argentina. XXX (299):1-11.
- Torkan S., Aldavood S.J., Sekhavatmandi A., Moshkelani S. 2012. Detection of haemotropic Mycoplasma (Haemobartonella) using multiplex PCR and its relationship with epidemiological factors in dogs. Comparative Clinical Pathology. 23: 669-672.
- Valle S.D.F., Messick J. B., dos Santos A. P., Kreutz L. C., Blatt N. C., Machado G., Corbellini L. G., Biondo A., W., Diaz F.H. 2014. Identification, occurrence and clinical findings of canine hemoplasmas in southern Brazil. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 37: 259-265.
- Viera R.F., Vidotto O., Vieira T.S., Guimaraes A.M., Santos A.P., Nascimento N.C., Santos N.J.R., Martins T.F., Labruna M.B., Marcondes M., Biondo A.W., Messick J.B. 2015. Molecular investigation of hemotropic mycoplasmas in

human beings, dogs and horses in a rural settlement in southern Brazil. *Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 57(4): 353–357.

Villiers E., Blackwood L. 2005. *BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology*. Second edition. Editorial BSAVA, England. Cap. 27, pp: 429-430.