



UNIVERSIDAD DEL ZULIA
REVISTA CIENTÍFICA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN



MARACAIBO, ESTADO ZULIA, VENEZUELA



DETECCIÓN Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA TRANSMISIÓN DE *Anaplasma marginale* EN REBAÑOS BUFALINOS LECHEROS

Detection and risk factors associated with the transmission of *Anaplasma marginale* in dairy buffalo herds

Juan Pablo Uzcátegui-Varela^{1*}, Armando de Jesús Briceño-Rangel¹, María Carolina Rosales², Ender Eduardo Márquez¹ y Rosana Uzcátegui-Lara¹.

¹ Grupo de Investigación en Ciencia Animal y Plantas Tropicales. Universidad Nacional Experimental Sur del Lago "Jesús María Semprum" (UNESUR) Núcleo La Victoria, estado Mérida, 5142, Venezuela. ² Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Laboratorio de Genética y Química Celular (GeQuimCel), Mérida, 5101, Venezuela. *uzcateguij@unesur.edu.ve

RESUMEN

Anaplasma marginale es una rickettsia intracelular transmitida por garrapatas e insectos hematófagos que infecta los eritrocitos maduros de rumiantes, considerándose como el hemotrópico de mayor impacto económico en los planteles lecheros del mundo. Los hallazgos de *A. marginale* en búfalo (*Bubalus bubalis*) han demostrado que se trata de un importante reservorio del patógeno para los vacunos donde coexisten. Con el propósito de detectar *A. marginale* en búfalas lactantes así como los factores de riesgo (FR) asociados a su transmisión, se visitaron doce unidades de producción ubicadas en el Eje Panamericano, Sur del Lago de Maracaibo-Venezuela, donde se colectaron 120 muestras de sangre a partir de la vena yugular utilizando tubos al vacío con anticoagulante ácido etilendiamino tetraacético (EDTA). El ADN obtenido fue purificado según el método de la proteinasa K y fenol-cloroformo para identificar mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), un gen específico (msp1) para *A. marginale*. Por otra parte, se visualizó la presencia del patógeno a través del extendido sanguíneo bajo microscopio (100X) con tinción de Giemsa y, se aplicó un cuestionario epizootiológico para registrar los elementos epidemiológicos afines con la transmisión del microorganismo rickettsial. La PCR reveló la presencia de un amplicón específico para *A. marginale* de aproximadamente 400pb en 80% (96/120) del total de búfalas muestreadas; en cambio, por extendido sanguíneo solo el 25,83% (31/120) de los animales se diagnosticaron positivos. Entre los FR estudiados, la presencia de garrapatas (*Rhipicephalus microplus*) representó el de mayor impacto negativo (Odds ratio (OR)=3,23), mientras que el uso de baños acaricidas resultó una práctica de protección (OR=0,83) ante *A. marginale*. En conclusión, la PCR demostró ser una herramienta de diagnóstico sensible y específica en comparación con el frotis sanguíneo para hallar *A. marginale*. La alta positividad entre los rebaños demandan la adopción de estrategias sanitarias para el control de *A. marginale* en *B. bubalis*.

Palabras clave: *Anaplasma marginale*; búfalos; factores de riesgo; PCR

ABSTRACT

Anaplasma marginale is an intracellular rickettsia transmitted by ticks and hematophagous insects that infect the mature erythrocytes of ruminants, being considered as the hemotropic of greater economic impact in the dairy farms of the world. The findings of *A. marginale* in buffalo (*Bubalus bubalis*) have shown that it is an important reservoir of the pathogen for cattle where they coexist. In order to detect *A. marginale* in lactating buffaloes as well as the risk factors (RF) associated with its transmission, twelve production units located in the Eje Panamericano, Sur del Lago de Maracaibo-Venezuela were visited. Collected 120 blood samples from the jugular vein using vacuum tubes with anticoagulant ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA). The DNA obtained was purified according to the method of proteinase K and phenol-chloroform to identify by means of the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, a specific gene (msp1) for *A. marginale*. On the other hand, the presence of the pathogen was visualized through the blood smear under a microscope (100X) with Giemsa stain, and an epizootiological questionnaire was applied to register the epidemiological elements related to the transmission of the rickettsial microorganism. PCR revealed the presence of a specific amplicon for *A. marginale* of approximately 400 bp in 80% (96/120) of the total of buffaloes sampled; however, by extended blood only 30% (36/120) of the animals were diagnosed as positive. Among the FR studied, the presence of ticks (*Rhipicephalus microplus*) represented the highest negative impact (Odds ratio (OR) = 3.23), while the use of acaricide baths was a protection practice (OR = 0.83) for *A. marginale*. In conclusion, PCR proved to be a sensitive and specific diagnostic tool compared to the extended blood to find *A. marginale*. The high positivity among herds demand the adoption of sanitary strategies for the control of *A. marginale* in *B. bubalis*.

Key words: *Anaplasma marginale*; buffaloes; risk factors; PCR

INTRODUCCIÓN

Anaplasma marginale es un conocido patógeno rickettsial intraeritrocítico que infecta a una gran variedad de rumiantes, incluidos búfalos (*Bubalus bubalis*), causando anemia, ictericia, fiebre, abortos y muerte en rebaños comerciales de zonas tropicales y subtropicales del mundo [14, 28]. Una vez infectados, los animales siguen siendo portadores de por vida, lo cual representa un serio problema económico para la ganadería de los países en desarrollo [14]. La transmisión de *A. marginale* se lleva a cabo principalmente por garrapatas (*Rhipicephalus microplus*), las cuales al igual que los hospedadores, se infectan persistentemente y sirven como reservorios de infección [26]. Se ha reconocido que el búfalo de agua (*B. bubalis*) es susceptible a la infección por *A. marginale*, pero los hallazgos clínicos son difícilmente detectables en comparación al vacuno, convirtiéndolo en un portador asintomático que pone en riesgo la salud de rebaños *Bos indicus* y *B. taurus* cercanos [10]; es así como los búfalos infectados al ingresar a zonas no endémicas o unidades de producción (UP) con reducida presencia de *A. marginale*, podrían introducir nuevas cepas e incrementar su prevalencia en hospedadores altamente susceptibles [35]. Son escasos los estudios reportados sobre anaplasmosis en ganado bufalino del trópico americano, sin embargo, se conoce que la prevalencia en *B. bubalis* es inferior a la observada en bovinos [38]. El método convencional para detectar *A. marginale* se basa en la evaluación morfológica de los eritrocitos a través del microscopio mediante un extendido sanguíneo; pero debido a la baja *rickettsemia* presente en animales asintomáticos como *B. bubalis*, este método no se recomienda para la detección subclínica de *A. marginale*, razón por la cual son utilizadas pruebas serológicas de mayor especificidad como inmunofluorescencia indirecta, prueba de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) indirecto y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) [35]. Al respecto, es evidente la ventaja competitiva que presenta la PCR en términos de reproducibilidad, sensibilidad e interpretación, pues se logra identificar el ácido desoxirribonucleico (ADN) específico del microorganismo patógeno en sangre, minimizando el diagnóstico de falsos negativos en animales infectados sub-clínicamente [10, 35]. En vista que *B. bubalis* es refractario a enfermedades hemotrópicas, favoreciendo las infecciones oportunistas por *A. marginale* en zonas ganaderas donde coexiste con el vacuno y, que se han reportado algunos factores de riesgo asociados a la transmisión de *A. marginale* en zonas rurales de Venezuela debido a las condiciones climáticas propias de la selva húmeda tropical, se planteó como objetivo detectar mediante PCR, la presencia de *A. marginale* en búfalos lactantes aparentemente sanas en el Eje Panamericano del Sur del Lago de Maracaibo, estados Mérida y Zulia-Venezuela, así como la identificación de los factores de riesgo más relevantes en la transmisión del microorganismo rickettsial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio: Se visitaron 12 UP dedicadas a la producción

bufalina lechera ubicadas en una zona de vida clasificada como selva húmeda tropical (SHT) [31] en el Eje Panamericano-Sur del Lago de Maracaibo (estados Mérida y Zulia) a 120 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.), temperatura media de 36 °C y 85% de humedad relativa, según el reporte electrónico de una estación meteorológica móvil (Celestron®-EUA) y un GPS (GARMIN® modelo Etrex 10 Lcd. 2.2-EUA).

Muestreo: El tamaño mínimo de la muestra se determinó mediante la fórmula para estudios de prevalencia propuesta por el Centro Panamericano de Zoonosis citada por Silva y col. [38]: $N = p(100-p)(Z)^2 / (d.p/100)^2$. El valor de prevalencia esperada (p) se estimó en 75% de acuerdo a lo expuesto por Tamasaukas y col. [41] como valor promedio registrado entre fincas ganaderas doble propósito en Venezuela; por su parte, el porcentaje correspondiente a confianza (Z) fue de 95% y, el margen de error (d) 5% según lo recomendado por González y Meléndez [18] y Silva y col. [38]. Un total de 120 búfalas adultas lactantes, todas ubicadas en el primer tercio de lactancia, con registro máximo de tres partos, mestizas Murrah x Mediterráneo y de excelente condición corporal fueron consideradas para el presente estudio. Se seleccionaron diez animales por finca a los cuales se les extrajo individualmente 6 mililitros (mL) de sangre mediante punción de la vena yugular, utilizando agujas de calibre 21 G x 1" (0,8 milímetros (mm) x 25 mm) en tubos estériles al vacío (Vacuum Diagnostics®) con anticoagulante ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA, 35 microlitros (µL)) debidamente rotulados y posteriormente refrigerados a -20 °C en un congelador de laboratorio serie GP Freezer capacidad 962 litros (L) modelo MF25SS-SAEE-TS marca Thermo Scientific®-EUA hasta su procesamiento [1, 3, 34, 37]. Durante el muestreo se colectaron ectoparásitos junto con el pelo en orejas y cuello de las búfalas estudiadas para su identificación morfológica según la metodología descrita por Batista y col. [6] y Veneziano y col. [44], por ser considerados como un factor de riesgo en la transmisión de *A. marginale*.

Recolección de datos: De acuerdo a experiencias epidemiológicas previas [38], se diseñó un cuestionario epizootiológico basado en criterios sobre la transmisión de *A. marginale* expuestos por Kessler [23]. La encuesta estuvo estructurada en función de preguntas objetivas con el propósito de recopilar información sobre los factores de riesgo (FR) asociados a la presencia de *A. marginale* en los rebaños. Para el presente trabajo, los FR seleccionados fueron: presencia de garrapatas, hallazgo de insectos hematófagos (*Haematopinus tuberculatus*), uso colectivo de agujas (transmisión iatrogénica), aplicación de soluciones tópicas acaricidas y desparasitación con ivermectina [39].

Extendido sanguíneo: Las muestras al ser colectadas se sometieron a identificación hematológica bajo el protocolo clásico de laboratorio clínico, el cual consistió en tomar 5 µL de sangre venosa para el frotis, luego se realizó la fijación con metanol absoluto durante 5 minutos (min) y, finalmente se

efectuó la tinción con Giemsa (1/10 en agua destilada, 30 min). Para la visualización de los eritrocitos, se empleó un microscopio Leica®-China modelo CME (100X), en busca de corpúsculos de inclusión compatibles con *A. marginale* [7, 29] y, luego respaldar la detección del patógeno mediante PCR.

Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN): Se realizó una corrida electroforética previa para validar la calidad del ADN utilizando muestra serológica humana y de búfalo. La sangre colectada fue procesada según el protocolo de aislamiento de ADN con proteinasa K y fenol-cloroformo de Sambrook y Russell [36] modificado en este trabajo. Las muestras fueron descongeladas durante 1 hora (h) a temperatura ambiente, mezclándolas suavemente por inversión. A 500 µL de sangre se le agregó 500µL de buffer de lisis (Tris-Cl 10mM, pH 8; EDTA 0,1M, SDS 0,5%; DNasa libre de RNasa, 20 microgramo (µg) / mililitro(mL)) la cual fue agregada al momento de usar y luego se incubó a 37°C por 1 h utilizando un termobloque modelo Mastercycler nexus gradient Eppendorf®-Alemania. Se colocó proteinasa K a una concentración final de 100 µg/mL usando una solución stock de 20 mg/mL. Se agitó e incubó por 3 h a 50 °C (hubo agitación esporádica durante la incubación); superada la incubación se extrajo un volumen de fenol: cloroformo (1:1) equilibrado con buffer Tris-Cl pH 8, agitándose vigorosamente por 3 min hasta formar una emulsión. Se centrifugó a 21.912 G (Fuerza centrífuga relativa (RCF)) por 15 min a 4°C utilizando una microcentrífuga Eppendorf® 5427R-Alemania. En este paso solo se observaron dos fases, una cristalina y una fase blanca superior. Se agregó 500µL de buffer de lisis adicional, se agitó vigorosamente para homogenizar las fases y se repitió la centrifugación para recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo estéril. Se realizó una extracción con un volumen 1:1 de cloroformo (de acuerdo al volumen recuperado), se agitó vigorosamente y se repitió la centrifugación. De nuevo se recuperó la fase acuosa y se colocó 0,2 volúmenes de acetato de amonio 10 Molar (M) y dos volúmenes de etanol absoluto. Se mantuvo la solución a -20°C para precipitar el ADN. Nuevamente se centrifugó y descartó el sobrenadante, seguidamente se lavó la pastilla con 0,5 mL de etanol frío al 70% y se repitió la centrifugación. Finalizada la centrifugación, el etanol al 70% fue descartado y el exceso del mismo se drenó al colocar el tubo de forma invertida sobre papel absorbente. El ADN fue rehidratado con 50µL de buffer Tris-EDTA (buffer TE) y almacenado a -20°C hasta su uso. La concentración de todos los ADN fueron estimadas espectrofotométricamente utilizando el equipo Uvmin-1240 Shimadzu Corporation-Japón, a 260 nanómetros (nm) según Sambrook y Russell [36] y su integridad fue visualizada en corrida electroforética usando una cámara Mini sub-cell™ Bio rad-EUA, y geles de agarosa al 0,8% con una concentración final de bromuro de etidio de 1µg/mL (Sigma, 10 miligramos (mg)/mL). Se cargaron por pozo 1µL de cada ADN más 3µL de buffer de carga. El tiempo de corrida fue de 1 h en buffer Tris-borate-EDTA (buffer TBE) 0,5X. Luego de la corrida, el gel fue retirado y expuesto a luz ultravioleta y fotografiado empleando el sistema de documentación y digitalizador de imágenes Ovitec® modelo Uvipro Chemi,

Cambridge-Reino Unido.

Detección molecular de *A. marginale*: Para todas la mezclas de PCR se utilizó como control negativo y positivo muestras de ADN correspondiente a sangre de búfalos (*B. bubalis*) sanos y enfermos proporcionado por el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional Experimental Sur del Lago “Jesús María Semprum” (UNESUR), Santa Bárbara de Zulia, estado Zulia 9°00'00" N; 71°55'00". En todas las PCR se incluyó un control sin ADN. Las mezclas de PCR se realizaron en una cámara de flujo laminar (Labconco® Premier-EUA) utilizando puntas plásticas (epTIPS Box- Eppendorf®) y micro-pipetas (Eppendorf Research plus®). Los cebadores fueron sintetizados en escala de 50 nanomol (nmol) por EUROFINs®. Se preparó una solución stock a 100 micromol (µM) y, una mezcla de PCR de 0,4µM. Para la PCR de identificación se utilizaron los oligonucleótidos **BAP-2** (5'-GTATGGCACGTAGTCTTGGGATCA-3') y **AL34S** (5'-CAGCAGCAGCAAGACCTTCA-3'), que permitieron amplificar el gen *msp1* que codifica una sub-unidad de la proteína de superficie de membrana de *A. marginale*, generando un amplicón de 409 pb [40]. Para todos los ADN se preparó un stock de uso de 50ng/µL y, de cada uno de estos, se usó 1µL por tubo de reacción para una concentración final 3,3ng/µL. Se empleó un termociclador marca Applied Biosystems®-EUA, modelo 2720. El volumen de trabajo para las reacciones de PCR fue de 15 µL, empleando 0,4mM de cada cebador y GoTaq® Green Master Mix, 2X, PROMEGA (Tampón 2X pH 8,5, dATP 400µM, dGTP 400µM, dCTP 400µM, dTTP 400µM y MgCl₂ 3mM). La mezcla GoTaq® está diseñada para ser diluida ½. Los ADN fueron colocados en los tubos de reacción luego de dispensar la mezcla de amplificación. El perfil térmico utilizado en el ensayo fue: 94 °C, 3 min; 94 °C, 1 min; 60 °C, 1 min; 72 °C, 30 segundos (seg) x 32 ciclos; 72 °C, 5 min [19]. Con el objeto de descartar que los resultados negativos son por contar con ADN de baja calidad, se llevaron a cabo amplificaciones usando un par de cebadores dirigidos a amplificar un gen de mantenimiento celular “housekeeping” específico para la secuencia de ADN de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), utilizándose para las PCR los cebadores **GAPDH1** (5'-GTTCCAGTATGATTCCACCC-3') y **GAPDH2** (5'-TCCCTCCACGATGCCAAA-3') según lo sugerido por Homan y col. citado por Tramuta y col. [43]. La concentración y componentes de las mezclas de reacción para la PCR y el perfil térmico utilizado en la amplificación fueron las mismas mencionadas para el PCR de detección. De los productos amplificados se cargaron 10 microlitro µL más 5 µL de buffer de carga por pozo. Tanto para el diagnostico como para el “housekeeping”, las características del gel de agarosa y las condiciones de corrida electroforética coinciden con las descritas en el protocolo de purificación de ADN.

Análisis de datos: Se determinó la cantidad porcentual de animales positivos a *A. marginale* mediante PCR y extendido sanguíneo en cada UP. Para hallar la relación entre positividad y FR, se planteó un diseño retrospectivo (casos y controles) basado en la prueba de odds ratio (OR) e intervalo de confianza

(IC=95%) para identificar la magnitud del riesgo [1, 20].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de ADN: El protocolo de extracción utilizado [19] y modificado en este trabajo, permitió obtener ADN íntegro sin signos de degradación o fragmentación. Este resultado fue confirmado al procesar por duplicado muestras de sangre bufalina y humana fresca. Se obtuvo aproximadamente 40 µg de ADN total a partir de 0,5 mL de sangre de búfalo (80µg ADN/mL de sangre) y, 60µg de ADN total (120µg/mL) para sangre humana fresca, proporcionando suficiente ADN para cualquier ensayo que implique la técnica de PCR. En la Figura (FIG.) 1 se observa una banda de ADN única por carril bien definida sin evidencia de degradación, lo cual sugiere la obtención de ADN de excelente calidad para el diagnóstico de *A. marginale* por PCR. Para evaluar el ADN utilizado como control positivo en la PCR durante el diagnóstico, se realizó una PCR con los cebadores especie-específicos, logrando amplificar un amplicón que migró con la banda de la escalera de peso molecular de 400 pb tal y como lo reseñaron Stich y col. [40] validado por Añez-Rojas y col. [2] y Ashuma y col. [3]. Por otra parte, al amplificar parte del gen de la gliceraldehído deshidrogenasa (housekeepin) como control interno de calidad del ADN, se evidenció su viabilidad para ser amplificado, por tal razón, la no aparición de resultados positivos en algunas muestras comprobó la ausencia del ADN de *A. marginale*.

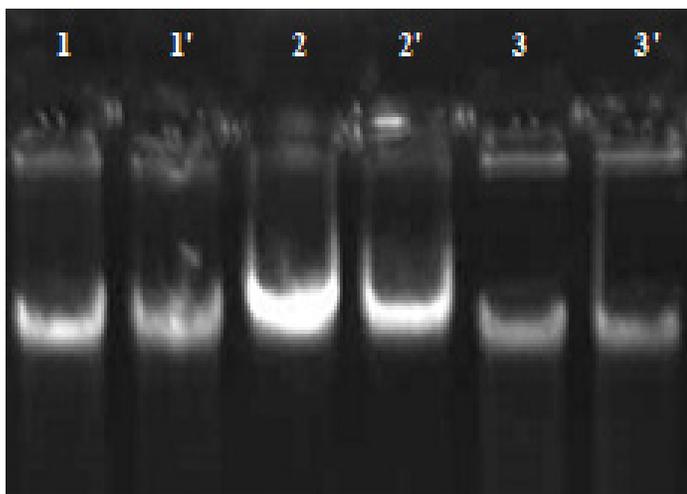


FIGURA 1. ADN EXTRAÍDO A PARTIR DE SANGRE TOTAL. 1, 1' y 3, 3': muestra de sangre bufalina; 2 y 2': muestra de sangre humana fresca

Detección de *Anaplasma marginale*: La identificación microscópica de *A. marginale* a partir de extendidos sanguíneos, permitió diagnosticar 25,83% (31/120) del total de búfalas muestreadas como positivas al microorganismo patógeno. Al respecto Eriks y col. [15] y Kocan y col. [27] señalan que mediante frotis sanguíneo no se logra identificar niveles por debajo de 1x10⁷eritrocitos infectados/mL de sangre y, por tanto

se trata de una prueba definitiva sólo en fase aguda pero no resulta suficientemente sensible para diagnosticar en animales aparentemente sanos. Por su parte, la PCR reveló que 80% (96/120) de los animales involucrados en el estudio resultaron positivos a *A. marginale* (TABLA I), tomando como referencia para el diagnóstico la aparición de un amplicón con un tamaño ≈ 400pb. según lo establecido por Stich y col. [40]. Se puede observar en la corrida electroforética (FIG. 2) variaciones en la intensidad de las bandas obtenidas de animales provenientes de una misma UP, lo cual puede ser explicado por la presencia de diferentes niveles de *rickettsemia* como lo exponen Corona y Martínez [9]. Esta afirmación es apoyada por el hecho de que todos los ADN se diluyeron a una misma concentración de uso y, la intensidad de los amplificados para el gen de la GAPDH fue similar para todos los aislados, indicando que las diferencias de intensidad en la amplificación del gen *msp1* posiblemente se deben a variaciones del nivel de infestación intraeritrocitaria.

TABLA I
RESULTADOS DE DETECCIÓN DE *Anaplasma marginale* MEDIANTE EXTENDIDO SANGUÍNEO Y PCR EN UNIDADES DE PRODUCCIÓN BUFALINA DEL EJE PANAMERICANO-SUR DEL LAGO DE MARACAIBO

UP	n	Prueba diagnóstico para <i>A. marginale</i>			
		PCR		Extendido sanguíneo	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
A		6	4	2	8
B		9	1	3	7
C		9	1	4	6
D		8	2	3	7
E	10	7	3	2	8
F		8	2	2	8
G		8	2	2	8
H		9	1	3	7
I		8	2	2	8
J		7	3	2	8
K		9	1	3	7
L		8	2	3	7
Total		96	24	31	89
%		80,0	20,0	25,83	74,17

Diversos estudios epidemiológicos similares se han realizado en ganadería bovina venezolana, reportándose en promedio la presencia de *A. marginale* en 70% de los animales muestreados, lo cual permitió confirmar que las condiciones ecológicas del trópico americano favorecen la endemia para *A. marginale* [10, 41] y por tanto, los rebaños bufalinos que se han extendido considerablemente por las zonas ganaderas del occidente de Venezuela, están expuestos al hemotrópico en estudio. El porcentaje de animales positivos a *A. marginale* aquí reportado

es similar al calculado por Bolívar y col. [8] en una explotación ganadera del estado Mérida ubicada en la zona Panamericana-Sur del Lago de Maracaibo, quienes utilizando PCR como prueba diagnóstica, hallaron *A. marginale* en 76,96% de las búfalas (*B. bubalis*) clínicamente sanas involucradas en la investigación; por tal motivo, estos resultados indican que el patógeno se encuentra ampliamente distribuido en el área de estudio, considerándose *B. bubalis* como un importante reservorio de *A. marginale*; de igual forma 80% de los búfalos evaluados por Khan y col. [24] resultaron positivos a *A. marginale* en Pakistán, exponiendo la necesidad de desarrollar más experiencias de campo para la detección molecular de *A. marginale* en *B. bubalis* dado los efectos negativos que representa desde el punto de vista sanitario su comportamiento asintomático. Sin embargo, Barbosa da Silva y col. [5] detectaron ADN de *A. marginale* en 5,4% de los búfalos muestreados al Norte de Brasil, mientras Néó [30] reportó 68% de muestras positivas al hemotrópico mediante PCR en búfalos jóvenes de São Paulo, Brasil. Un porcentaje semejante concluyeron El-Hariri y col. [14] en su trabajo de campo, al obtener 69,3% de animales positivos a *A. marginale* en áreas rurales de Egipto. Si bien las condiciones climáticas de los últimos casos mencionados son compatibles al Sur del Lago de Maracaibo-Venezuela, el porcentaje de positividad por ellos reportado es inferior al obtenido, la razón, según Barbosa da Silva y col. [5] radica en el constante control de vectores reportado por los propios investigadores durante el registro de datos epidemiológicos.

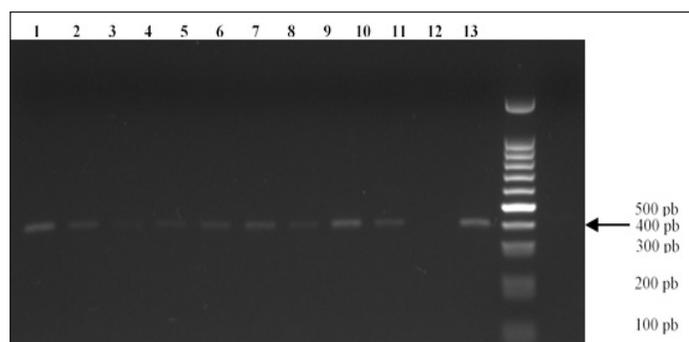


FIGURA 2: A 2. ELECTROFORESIS CON AMPLICONES ESPECÍFICOS PARA *A. marginale*. Carril 1-9: amplicones obtenidos a partir de sangre total de búfalas lactantes positivas a *A. marginale*. **Carril 10:** muestra negativa (búfalo sano). **Carril 11:** control positivo. Carril 12: marcador de peso molecular (100 pb). Carril 13: negativo (sin ADN)

A. marginale fue detectada en todos los grupos de *B. bubalis* muestreados; al respecto Torioni y col. [42] explican que el alto porcentaje de animales positivos se debe a que la infección permanece persistente en el rebaño, donde ocurre multiplicación cíclica (bajo nivel) de *A. marginale* que fluctúa entre 103-107 eritrocitos infectados/mL de sangre. Según el reporte presentado por Ashuma y col. [3], *B. bubalis* es un portador por excelencia de *A. marginale* al no exhibir sintomatología clínica y actuando como

potencial reservorio. Para Corona y col. [10] y Jacobo y col. [21], el diagnóstico molecular de *A. marginale* en grandes rumiantes portadores resulta determinante para caracterizar el estado epidemiológico en los rebaños con fines de monitoreo y control, debido a que la rickettsia se expande a través del movimiento de los animales infectados en áreas libres de la enfermedad. Figueroa y col. [17] indican que la utilización de la PCR en la detección de *A. marginale* permite avances significativos, no solo en el diagnóstico de anaplasmosis, sino también en estudios epidemiológicos con resultados precisos.

Factores de riesgo asociados a la presencia de *A. marginale*: Ashuma y col. [3] sugieren que, en casos donde se reporta un alto porcentaje de animales positivos a *A. marginale* es necesario evaluar los elementos sanitarios que favorecen la transmisión del patógeno. A partir de esta premisa, al procesar los datos generados por la encuesta epidemiológica (TABLA II), la presencia de garrapatas (*R. microplus*) representó un factor de riesgo importante (OR = 3,23; 95% Intervalo de confianza (IC): 1,31-7,98) para la detección de *A. marginale* en los grupos de búfalas muestreados. Un valor superior (OR=4,34) fue reportado por Sharma y col. [37] al evaluar los FR asociados a *A. marginale* en búfalas lactantes al norte de la India, afirmando que la presencia de *R. microplus* adheridas al animal aumenta en cuatro veces el riesgo de contraer *A. marginale*. Para Jaimes-Dueñez y col. [22], las probabilidades de seropositividad tienden a aumentar en presencia de artrópodos hematófagos, siendo *R. microplus* el principal vector biológico de la anaplasmosis en gran parte del trópico sudamericano [6, 23, 37]. Los hallazgos de *R. microplus* en *B. bubalis* han sido ampliamente discutido [33] y se ha comprobado que la baja rickettsemia en el búfalo es suficiente para infectar las garrapatas (*R. microplus*) e introducir *A. marginale* en rebaños vacunos cercanos, los cuales son considerablemente susceptibles a dicha bacteria intraeritrocitaria [32]. En consecuencia, la identificación de reservorios como *B. bubalis* y la mínima exposición a garrapatas son estrategias de control importantes para la anaplasmosis. Sin embargo, Medina-Naranjo y col. [28] al diagnosticar *A. marginale* en vacunos del Ecuador, afirman que la presencia o ausencia de garrapatas no determina la positividad total del hemotrópico en los rebaños, por lo que existen otros factores que participan directamente en la dispersión de la rickettsia. Al igual que las garrapatas, los insectos hematófagos identificados en *B. bubalis* se han relacionado previamente como importantes vectores de *A. marginale* [6, 22]. Figueiredo y col. [16] afirman que los piojos del orden Anoplura representa un grupo de ectoparásitos de alto potencial epidemiológico para la transmisión de enfermedades. Durante la evaluación se identificaron piojos picadores *Haematopinus tuberculatus* en la mayoría de búfalas, su presencia alcanzó un considerable nivel de riesgo (OR= 1,42; 95% IC: 0,66-3,07) para la infección de *A. marginale* entre las búfalas lecheras muestreadas. Experiencias similares en Brasil discutidas por Da Silva y col. [12] al estudiar piojos positivos a *A. marginale*, apuntan a que esta vía de transmisión sea la fuente más importante para que *B. bubalis* adquiera *A. marginale*, debido a que *H. tuberculatus*

TABLA II

FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA PRESENCIA DE *Anaplasma marginale* EN REBAÑOS BUFALINOS LECHEROS

Factor de riesgo	N*	OR**	IC (95%)***
Presencia de garrapatas			
Sí	77	3,23	1,31-7,98
No	43		
Presencia de insectos hematófagos			
Si	75	1,42	0,66-3,07
No	45		
Uso de agujas contaminadas			
Si	110	1,10	0,81-1,35
No	10		
Aplicación de acaricidas tópicos			
Regular	90	0,83	0,39-1,78
Irregular	30		
Ivermectina como tratamiento antihelmíntico			
Si	70	1,16	0,53-2,55
No	50		

*Cada factor de riesgo fue cotejado en 120 animales

** Odds ratio

*** $\alpha=5\%$

es el ectoparásito de mayor densidad poblacional reportada en la superficie dérmica de estos animales. A partir del resultado obtenido se evidencia que la infestación del piojo *H. tuberculatus* en búfalos merece atención ($OR>1$) sanitaria por considerarse un vector de amplio alcance para la anaplasmosis en ganadería bufalina.

Otra forma frecuente de transmitir *A. marginale* es mediante el uso de fómites con sangre contaminada durante vacunaciones, transfusiones sanguíneas e intervenciones quirúrgicas [23]. Al evaluar el efecto del uso de una aguja colectiva, ésta se consideró como un factor de riesgo ($OR=1,10$; 95% IC: 0,81-1,35) importante para la transmisión de *A. marginale* en las explotaciones bufalinas visitadas. Al respecto Reinbold y col. [34] recomiendan al operario ser precavido durante las prácticas de control sanitario para evitar la inoculación injustificada de ganado, debido a que hay experiencias que reportan hasta 60% de animales positivos a *A. marginale* al utilizar material infectado experimentalmente. Sin embargo, se ha documentado que el estudio sobre la transmisión iatrogénica de anaplasmosis no es precisa sobre el número de animales que podrían infectarse con una inyección secuencial utilizando una única aguja [4].

En cuanto al uso frecuente de soluciones acaricidas tópicos (baños), se consideró como un elemento protector ($OR= 0,83$; 95% IC: 0,39-1,78) frente a la infección de *A. marginale* en los rebaños bufalinos evaluados, debido al efecto control que ejerce sobre las poblaciones de *R. microplus* y *H. tuberculatus*, ambos ectoparásitos asociados a la transmisión efectiva de *A. marginale*. Al respecto Da Silva [13] afirma que la regularidad en el uso de acaricidas garantiza en gran medida la ausencia de *A. marginale*

en vacunos de la zona alta brasileña; de igual forma Kispotta y col. [25] reportan un efecto satisfactorio del uso de baños acaricidas ($OR=0,23$) en el control de *A. marginale* de bovinos al sur de Asia. En *B. bubalis* igualmente se recomienda la aplicación de acaricidas como tratamiento efectivo contra ectoparásitos por ser transmisores de numerosos agentes etiológicos perjudiciales para la salud animal [11]. Finalmente, el empleo de ivermectinas como tratamiento antihelmíntico y ectoparasiticida en *B. bubalis* resultó un factor de riesgo ($OR=1,16$; 95% IC: 0,53-2,55) asociado a la positividad de *A. marginale*, tomando en cuenta que gran parte de la ganadería bufalina del trópico americano utiliza el fármaco [5]; sin embargo, investigaciones realizadas por Kispotta y col. [25] y Kocan [26], concluyeron que el uso de ivermectinas no influye sobre la positividad a *A. marginale*; más bien, la droga afecta el desarrollo de la garrapata sin generar efecto sobre el hemotrópico, favoreciendo la prevalencia de *A. marginale* a través de otros vectores resistentes.

CONCLUSIONES

En función de los hallazgos aquí reportados, la PCR demostró ser una herramienta acertada para el diagnóstico de *A. marginale* en ganado bufalino lechero debido a su alta sensibilidad y especificidad en comparación con el extendido sanguíneo. El alto porcentaje de hembras *B. bubalis* clínicamente sanas positivas a *A. marginale*, contribuyen a una mejor comprensión de los aspectos epidemiológicos del patógeno en la zona abordada, tomando en cuenta que los factores de riesgo de mayor impacto para la infección de *A. marginale* fue la presencia de *R. microplus* y *H. tuberculatus*, resultando el control de vectores como la práctica de manejo sanitario más efectiva para reducir el

porcentaje de positividad a *A. marginale*. Finalmente se evidencia que *B. bubalis* puede actuar como un importante reservorio del hemotrópico para los vacunos establecidos en la zona.

AGRADECIMIENTO

El presente aporte científico contó con el apoyo y participación de productores agropecuarios dedicados a la comercialización de leche cruda bufalina en el Eje Panamericano-Sur del Lago de Maracaibo, Venezuela. Los autores igualmente expresan su gratitud a los laboratorios de Biología Molecular del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA)-Mérida y Fitobiotecnología de la Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes-Mérida, Venezuela por el apoyo instrumental ofrecido durante la ejecución del trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABDELA, N.; IBRAHIM, N.; BEGNA, F. Prevalence, risk factors and vectors identification of bovine anaplasmosis and babesiosis in and around Jimma town, Southwestern-Ethiopia. **Acta Tropica**. 177:9-18. 2018.
- [2] AÑEZ-ROJAS, N.; ROMERO, O.; VALBUENA, H.; CRISANTE, G.; ROJAS, A.; BOLÍVAR, A.; AÑEZ, N. Detección de transmisión transplacentaria de *Anaplasma marginale* en bovinos asintomáticos. **Rev. Científ. FVC-LUZ**. XX(4):377-382. 2010.
- [3] ASHUMA, S.; SINGLA, L.; KAUR, P.; BAL, M.; BATT, B.; JUYAL, P. Prevalence and haemato-biochemical prolife of *Anaplasma marginale* infection in dairy animals of Punjab (India). **Asian Pac. J. Trop. Med**. 6(2):139-144. 2013.
- [4] AUBRY, P.; GEALE, D. A review of bovine anaplasmosis. **Transbound Emerg. Dis**. 58(1): 1-30. 2011.
- [5] BARBOSA DA SILVA, J.; VINHOTE, W.; OLIVEIRA, C.; ANDRÉ, M.; MACHADO, R.; DA FONSECA, A.; BARBOSA, J. Molecular and serological prevalence of *Anaplasma marginale* in water buffaloes in northern Brazil. **Ticks Tick Borne Dis**. 5(2): 100-104. 2014.
- [6] BATISTA, H.; SARTURI, C.; STELMACHTCHUK, F.; ROCHA, D.; CAROPREZO, A.; GENNARI, S.; MARCILI, A.; NIERI, F.; SOARES, L.; HAMAD, A. Prevalence and risk factors associated with ectoparasite infestation of buffaloes in an Amazonian ecosystem. **Parasit. Vectors**. 11(1): 1-9. 2018.
- [7] BOLÍVAR, A.; PÉREZ, C. Confirmación microbiológica y evaluación hematológica para *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp. en ganadería bovina de altura en los andes venezolanos. **Rev. Med. Vet**. 34: 45-53. 2017.
- [8] BOLÍVAR, A.; ROJAS, A.; ROSALES, D.; TORRES, Y.; GARCÍA-LUGO, P. Detección de agentes hemotrópicos en una explotación ganadera utilizando PCR y DGGE. **Rev. Salud Anim**. 36(1): 53-57. 2014.
- [9] CORONA, B.; MARTÍNEZ, S. Detección de *Anaplasma marginale* en bovinos, mediante la amplificación por PCR del gen msp5. **Rev. Salud Anim**. 33(1):24-31. 2011.
- [10] CORONA, B.; OBREGON, D.; MARTÍNEZ, S.; ESPINIZA, I.; HENRIQUE-FONSECA, A.; ROQUE, E. Detección por PCR de *Anaplasma marginale* en búfalos de la región occidental de Cuba. **Rev. Salud Anim**. 34(1): 11-18. 2012.
- [11] CORRÊA, F.; COSTA, N.; PASSOS, C.; HENRIQUE, A. Ticks on buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet. Jaboticabal** 21(3): 313-314. 2012.
- [12] DA SILVA, A.; LOPES, L.; STUMPF, J.; TONIN, A.; MOURA, L.; NUNES, D. Lice outbreak in buffaloes: evidence of *Anaplasma marginale* transmission by sucking louse *Haematopinus tuberculatus*. **J. Parasitol**. 99(3): 546-547. 2013.
- [13] DA SILVA, M. Prevalência e fatores associados à infecção por *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos da raça crioula lagaeana. Universidade do Estado de Santa Catarina. Lages-Brasil. Trabalho de graduação. 130 pp. 2017.
- [14] EL-HARIRI, M.; ELHELW, R.; HAMZA, D.; SOLIMAN, D. Molecular detection of *Anaplasma marginale* in the egyptian water buffaloes (*Bubalus bubalis*) based on major surface protein 1α. **J. Egypt. Soc. Parasitol**. 47(2): 247-252. 2017.
- [15] ERIKS, I.; PALMER, G.; MCGUIRE, T.; BARBET, A. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* in carrier by using a nucleic acid probe. **J. Clin. Microb**. 27(2):279-284. 1989.
- [16] FIGUEIREDO, M.; SILVA, D.; MANRIQUE, W.; GUERRA, R. Infestación y distribución de *Haematopinus tuberculatus* en bupalinos de São Luís, estado do Maranhão, Brasil. **The Biologist**. 11(1): 167-172. 2013.
- [17] FIGUEROA, V.; CHIEVES, P.; JOHNSON, S.; BUENING, M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Vet. Parasitol**. 50(1-2):69-81. 1993.
- [18] GONZÁLEZ, J.; MELÉNDEZ, R. Seroprevalencia de la Tripanosomosis y Anaplasmosis bovina en el municipio Juan José Mora del estado Carabobo, Venezuela, mediante la técnica de ELISA. **Rev. Científ. FVC-LUZ**. XVII(5): 449-455. 2007.
- [19] GREEN, M.; SAMBROOK, J. Quantitation of DNA and RNA by Real-Time Polymerase Chain Reaction. In: **Molecular cloning: a laboratory manual**. 4th. Ed. Cold

- Spring Harbor Laboratory Press. Pp. 633-638. 2012.
- [20] HOSMER, D.; LEMESHOW, S. Estimation of odds ratios in the presence of interaction. In: **Applied logistic regression**. 2nd Ed. Wiley Interscience, EUA. Pp. 74-79. 2000.
- [21] JACOBO, R.; CIPOLINI, M.; STORANI, C.; MARTÍNEZ, D.; MARTÍNEZ, E. Infección con el complejo tristeza del bovino en búfalos. **Rev. Med. Vet.** 85(5): 203-204. 2004.
- [22] JAIMES-DUEÑEZ, J.; TRIANA, O.; MEJÍA, A. Genetic, host and environmental factors associated with a high prevalence of *Anaplasma marginale*. **Ticks Tick Borne Dis.** 9(5): 1286-1295. 2018.
- [23] KESSLER, R. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesq. Vet. Bras.** 21(4): 177-179. 2001.
- [24] KHAN, M.; ZAHOR, A.; JAHANGIR, M.; ASHRAF, M. Prevalence of blood parasites in cattle and buffaloes. **Pakistan Vet. J.** 24(4):193-195. 2004.
- [25] KISPOTTA, S.; ISLAM, F.; HOQUE, F.; RAHMAN, S.; BORMAN, A.; HAQUE, A.; RAHMAN, R. Study of prevalence and associated risk factors of anaplasmosis and theileriosis in cattle. **Asian J. Med. Biol. Res.** 2(4): 567-576. 2016.
- [26] KOCAN, K. Targeting ticks for control of selected hemoparasitic diseases of cattle. **Vet. Parasitol.** 57(1-3): 121-151. 1995.
- [27] KOCAN, K.; STILLER, D.; GOFF, W.; CLAYPOOL, P.; EDWARDS, W.; EWING, S.; MCGUIRE, T.; HAIR, J.; BARRON, S. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from parasitemic to susceptible cattle. **Amer. J. Vet. Res.** 53(4): 499-507. 1992.
- [28] MEDINA-NARANJO, V.; REYNA-BELLO, A.; TAVARES-MARQUES, L.; CAMPOS, A.; RON-ROMÁN, J.; MOYANO, J.; JARRÍN-PORRAS, E.; SANDOVAL-MOREJÓN, E.; CHÁVEZ-LARREA, M. Diagnóstico de los hemotrópicos *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma* spp. y *Babesia* spp. mediante las técnicas de ELISA y PCR en tres fincas ganaderas de la Provincia de Pastaza, Ecuador. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XXVII(3): 162-171. 2017.
- [29] MUÑOZ-GUARNIZO, T.; AYORA-FERNÁNDEZ, P.; LUZURIAGA-NEIRA, A.; CORONA-GONZÁLEZ, B.; MARTÍNEZ-MARRERO, S. Prevalencia de *Anaplasma marginale* en bovinos de la provincia Zamora Chinchipe, Ecuador. **Rev. Salud Anim.** 39(1): 68-74. 2017.
- [30] NÉO, T. Níveis de infecção de *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* em búfalos criados no estado de São Paulo. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos-Brasil. Tese de Grado. 93 pp. 2016.
- [31] NOGUERA, E.; ABREU, O.; AZÓCAR, R.; ACOSTA, R. Comportamiento reproductivo de un rebaño mestizo indefinido en El Guayabo, Estado Zulia. **Rev. Fac. Agron. (LUZ).** 10:537-547. 1993.
- [32] OBREGÓN, D.; CORONA, B.; DE LA FUENTE, J.; CABEZAS, A.; GONÇALVES, L.; MATOS, C.; ARMAS, Y.; HINOJOSA, Y.; ALFONSO, P.; OLIVEIRA, M.; MACHADO, R. Molecular evidence of the reservoir competence of water buffalo (*Bubalus bubalis*) for *Anaplasma marginale* in Cuba. **Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.** 13:180-187. 2018.
- [33] OBREGÓN, D.; RODRÍGUEZ, J.; ROQUE, E.; ALEMÁN, Y. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) en búfalo (*Bubalus bubalis*), en Cuba. **Rev. Salud Anim.** 32(2): 132-134. 2010.
- [34] REINBOLD, J.; COETZEE, J.; HOLLIS, L.; NICKELL, J.; RIEGEL, C.; CHRISTOPHER, J.; GANTA, R. Comparison of iatrogenic transmission of *Anaplasma marginale* in Holstein steers via needle and needle-free injection techniques. **Am. J. Vet. Res.** 71(10): 1178-1188. 2010.
- [35] SAETIEW, N.; SIMKING, P.; INPANKAEW, T.; WONGPANIT, K.; KAMYINGKIRD, K.; WONGNAKPHEK, S.; STICH, R.; JITTAPALAPONG, S. Prevalence and genetic diversity of *Anaplasma marginale* infections in water buffaloes in Northeast Thailand. **J. Trop. Med. Parasitol.** 38(1): 9-16. 2015.
- [36] SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. *In vitro* amplification of DNA by the polymerase chain reaction. In: **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York-EUA. 2344 pp. 2001.
- [37] SHARMA, A.; SINGLA, L.; TULI, A.; KAUR, P.; BAL, M. Detection and assessment of risk factors associated with natural concurrent infection of *Trypanosoma evansi* and *Anaplasma marginale* in dairy animals by duplex PCR in eastern Punjab. **Trop. Anim. Health Prod.** 47(1): 252-257. 2015.
- [38] SILVA, J.; LOPEZ, C.; SOUZA, M.; GIBSON, A.; VINHOTE, W.; FONSECA, A.; ARAUJO, F.; BARBOSA-NETO, J. Detecção sorológica e molecular de *Anaplasma marginale* em búfalos na Ilha de Marajó, Pará. **Pesq. Vet. Bras.** 34(1):11-14. 2014.
- [39] SOUZA-AMORIN, L.; ARIAS, A.; SANTOS, F.; SOUZA-CARNEIRO, P.; RÊGO, G. Bovine babesiosis and anaplasmosis complex: diagnosis and evaluation of the risk factors from Bahia, Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol. Jaboticabal.** 23(3): 328-336. 2014.
- [40] STICH, R.; BANTLE, J.A.; KOCAN, K.M.; FEKETE, A. Detection of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in hemolymph of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) with the Polymerase Chain Reaction. **J. Med. Entomol.** 30(4):781-788. 1993.

- [41] TAMASAUkas, R.; AGUDO-CASTELLANOS, L.; SILVA-RAVELO, A.; FLORIO-LUIS, J.; VINTIMILLA-TAMASAUkas, M.; RIVERA-PIRELA, S. Hemoparasitosis en ganadería doble propósito venezolana, diagnóstico y control: una revisión. **Agron. Mesoamerican.** 21(2): 367-381. 2010.
- [42] TORIONI, S.; KNOWLES, D.; MCGUIRE, T.; PALMER, G.; SUÁREZ, C.; MCELWAIN, T. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. **J. Clin. Microbiol.** 36 (3):777-782. 1998.
- [43] [TRAMUTA, C.; LACERENZA, D.; ZOPPI, S.; GORRIA, M.; DONDO, A.; FERROGLIO, E.; NEBBIA, P.; ROSATI, S. Development of a set of multiplex standard polymerase chain reaction assays for the identification of infectious agents from aborted bovine clinical samples. **J. Vet. Diag. Inv.** 23(4): 657-664. 2011.
- [44] VENEZIANO, V.; SANTANIELLO, M.; CARBONE, S.; PENNACCHIO, S.; MORGOGNONE, M.; SCHIOPPI, M.; CONDOLEO, R.; CRINGOLI, G. Lice (*Haematopinus tuberculatus*) in water buffalo farms from central Italy. **Ital. J. Anim. Sci.** 6(Suppl. 2): 926-927. 2007.



REVISTA CIENTÍFICA

Vol, XXIX, N° 4

*Esta revista fue editada en formato digital y publicada en
Diciembre 2019, por La Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela.*

www.luz.edu.ve
www.serbi.luz.edu.ve
produccioncientifica.luz.edu.ve