

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**DETECCIÓN SEROLÓGICA Y MOLECULAR DE *Anaplasma platys*,
Anaplasma phagocytophilum y *Ehrlichia canis* EN MUESTRAS SANGUÍNEAS
DE PERROS (*Canis lupus familiaris*) EN MEXICALI, BAJA CALIFORNIA,
MÉXICO.**

**TESIS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**PRESENTA:
MVZ. DAYANNE PÉREZ GUILARDE**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ENRIQUE TRASVIÑA MUÑOZ**

MEXICALI BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

JUNIO DE 2023

Detección serológica y molecular de *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* y *Ehrlichia canis* en muestras sanguíneas de perros (*canis lupus familiaris*) en Mexicali, Baja California. Tesis presentada por Dayanne Pérez Guilarde, como requisito parcial para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobado por el siguiente comité:

Dr. Enrique Trasviña Muñoz
Director de Tesis

Dr. José Carlomán Herrera Ramírez
Co-director

Dr. Gilberto López Valencia
Sinodal

Dra. Ana Paulina Haro Álvarez
Sinodal

Dra. Karla Rossanet Dzul Rosado
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que contribuyeron de manera significativa en la realización de esta tesis. Su apoyo, orientación y dedicación han sido fundamentales para el éxito de este trabajo.

En primer lugar, quiero agradecer a mis sinodales por su tiempo, conocimientos y valiosos comentarios durante la evaluación de esta investigación. Sus aportes críticos y sugerencias constructivas han enriquecido considerablemente el contenido y la calidad de este estudio.

Mi más profundo agradecimiento a mi director de tesis el Dr. Enrique Trasviña Muñoz y codirector el Dr. Carlomán Herrera Ramírez, por su guía constante, paciencia y sabiduría a lo largo de todo el proceso de investigación. Su liderazgo y experiencias han sido fundamentales para la estructuración y desarrollo de esta tesis, y estoy enormemente agradecido por su apoyo incondicional.

No puedo dejar de reconocer a mis compañeros de maestría, quienes han sido una fuente de motivación, apoyo y camaradería a lo largo de estos años. Su colaboración, intercambio de ideas y debates enriquecedores han contribuido significativamente a mi crecimiento académico y personal.

DEDICATORIA

A mis queridos padres, quienes me han brindado su amor incondicional y han sido mi mayor fuente de inspiración, les dedico estas líneas con profundo agradecimiento. Su dedicación, sacrificio y perseverancia son ejemplos que siempre llevaré conmigo. Gracias por creer en mí y por apoyarme en cada paso del camino.

A mi amado hermano, compañero de aventuras y confidente, gracias por tu constante apoyo y por ser mi roca en los momentos difíciles. Nuestra complicidad y hermandad han sido un regalo invaluable.

A mis amigos, quienes han estado a mi lado durante esta etapa de mi vida, quiero expresar mi sincero agradecimiento. Karla y Carlomán agradezco nuestra amistad pues ha iluminado los días oscuros y ha hecho que las alegrías sean aún más especiales. Katya has sido mi red de apoyo, mi compañera de estudio y mi cómplice en las horas de descanso. Sus palabras de aliento, consejos y risas compartidas han sido un bálsamo para el alma. Gracias por estar siempre ahí.

A aquellos cuyas contribuciones y apoyo han dejado una huella imborrable en mi trayectoria académica, les dedico esta tesis. Sus palabras de sabiduría, consejos expertos y ánimo inquebrantable han sido fundamentales para mi crecimiento y desarrollo como persona. Su presencia en mi vida ha sido un regalo y estoy sinceramente agradecida por ello.

RESUMEN

Detección serológica y molecular de *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* y *Ehrlichia canis* en muestras sanguíneas de perros (*canis lupus familiaris*) en Mexicali, Baja California

El diagnóstico de los agentes transmitidos por vector en el ámbito clínico veterinario tales como *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *Dirofilaria immitis* y *Borrelia burgdorferi*, una de las pruebas más utilizadas es SNAP[®] 4Dx plus[®]. Se desconoce la presencia de *A. platys* y *A. phagocytophilum* y la prevalencia actual de *E. canis* en la población canina en el municipio de Mexicali. El objetivo del presente estudio es realizar una detección serológica y molecular de *A. platys*, *A. phagocytophilum* y *E. canis* en muestras sanguíneas de perros, así como determinar factores de riesgos asociados en Mexicali, Baja California. La duración del estudio fue de 8 meses donde muestras sanguíneas de perros provenientes de un laboratorio de diagnóstico veterinario de referencia sometidos a prueba serológica rápida de SNAP para posteriormente a las mismas muestras someterlas a prueba de qPCR. Se realizaron los análisis de Chi cuadrada y la razón de oportunidad (OR). El estudio reveló que existe una seroprevalencia *Ehrlichia spp.* del 50% (48/96), de *Anaplasma spp* fue de 4.1% (4/96). La prevalencia muestral diagnosticada a través de qPCR fue de 11.66% (7/60). Los perros mayores de 3 años tienen mayores probabilidades de presentar casos positivos a *E. canis*.

Palabras clave: Enfermedades Rickettsiales, diagnóstico, serología, qPCR.

ABSTRACT

Serological and molecular detection of *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in blood samples from dogs (*canis lupus familiaris*) in Mexicali, Baja California.

The diagnosis of vector-borne agents in the veterinary clinical setting such as *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *Dirofilaria immitis* and *Borrelia burgdorferi*, one of the most widely used tests is SNAP® 4Dx plus®. The presence of *A. platys* and *A. phagocytophilum* and the current prevalence of *E. canis* in the canine population in the municipality of Mexicali are unknown. The objective of the present study was to perform a serological and molecular detection of *A. platys*, *A. phagocytophilum* and *E. canis* in blood samples from dogs, as well as to determine associated risk factors in Mexicali, Baja California. The duration of the study was 8 months where blood samples from dogs from a reference veterinary diagnostic laboratory were subjected to a rapid serological test for SNAP and then to a qPCR test. Chi-square and odds ratio (OR) analyses were performed. The study revealed an *Ehrlichia spp.* seroprevalence of 50% (48/96) and *Anaplasma spp.* seroprevalence of 4.1% (4/96). The sample prevalence diagnosed by qPCR was 11.66% (7/60). Dogs older than 3 years are more likely to present *E. canis* positive cases.

Key words: Rickettsial Diseases, diagnosis, serology, qPCR.

CONTENIDO

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
CONTENIDO	V
LISTA DE CUADROS	VIII
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Ehrlichiosis canina	4
Características generales	4
<i>Epidemiología</i>	4
<i>Etiología</i>	6
<i>Patogenia</i>	6
<i>Presentación clínica en perros y humanos</i>	8
<i>Diagnóstico</i>	9
<i>Evaluación de sangre periférica</i>	10
<i>Serología</i>	10
<i>Pruebas moleculares</i>	11
<i>Factores de riesgo</i>	12
Anaplasmosis canina	14
Características generales	14

<i>Epidemiología</i>	14
<i>Etiología</i>	16
<i>Patogenia</i>	17
<i>Diagnóstico</i>	18
<i>Evaluación de sangre periférica</i>	19
<i>Serología</i>	19
<i>Pruebas moleculares</i>	20
<i>Factores de riesgo</i>	21
Prevencción y control de Ehrlichiosis y Anaplasmosis	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
JUSTIFICACIÓN	27
OBJETIVOS	28
Objetivo general	28
Objetivos específicos	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Área del estudio	29
Duración del estudio	29
Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	29
Tamaño de muestra	29
Variables	29
Metodología	31
<i>Extracción de ADN</i>	33
<i>Oligonucleótidos</i>	33

<i>Estandarización</i>	35
<i>Protocolo de prueba de PCR tiempo real</i>	36
Análisis estadístico	37
RESULTADOS	38
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	43
LITERATURA CITADA	44

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1.	Variables de evaluación	30
	Características de los oligonucleótidos para la detección de	
	Características de los oligonucleótidos para la detección de	
2.	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> , <i>Borrelia burgdorferi</i> y de una región homóloga para <i>Ehrlichia chaffeensis</i> y <i>Ehrlichia canis</i>	35
	Optimización de reactivos, concentración y volumen final para	
3.	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> y de una región homóloga para <i>Ehrlichia chaffeensis</i> y <i>Ehrlichia canis</i>	36
	Género y frecuencia de patógenos detectados mediante	
4	SNAP 4DXPlus en muestras sanguíneas de perros sospechosos a enfermedad rickettsial de un laboratorio de referencia en Mexicali, Baja California, México.....	39
	Resultados qPCR a <i>Anaplasma phagocytophilum</i> , <i>Borrelia</i>	
5	<i>burgdorferi</i> , <i>Rickettsia rickettsi</i> y de una región homóloga para <i>Ehrlichia chaffeensis</i> y <i>Ehrlichia canis</i>	39
6	Factores de riesgo asociados a la presencia de <i>E. canis</i> respecto a las pruebas serológicas.....	40

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por vector constituyen un problema de interés en los últimos años en la práctica clínica veterinaria y salud pública en general, debido a que la mayoría de las enfermedades transmitidas por vector son de carácter zoonótico. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud estas enfermedades constituyen más del 17% del total de las enfermedades infecciosas. Son la causa de más de 700,000 defunciones en el mundo cada año en personas. Entre los principales vectores destacan las garrapatas como parásitos hematófagos artrópodos transmisores de patógenos del orden Rickettsiales tales como: *Anaplasma phagocytophilum* (*A. phagocytophilum*), *Anaplasma platys* (*A. platys*), *Ehrlichia canis* (*E. canis*) y *Ehrlichia chaffeensis* (*E. chaffeensis*) a humanos, animales domésticos y silvestres. Las enfermedades rickettsiales provocan signología inespecífica como letargia, inapetencia, pérdida de peso y fiebre, haciendo complicado su diagnóstico clínico, por lo que es de suma importancia realizar una detallada anamnesis y proceder con pruebas de diagnóstico confirmatorias (Rodríguez-Vivas et al., 2016; OMS, 2020).

En diversos estudios nacionales y estatales se ha determinado que en la zona Norte del país se encuentran las prevalencias más altas de estas enfermedades. De acuerdo con el boletín epidemiológico de México en Baja California desde el año 2015 hasta el 2020 se han registrado 173 casos humanos por *Rickettsia* representando un 22.43% del total reportado a nivel nacional (Sosa et al., 2013; Movilla et al., 2016; SINAVE, 2020).

Para el diagnóstico laboratorial de agentes transmitidos por garrapata como *A. platys*, *A. phagocytophilum*, *E. canis*, *Dirofilaria immitis* y *Borrelia burgdorferi* una de las pruebas más utilizadas es SNAP® 4Dx plus®, basada en la detección de anticuerpos, debido a su practicidad y capacidad para evaluar varios patógenos simultáneamente. Sin embargo, tiene por principal desventaja una identificación no específica debido a la reacción cruzada entre las especies: *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *E. canis* y *E. chaffeensis*. Las pruebas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se caracterizan por su alta sensibilidad, reproductibilidad y confiabilidad; amplificando secuencias específicas de ADN identificando la existencia y cantidad del patógeno, convirtiéndose en el método de elección de muchos investigadores en estudios experimentales (O'Connor et al., 2006; Eberts et al., 2011; Dolz et al., 2013; Tamay et al., 2013).

La interpretación de los resultados en pruebas serológicas comerciales puede llegar a ser complicada debido a que un animal (perro) positivo, pueda realmente no estar cursando la enfermedad, aunado a las reacciones cruzadas que se presentan, al desconocimiento sobre la presencia de *A. platys* y *A. phagocytophilum* y la prevalencia actual de *E. canis* en la población canina en el municipio de Mexicali, pudiendo afectar la capacidad diagnóstica de la misma (Sainz et al., 2015). Las pruebas moleculares también presentan desventajas tales como: requerimiento de una cantidad mínima de material genético para detectar el patógeno y sí el diseño de los oligonucleótidos es o no adecuado, lo que podría afectar la detección del patógeno apropiadamente (Sykes y Green, 2013; Stillman et al., 2014).

El objetivo del presente estudio es realizar una detección serológica y molecular de *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* y *Ehrlichia canis* en muestras sanguíneas de perros, así como determinar factores de riesgos asociados en Mexicali, Baja California

REVISIÓN DE LITERATURA

Ehrlichiosis canina

Características generales

La ehrlichiosis monocítica canina (EMC) causada por el agente etiológico *Ehrlichia canis*, es una bacteria cocoide gramnegativa. Transmitida por garrapatas, *Rhipicephalus sanguineus* su principal vector es conocida también como garrapata marrón del perro. Dado que el vector tiene la capacidad de parasitar a otras especies, incluida la humana; este al igual que otros agentes infecciosos son de importancia en estudios veterinarios y zoonóticos (Dantas-Torres, 2010; Waner y Harrus, 2013; Pat et al., 2015).

Epidemiología

La EMC ha sido reportada en todo el mundo y las frecuencias más altas se reportan en las regiones tropicales y subtropicales, transmitidas principalmente por *Rhipicephalus sanguineus*. Recientemente en Egipto se hizo la primera caracterización molecular y se determinó una prevalencia del 9.7%, en Cuba un 62%, España un 4.26% e India el 16.1% todas ellas en perros (Rodríguez et al., 2015; Díaz et al., 2020; Manoj et al., 2020; Montoya et al., 2020; Selim et al., 2020).

En Perú se realizó un estudio donde se determinó una seropositividad del 23.3% en 90 muestras de suero tomadas en personal de clínicas veterinarias y personas en contacto con perros EMC, Hoyos (2013) en el mismo año determinó una seropositividad en 2 grupos "A" 20% (20/100) y "B" 14% (14/100) los cuales

estaban integrados por personal relacionado a la práctica veterinaria y propietarios de perros respectivamente. Bouza-Mora et al. (2017) analizaron 280 muestras sanguíneas de un banco de sangre en Costa Rica registrando una prevalencia del 3.6% (10/280) de *E. canis* confirmados por secuenciación. En el 2014 una mujer de 30 años con ocupación estilista de perros residente del estado de Oaxaca menciona haber sufrido en 2 ocasiones mordeduras por garrapatas de perros que ella cuidaba y bañaba. (Paulino et al., 2013; Silva et al. 2014).

En México se han realizado estudios nacionales que han involucrado diferentes entidades federativas obteniendo diversos resultados, Movilla et al. (2016) obtuvieron una seroprevalencia del 18.69% en sangre de perros sospechosos y sanos de 74 centros veterinarios del país; en el mismo año Sosa et al. (2016) registraron una prevalencia del 16% en garrapatas recolectadas en vegetación, animales domésticos y salvajes además de humanos en este último no encontrando ningún caso positivo. Otro estudio realizado en roedores arrojó un 9.6% de prevalencia para *E. canis* de 31 sitios de recreación (incluidos parques nacionales y ecoturísticos) del centro y sur del país distribuidas en 11 entidades federativas de México (Sosa et al., 2014).

En Yucatán por medio de la técnica de PCR anidada se registró una prevalencia de 36% en sangre de perros, 18.5% en garrapatas y sólo 4% con detección de mórulas en frotis sanguíneos. Por otra parte, en el estado de México al emplear una prueba serológica encontraron una seropositividad del 30%. En Coahuila se registró una prevalencia del 4% a través de PCR en sangre de perro, sin embargo, el autor menciona que durante el muestreo se registraron

temperaturas de hasta -5°C en promedio, lo cual podría afectar significativamente el ciclo biológico del vector y por ende la prevalencia del patógeno (Pat-Nah et al., 2015; Almazán et al., 2016; Clímaco et al., 2020).

Sosa et al. (2013) registraron una seroprevalencia en el estado de Sinaloa del 74.5% en sangre de perros de centros veterinarios del municipio de Culiacán, por otra parte en la frontera con Estados Unidos del estado de Baja California Tinoco-Gracia et al. (2007) realizaron un estudio piloto para determinar la seroprevalencia de *E. canis* en la región concluyendo en un 49.3%, sin embargo, en el mismo año Haro-Álvarez et al. (2007) estimó una seroprevalencia del 21.6% en muestras sanguíneas de perros de clínicas veterinarias en el municipio de Mexicali, Baja California.

Etiología

Ehrlichia canis es agente etiológico de ehrlichiosis monocítica canina, es una bacteria cocoide pleomórfica gramnegativa intracelular obligada, su forma infectante se presenta en grupos llamados mórula de forma intracitoplasmática en leucocitos mononucleares. Esta bacteria carece de componentes en la membrana celular como lipopolisacáridos y peptidoglicanos. Sin embargo, presentan una gran cantidad de colesterol proveniente de la célula huésped que contribuyen en la supervivencia de la bacteria.

Patogenia

En perros, este microorganismo se reproduce solamente en el citoplasma de monocitos y linfocitos sanguíneos además de macrófagos tisulares formando

micro-colonias dentro de una vacuola intracelular (mórula). En garrapatas la infección se localiza en el intestino medio y glándulas salivales (Straube 2010; Rodríguez et al., 2015).

Adhesión, internalización y proliferación intracelular, seguidas de la exocitosis y propagación intercelular son etapas en el proceso de invasión del patógeno en células blanco del huésped. Se han descrito varias proteínas localizadas en la membrana externa del agente como la glicoproteína (gp) 19, 36 y 140, mismas que se asocian a la adhesión e internalización en las células del huésped (Nethery et al., 2007; McBride y Walker, 2011).

Se han documentado diversos mecanismos de evasión inmune en el género de *Ehrlichia* como la inhibición del tráfico bacteriano hacia los lisosomas y formación de fagolisosomas a través de fusión lisosomal, disminución de especies reactivas de oxígeno (radicales libres y peróxidos), inhibición de la apoptosis en células del huésped, una disminución en la regulación de receptores de histocompatibilidad mayor clase II (MCH II) de macrófagos y recombinación de genes en proteínas de la membrana externa (McBride y Walker, 2011; Liu et al., 2012).

E. canis es capaz de modular la respuesta inmunitaria innata del huésped; puesto que la gp 200 contiene numerosas repeticiones de anquirina, proteína que se transloca al núcleo de monocitos infectados y tiene el potencial de facilitar la activación intracelular de las vías de señalización del huésped, lo que da lugar a un deterioro de las defensas antimicrobianas. También se ha documentado y demostrado que la polimerización del citoesqueleto de actina y la presencia de

calcio y hierro in vitro está implicada en el proceso de propagación intercelular (Nethery et al., 2007; Alves et al., 2014).

Por otra parte, *E. chaffeensis* en humanos se caracteriza por no estimular la producción de IL-12, IL-15 e IL-18 (Zhang et al. 2004). Estas participan en la estimulación de células asesinas naturales y linfocitos T citotóxicos para producir interferón gamma (IFN- γ), el cual tiene la función de activar a macrófagos para la eliminación de bacterias fagocitadas, mientras que linfocitos T citotóxicos y células asesinas naturales eliminan células infectadas con bacterias intracelulares, resultando una evasión de la inmunidad innata y adaptativa del huésped (Yu y Walker, 2016).

La evolución del ciclo de vida intracelular de *E. canis*, ha eliminado genes que codifican componentes de la pared celular que estimulan fuertemente a receptores de reconocimiento patrones (RRP), incluyendo lipopolisacáridos y peptidoglicanos. Debido a la falta de estos componentes en la pared celular, organismos de *Ehrlichia* no son reconocidos por los RRP y no estimulan las citoquinas proinflamatorias (Perez et al., 2006; Yu y Walker, 2016).

Presentación clínica en perros y humanos

Hallazgos encontrados en estudios patológicos y moleculares han indicado que está ampliamente distribuido en los órganos de perros infectados, por lo que los clínicos deben ser conscientes que la infección por *E. canis* puede causar una gran variedad de manifestaciones clínicas y deben considerarse a la hora de realizar el diagnóstico. La enfermedad suele tener curso asintomático en

circunstancias favorables, de igual forma ésta puede cursar una forma aguda o crónica. La primera en EMC suele caracterizarse por cuadros de fiebre, apatía, debilidad y síntomas respiratorios además de claudicación y alteraciones en la hemodinamia de la coagulación (Procajlo et al., 2011; Waner y Harrus, 2013).

Se han reportado casos asintomáticos y severos de *E. canis* en humanos todos con historial de mordedura de garrapata, caracterizada por presentar sintomatología cuando hay inmunosupresión, por ejemplo, después de una esplenectomía o en personas con síndrome de inmunodeficiencia adquirida. (Silvia et al., 2014).

Diagnóstico

La EMC no es fácilmente reconocida clínicamente, dificultando su diagnóstico principalmente por la variabilidad en la signología, debe sospecharse cuando existen antecedentes compatibles como: vivir o viajar a una región endémica, exposición previa a garrapatas, signos clínicos típicos o anomalías hematológicas y bioquímicas características (Harrus y Waner, 2011; Rodríguez et al., 2015).

Las manifestaciones clínicas y las técnicas de diagnóstico tradicionales para la ehrlichiosis monocítica canina (EMC) no permiten una identificación específica de la especie. Estas incluyen el diagnóstico hematológico y la observación de mórulas de *E. canis* en los monocitos en los frotis sanguíneos. Sin embargo, se ha demostrado que las pruebas de diagnóstico más sensibles y específicas son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la serología,

utilizando antígenos específicos. Es importante tener en cuenta que, al interpretar los resultados, la relación entre la enfermedad y la respuesta inmunitaria puede no ser la más precisa debido a la presencia de anticuerpos de reacción cruzada (Allison y Little, 2013; Rodríguez et al., 2015).

Evaluación de sangre periférica: es un método diagnóstico que consta de la tinción de un frotis de sangre periférica, con el fin de buscar mórulas en monocitos del huésped mediante microscopía. Sin embargo, el método presenta algunas desventajas, como la posibilidad de no encontrar siempre mórulas en animales positivos atribuido principalmente a la baja bacteriemia debido a que las mórulas se pueden observar únicamente durante la fase aguda de la enfermedad, cuando la bacteria se multiplica en micro-colonias dentro del citoplasma de las células blanco (Badillo et al., 2017; Bai et al., 2017; Derakhshandeh et al., 2017; Ybañez et al., 2018).

Happi et al. (2018) reportaron que este método diagnóstico posee una baja sensibilidad (70%) respecto a otras pruebas diagnósticas, cuando de un total de 116 perros al evaluar frotis sanguíneos en busca de mórulas y posteriormente evaluar las mismas muestras con PCR, en los resultados se identificó que un 10.3% (12/116) de las muestras fueron positivas mediante evaluación microscópica, mientras por PCR, un 36.2% (42/116).

Serología: La utilización de pruebas serológicas comerciales para el diagnóstico de EMC resulta efectiva, Stillman et al. (2014) realizaron un experimento de rendimiento de una prueba de ELISA, la cual obtuvo parámetros de sensibilidad y especificidad para su diagnóstico de 97.8% y 92.3%

respectivamente, este método diagnóstico utiliza antígenos peptídicos de proteínas inmunodominantes de la membrana externa p30 y p30-1 de *E. canis*.

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección del patógeno en cuestión, presenta parámetros de sensibilidad y especificidad que pueden superar incluso el 90%, pero presenta la desventaja de reactividad cruzada entre los diferentes miembros de la familia *Anaplasmataceae* impidiendo la especiación del agente infeccioso en cuestión (Piantedosi et al., 2017; Zetina et al., 2019).

Pruebas moleculares: PCR se caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad y reproductibilidad, que consiste en la detección de secuencias de ácidos nucleicos característicos para confirmación de la presencia de *E. canis* y otros patógenos. Por ello, se ha convertido en el método de elección de muchos investigadores para identificación de este y otros patógenos transmitidos por picadura de garrapatas (Allison y Little, 2013; Tamay et al., 2013; Shen et al., 2018).

Existen diversos genes diana que se han empleado para la detección del patógeno como p28, p30, 16S ARNr y enzimas formadoras de puentes de disulfuro (dsb), dentro de los más utilizados son amplificadores para el gen 16S ARN y gen codificante para la proteína p30, el PCR en tiempo real (q-PCR) a diferencia del convencional o punto final permite la cuantificación de la carga bacteriana y se ha utilizado en experimentos de perros inoculados y que cursaron naturalmente la enfermedad para demostrar la eliminación del patógeno después de su tratamiento (Baneth et al., 2009; Harrus y Waner, 2011).

Maazi et al. (2014) realizaron un estudio para determinar la seroprevalencia de *E. canis* en la población canina de Irán, recolectaron 240 muestras sanguíneas de perros analizadas mediante IFA en primera instancia para detectar anticuerpos, posteriormente, se realizó una reacción de tipo PCR anidada basada en un fragmento del gen 16S rRNA de *E. canis* en las muestras serológicamente positivas dando como resultado que un 16,6% (40/240) de los perros presentaban anticuerpos y un 22,5% (9/40) contenían ADN de *E. canis*, confirmado por secuenciación, lo cual demuestra una diferencia de más del 75% los cuales fueron atribuidos a previa exposición a la enfermedad por parte de los perros sólo seropositivos y probable curso crónico de los animales con niveles por debajo de los límites de detección del PCR.

Díaz et al. (2020) determinaron la prevalencia de enfermedades transmitidas por vectores potencialmente zoonóticas de un refugio en Cuba, de 100 muestras tomadas y analizadas por q-PCR un 62% dieron positivo a *E. canis* mientras que en un 41% fue en coinfección con *A. platys*.

Factores de riesgo

Con relación a la asociación de la ehrlichiosis monocítica canina (EMC), se han considerado variables como la edad, el sexo y la raza. Sin embargo, aún existen controversias respecto a si estas variables deben ser consideradas factores de riesgo. Varios autores coinciden en que no se ha encontrado asociación entre la infección por *Ehrlichia canis* y el sexo, la edad, la condición corporal y la presencia de trombocitopenia en perros (Azevedo et al., 2011; Guedes, 2015; Pat-Nah et al., 2015; Navarrete et al., 2018). "Sin embargo, otros

estudios concluyen que la edad (perros adultos), es el único factor de riesgo dado el caso de Ojeda-Chi et al. (2019) registraron una asociación significativa ($P=0.022$; OR: 2.41; IC 95%) en el estado de Yucatán, mientras que en Quintana Roo los perros de 1-3 años y mayores a 3 años tienen 7.7 y 15.39 mayores probabilidades de ser positivos (Martínez et al., 2016). Los perros adultos cuentan con mayores oportunidades de encontrarse expuestos al vector que uno joven, puesto que los dueños no suelen sacar a pasear a sus mascotas hasta que completan su esquema de vacunación y/o consideran que tienen un menor riesgo de enfermarse concluyeron Huerta y Damásio (2015) al realizar su estudio y encontrar un valor significativo ($P=0.038$; OR: 1.92; IC 95%) de asociación con la edad de los perros y la presentación de la enfermedad.

Otra variable asociada es el historial de infestación por garrapatas, Guedes et al. (2015) en el norte de Brasil ($P=0.0211$; OR: 1.72; IC 95%) y Martínez et al. (2016) en Yucatán ($P=0.023$; OR: 3.13; IC 95%) determinaron que la presencia de garrapatas o el historial de infestación por las mismas tiene un valor significativo que los hace más probables a ser contagiados.

Condiciones menos asociadas, pero aun así presentes son el tipo de vivienda, contacto con otros perros y presas, Azevedo et al. (2011) concluyeron que el tipo de vivienda semiconfinado-libre ($P=0.023$; OR: 6.24; IC 95%), al igual que el contacto con otros perros ($P=.007$; OR: 3.54; IC 95%) son condiciones predisponentes a una mayor probabilidad de infección puesto que el perro puede tener contacto con perros de la calle (vida libre) que no se someten a ningún tipo de tratamiento o medida de control hacia el vector.

Anaplasmosis canina

Características generales

Las anaplasmosis más comunes en los perros son la granulocítica canina y la trombocitopénica cíclica canina, las cuales son causadas por *A. phagocytophilum* y *A. platys*, respectivamente. Estas enfermedades afectan a diversas especies, como perros, humanos, caballos y rumiantes domésticos, como ovejas, vacas y cabras. Además, también pueden encontrarse en una amplia variedad de especies de animales salvajes, incluyendo zorros, roedores y ciervos, que actúan como reservorios. Los principales vectores de estos patógenos son las garrapatas de los géneros *Ixodes* y *Rhipicephalus sanguineus*, respectivamente (Sykes y Foley, 2013).

Epidemiología

Ghosh et al (2020) evaluaron mediante PCR anidada el ADN de garrapatas removidas de perros y gatos por veterinarios de los 50 estados de Estados Unidos de América, de un total de 500 muestras 11 fueron positivas a *A. phagocytophilum* todas ellas identificadas en *Ixodes scapularis*, concluyeron en su estudio que la prevalencia de *A. phagocytophilum* en garrapatas de género *Ixodes* es del 2.2%.

En Panamá se realizó un estudio donde recolectaron y analizaron 384 muestras sanguíneas de perros y por medio de PCR determinaron una prevalencia para *A. platys* del 10.67% (41/384). Por otra parte, en Taiwán mediante recolección de 175 muestras sanguíneas de perros y 306 garrapatas

que posteriormente fueron analizadas mediante PCR, un 26.9% (47/175) en muestras sanguíneas fueron positivas a *A. platys* y un 23.2% (71/306) en garrapatas (Yuasa et al 2017; Pérez-Machi et al 2019).

Maggi et al. (2013) reportaron que, durante un periodo de dos años una mujer de 27 años experimentó sintomatología de migrañas, convulsiones, incluido el estado epiléptico, la mujer declaró haber estado en contacto con vectores como pulgas, garrapatas y piojos además de haber sido arañada o mordida por perros, gatos, reptiles, conejos y roedores puesto que ejercía dentro del campo de medicina veterinaria, a partir de muestras sanguíneas se amplificó y secuenció el ADN de *A. platys*. Un año después Arraga et al. (2014) informaron de dos casos más de infección por *A. platys* en Venezuela que se identificaron inicialmente mediante la visualización de cuerpos de inclusión intraplaquetarios en 2 mujeres una de 29 años y otra de 50 ambas con antecedentes de exposición peri-doméstica a garrapatas.

Sosa et al. (2016) registraron una prevalencia del 21.1% de *A. phagocytophilum* en garrapatas recolectadas en vegetación, animales domésticos, salvajes y humanos en México. Otro estudio realizado a nivel nacional 1,706 muestras sanguíneas de perros fueron analizadas, el porcentaje de infección por *Anaplasma spp.* fue del 16.4% localizándolas en la región noroeste del país (Movilla et al. 2016).

En México, la prevalencia estimada de *A. phagocytophilum* por Aguilar et al. (2020) en el estado de Querétaro al evaluar 92 muestras de suero a partir de sangre de ratones (*Rattus rattus* y *Peromyscus mexicanus*) fue del 100%, sin

embargo, al realizar un análisis mediante PCR la prevalencia determinada fue del 36.95% (34/92). Por otro lado, en el estado de México, Clímaco et al (2019) calcularon una seroprevalencia en sangre de perros del 9% (9/100) de *A. phagocytophilum*. En el caso de Campeche al analizar mediante PCR 44 muestras sanguíneas de perros se determinó una prevalencia del 27% (Rojero et al. 2017).

En el estado de Coahuila Almazán et al. (2016) registraron una prevalencia del 4% (4/100) de *A. phagocytophilum* a través de la prueba molecular PCR en sangre de perros, sin embargo, el autor menciona que durante el muestreo se registraron temperaturas de hasta -5°C en promedio, lo cual podría afectar significativamente el ciclo biológico del vector y por ende la prevalencia del patógeno. Así mismo, Escárcega et al. (2018) determinaron una prevalencia del 27% al analizar 30 muestras sanguíneas de perros en Chihuahua mediante PCR y un 13% en garrapatas las cuales fueron colectadas 5 por cada individuo; mientras que en la ciudad de Mexicali un niño de 33 meses le fue identificado por medio de aspiración de médula ósea inclusiones intracitoplasmáticas en granulocitos, posterior a ello confirmado *A. phagocytophilum* a través de PCR (Soria et al. 2019).

Etiología

Anaplasma platys y *Anaplasma phagocytophilum* son bacterias gram-negativas, transmitidas por vectores, intracelulares obligados causantes de Anaplasmosis canina. *A. phagocytophilum* infecta a los eosinófilos y neutrófilos

formando mórulas en el citoplasma de estos, mientras que *A. platys* dentro de plaquetas.

Patogenia

A. phagocytophilum infecta a neutrófilos y líneas celulares mieloides, endoteliales en el huésped y garrapatas mientras que *A. platys* tiene tropismo por plaquetas residiendo ambas dentro de una vacuola derivada de la célula infectada, la cual es indispensable para su supervivencia. Durante la mordedura de la garrapata se induce la liberación de IL-8, esta quimiocina recluta neutrófilos al lugar de infección, que pueden ser posteriormente objetivos de la invasión y propagación microbiana. Al invadir la célula huésped, disminuye la migración de neutrófilos lo que, a su vez, inhibe la señalización de inflamación y facilita el establecimiento de la infección por el patógeno dentro de un huésped mamífero (Huang et al., 2010a; Lamason y Welch, 2017).

Durante la replicación intracelular, *A. phagocytophilum* interactúa con muchos componentes de la célula huésped, incluido el citoesqueleto de actina, modulándolo y reduciendo los haces de actina e inhibiendo la polimerización de esta, para así dar entrada al patógeno. Una vez formada la vacuola, se expresan proteínas derivadas de la célula huésped, dando lugar a estructuras únicas que son óptimas para la supervivencia del patógeno, una de ellas es APH_1387 también llamada P100 la cual es una proteína que se asocia con la membrana vacuolar ocupada por *A. phagocytophilum*, asociada en el secuestro de las vías de señalización del huésped, adhesión y evasión inmunitaria para la supervivencia intracelular (Huang et al., 2010b; Tang et al., 2020).

La vacuola donde se encuentran no está totalmente aislada de la célula huésped, ya que recluta moléculas asociadas con el tráfico de membranas para camuflaje y conseguir la nutrición necesaria para la supervivencia del patógeno. *A. phagocytophilum* no produce colesterol, en su lugar, el colesterol del huésped mamífero es tomado por el patógeno para promover la estabilidad de la membrana, el crecimiento y supervivencia. Un estudio demostró la implicación de la vía Niemann-Pick tipo C1 (NPC1) en la captura de colesterol y generación de membranas, donde NPC1 es una proteína transmembrana endosomal que participa en el transporte celular de colesterol por lo que es necesaria para la biogénesis de la membrana de inclusión bacteriana y supervivencia intracelular (Rikihisa, 2011; Xiong y Rikihisa, 2012).

Éstos patógenos subvierten la apoptosis de neutrófilos y la autofagia, regulando la expresión de genes antiapoptóticos, también inhibe respuestas oxidativas e inflamatorias para promover su persistencia ya que las inclusiones muestran una serie de marcadores de autofagosomas y no maduran en autolisosomas. La proteína AnkA se transloca al núcleo de la célula huésped, interactúa con regiones reguladoras de genes de la cromatina del huésped y está implicada en la regulación a la baja en la expresión de especies reactivas de oxígeno (García-García et al., 2009; Rikihisa, 2010; Severo et al., 2012).

Diagnóstico

La anaplasmosis canina no es una enfermedad fácil de diagnosticar, debido a que su presentación clínica puede variar por diversas razones, tales

como el huésped afectado y factores como su estado inmunitario y posibles coinfecciones (Silaghi et al., 2017).

Evaluación de sangre periférica: el método más simple, económico y rápido es el examen de frotis sanguíneo el cual es altamente recomendado tras haber hallado alguna alteración hematológica y contar con el historial de mordedura por garrapata. La evaluación de frotis sanguíneo tiene una baja sensibilidad debido a que el estadio de mórula en *A. platys* sólo puede detectarse en la fase inicial de la infección (7-14 días) (Faizal et al., 2019).

En cuanto a *A. phagocytophilum* morfológicamente sus mórulas son indistinguibles de las inclusiones formadas por *E. ewingii*, también pueden confundirse con artefactos de tinción; Por tanto, es necesario emplear otras técnicas de diagnóstico para su confirmación, más aún si el paciente no tiene manifestaciones clínicas típicas de la enfermedad y anomalías de laboratorio asociadas a anaplasmosis (Sykes y Green, 2013).

Serología: se suelen utilizar pruebas serológicas como inmunofluorescencia indirecta (IFI), prueba de diagnóstico para la detección de anticuerpos relativamente específica y así identificar perros expuestos a los agentes *A. phagocytophilum* y *A. platys*, sin embargo, su principal desventaja es la presencia de reacción cruzada entre miembros del mismo género (Sykes y Green, 2013).

ELISA es otra prueba serológica utilizada, siendo la más empleada debido su practicidad, a partir de muestras de suero, plasma y/o sangre entera

con anticoagulante; capaz de evaluar varios patógenos transmitidos por vectores y brinda un rápido resultado. La principal desventaja es la interpretación que el médico haga a partir de los resultados, puesto que la seropositividad en casos de *Anaplasma spp.* no permite especificar la especie del agente debido a la existencia de reacción cruzada entre *A. phagocytophilum* y *A. platys*. Otra desventaja es que su seropositividad o seronegatividad no significa necesariamente la presencia o ausencia del agente, sino la previa exposición y persistencia o cantidad insuficiente de anticuerpos detectables en sangre respectivamente, lo anterior observado principalmente en la fase aguda de la infección, en cuanto a su sensibilidad y especificidad para *A. phagocytophilum* 92.0% y 98.0% respectivamente, en el caso de *A. platys* 89.4% y 96.0% sus valores para sensibilidad y especificidad respectivamente (Eberts et al., 2011; Sainz et al., 2015).

Pruebas moleculares: el método de PCR hace posible la detección de infecciones activas de anaplasmosis porque este puede amplificar directamente la presencia de *A. platys* o *A. phagocytophilum* basándose en los genes diana 16S rRNA, groEL o msp2 y no anticuerpos. Es una herramienta de diagnóstico más sensible que la búsqueda de mórulas circulantes y proporciona una confirmación fiable de la especie a diferencia de las pruebas diagnósticas anteriormente mencionadas (Sykes y Green, 2013).

Otra ventaja de técnicas de diagnóstico basadas en ADN es la detección temprana de la infección, puesto que en el caso de perros infectados por *A. phagocytophilum* se obtienen resultados positivos a PCR de 6 a 8 días antes de

la primera aparición de mórulas en sangre periférica. Un estudio experimental demostró la presencia de ADN de *A. phagocytophilum* y *A. platys* a los 2 y 3 días post infección, respectivamente; por otro lado, es limitada cuando las infecciones se tornan crónicas y la bacteriemia suele ser baja (Sykes y Green, 2013; Moroff et al., 2014).

Factores de riesgo

Un estudio realizado en Paraguay demostró que una mayor cantidad de perros en el mismo hogar fue asociada significativamente (P= 0.036; OR: 2.03; IC95%) de contraer una infección por *A. platys*, al igual que no tratar a sus perros con ectoparasiticida (P= 0.043; OR: 2.02; IC 95%) (Pérez-Machi et al. 2019).

Uno de los factores de riesgo más reportado es la infestación por garrapatas, Acosta et al. (2020) determinaron una asociación significativa al evaluar en 3 grupos el grado de infestación donde el primero poseía de 1-10 garrapatas (P=0.002; OR: 1.67; IC 90%), el segundo 11-29 (P<.001; OR: 2.48; IC 90%) y el tercero mayor a 30 ectoparásitos (P<.001; OR: 2.71; IC 90%), lo que constata que a mayor grado de infestación mayor probabilidad de infección. Por su parte Costa et al. (2013) determinaron que la infestación por garrapatas (P= 0.00; OR: 3.74; IC 95%) además de ser un factor de riesgo a la presencia de enfermedad, si la especie de garrapata es *R. sanguineus* se tiene más probabilidades de transmitir el patógeno que otra (P= 0.00; OR: 4.38; IC 95%).

Florez-Muñoz et al. (2020) concordaron en la asociación de la variable infestación por garrapatas (P<0.05; OR: 1.41; IC 95%), además reportaron la raza

en perros como factor de riesgo donde los mestizos tienen más probabilidades de contraer el patógeno ($P < 0.05$; OR: 1.49; IC 95%), y el sexo ($P < 0.05$; OR: 2.41; IC 95%), donde las hembras son más propensas a infectarse por *Anaplasma spp.*, la edad no fue una variable significativamente asociada, sin embargo, un estudio realizado en Brasil demostró en 2 grupos de edad una asociación significativa con la variable, perros de 1-8 años ($P < 0.001$; OR: 3.40; IC 90%), perros mayores a 8 años ($P < 0.001$; OR: 4.17; IC 90%), siendo este último grupo el de mayor riesgo a la presencia de la enfermedad (Acosta et al. 2020).

Prevención y control de Ehrlichia y Anaplasma

Las garrapatas representan una amenaza constante tanto para mascotas como para seres humanos, ya que son portadoras de patógenos. Sin embargo, existen estrategias eficaces para combatirlas. El principal objetivo del control es evitar que las garrapatas se adhieran y se alimenten de sangre (Halos et al., 2012; Starkey y Little, 2012; Fourie et al., 2013a).

La utilización de acaricidas en mascotas, antes de la exposición a las garrapatas es el primer nivel para la prevención, éstos acaricidas pueden poseer diferentes presentaciones como fórmulas tópicas o collares de liberación lenta del ingrediente activo (Starkey y Little, 2012).

Stannek y Fourie (2013) evaluaron la eficacia del collar impregnado de una combinación de Imidacloprid 10% y Flumetrina 4.5% de liberación paulatina, en cuanto a los resultados obtuvieron una oscilación de eficacia entre el 90% y el 100%, concluyeron que el collar no sólo era eficaz, sino que también que la

acción acaricida era lo suficientemente rápida para evitar que la garrapata transmita el patógeno, todo esto en un tiempo de 8 meses como lo marca la etiqueta.

Fourie et al. (2013b) estudiaron la capacidad de una combinación tópica de Imidacloprid y Permetrina para prevenir la transmisión de *E. canis* en 6 perros expuestos a *R. sanguineus*. La eficacia del tratamiento acaricida osciló entre el 96.1% y el 98.9% a partir de las 48 h de la aplicación y duró hasta 4 semanas, ninguno de los seis perros tratados se infectó.

Al salir al aire libre, debe considerarse el entorno al cual estará expuesto, debido a que puede haber garrapatas, es recomendable utilizar como medida preventiva repelentes (permetrina .5%) en prendas de ropa y equipos, evitar contacto con garrapatas al transitar por caminos establecidos y no por vegetación tupida o áreas boscosas, después de haber estado al área libre es de suma importancia revisar ropa en busca de garrapatas, ducharse inmediatamente y revisar cuerpo principalmente axilas, al rededor y dentro de las orejas (CDC, 2020).

Modificar el entorno del hogar puede jugar un papel importante en el control de garrapatas, siendo así menos propicio para la supervivencia de estas. También es recomendable recurrir a operadores de control de plagas (certificados) con el fin de que apliquen pulverizadores ambientales y así contribuir al control de garrapatas (Starkey y Little, 2012).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades transmitidas por vector son consideradas un problema de salud pública, los esfuerzos realizados por la OMS como los descritos en el documento “Respuesta mundial para el control de vectores”, no han sido suficientes y este tipo de enfermedades han logrado prevalecer; siendo la causa de más de 700,000 defunciones de personas en el mundo cada año (OMS, 2017).

Entre los principales vectores destacan las garrapatas como parásitos hematófagos artrópodos transmisores de patógenos tal como *R. sanguineus* también conocida como garrapata café del perro, quien posee la capacidad de parasitar humanos, así como animales domésticos y silvestres, lo que constituye su carácter zoonótico. (Dantas-Torres, 2010).

R. sanguineus es el principal vector transmisor de enfermedades Rickettsiales, tanto en perros como en humanos. La presencia de este vector puede dar lugar a síntomas como fiebre, mialgias, confusión mental, vómitos y anorexia en los seres humanos, así como en los perros. Además, las complicaciones asociadas pueden afectar diversos órganos, incluyendo el sistema renal, el corazón, los pulmones y el sistema gastrointestinal, e incluso puede llevar a la muerte (Azevedo et al., 2016; Rodríguez-Vivas et al., 2016).

El riesgo de contagio en perros domésticos y seres humanos aumenta cuando hay presencia de perros callejeros portadores del vector. Estos perros, al moverse en diferentes entornos geográficos, actúan como centinelas. Por lo tanto, es importante realizar un diagnóstico relevante en las mascotas que

puedan presentar alguno de los síntomas o elementos causales mencionados anteriormente. Esto permitirá una detección temprana y un manejo adecuado de las enfermedades transmitidas por garrapatas (Azevedo et al., 2016; Rodríguez-Vivas et al., 2016).

Acorde al Boletín Epidemiológico Mexicano, el estado de Baja California desde 2015 hasta 2020 ha registrado un total de 173 casos en humanos de origen Rickettsial representando un 22.43% del total reportado a nivel nacional, del cual se excluye la fiebre manchada de las rocas (SINAVE, 2020).

En el caso de México, se estima que alrededor del 60% del territorio nacional, que incluye centros agrícolas, industriales, ganaderos, pesqueros y turísticos, presenta condiciones ambientales propicias para la transmisión de enfermedades Rickettsiales. Estudios nacionales y estatales han demostrado que las regiones del norte del país presentan las prevalencias más altas de estas enfermedades, llegando a alcanzar hasta un 74.5% (Sosa et al., 2013; Movilla et al., 2016; CENAPRECE, 2017).

La principal prueba diagnóstica serológica para la detección de anticuerpos de *E. canis*, *A. platys* y *A. phagocytophilum* empleada en la práctica clínica veterinaria ofrece una capacidad diagnóstica entre 89.4% a 97.8% y 92% a 96% con respecto a la sensibilidad y especificidad respectivamente para de *E. canis*, *A. platys* y *A. phagocytophilum* (Gaunt et al., 2011). Sin embargo, la interpretación de los resultados puede llegar a ser complicada debido a que un animal positivo, pueda realmente no estar cursando la enfermedad, aunado a las reacciones cruzadas que presenta entre especies y a que se desconoce la

prevalencia actual de los patógenos en el estado de Baja California, México, afectando la capacidad diagnóstica de la misma (Sainz et al., 2015).

Por su parte las pruebas moleculares como PCR detectan directamente al patógeno y alcanzan valores de sensibilidad y especificidad de alrededor de 96% y 99% respectivamente (Stillman, 2014), determinando la presencia del patógeno en el organismo, así como la posibilidad de cuantificarlo para el caso del RT-PCR, sin embargo, también presenta desventajas tales como: requerir una cantidad mínima de material genético para detectar al patógeno, un posible diseño incorrecto de oligonucleótidos conduciendo a resultados erróneos en la lectura (Sykes y Green, 2013).

Con fundamento en lo anteriormente descrito, se propone realizar un estudio para detectar serológicamente la presencia e identificar los factores de riesgo asociados a enfermedades rickettsiales *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* y *Ehrlichia canis*, así como la confirmación a través de PCR para la generación de información epidemiológica sobre las principales variables descriptivas en perros (*Canis lupus familiaris*) de Mexicali, Baja California.

Esta investigación beneficiaría al sector clínico, permitiendo establecer pautas de decisión sobre la efectividad de pruebas serológicas y moleculares, con lo cual poder definir si son las herramientas diagnósticas más útiles para el esclarecimiento del panorama epidemiológico en la región.

JUSTIFICACIÓN

La población canina en situación de calle en Mexicali no está determinada, los esfuerzos en el Centro de Control Animal no han sido suficientes para erradicar esta situación y la presencia de vectores en el medio ambiente constituyen factores que en conjunto permiten que enfermedades Rickettsiales estén presentes en la población canina y constituyan un riesgo potencial de presentarse en la población humana.

En los últimos 14 años no se han publicado investigaciones con relación al establecimiento de prevalencia sobre enfermedades Rickettsiales, ello conduce a que se requiere de una actualización sobre la situación epidemiológica de estas enfermedades, aunado a la falta en la evaluación sobre la capacidad diagnóstica de las pruebas serológicas comerciales y moleculares en la región, además de establecer un diagnóstico específico de las enfermedades rickettsiales (Tinoco et al., 2007; Haro-Álvarez et al., 2007).

Los resultados del presente estudio serán de utilidad para el gremio veterinario, quienes podrán optar por pruebas diagnósticas que ofrezcan resultados confiables acorde a la situación epidemiológica de nuestra región, así como conocer los principales agentes rickettsiales presentes. Así mismo, aportar información que contribuya en proponer nuevas políticas en materia de salud pública para el diagnóstico.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la presencia y factores de riesgo asociados a la infección con *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* y *Ehrlichia canis* en muestras sanguíneas de perros obtenidas de un laboratorio de referencia de Mexicali, Baja California.

Objetivos específicos

Determinar la presencia de anticuerpos de *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* y *Ehrlichia canis* en muestras sanguíneas de perros mediante pruebas de diagnóstico serológico comercial.

Determinar la presencia de ADN de *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* y *Ehrlichia canis* en muestras sanguíneas de perros mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

Identificar los factores de riesgo asociados a la presencia de *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* y *Ehrlichia canis* en muestras sanguíneas de perros de Mexicali, Baja California.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El estudio se realizó en el municipio de Mexicali, Baja California.

Duración del estudio

Fue desarrollado en el periodo comprendido de enero 2022 a agosto 2022.

Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Se incluyó en el estudio todo aquel perro remitido a prueba serológica rápida (SNAP 4Dx plus) sin importar si el resultado fuese positivo o negativo.

Tamaño de muestra

Se utilizará la técnica de muestreo por conveniencia que cumpla criterios de inclusión fue incluida en el estudio.

Variables

La edad será expresada en meses, en un rango de menor a 12 meses, 12 meses a 36 meses y mayor a 36 meses. El sexo como hembra o macho. La raza englobará todas las registradas en el American Kennel Club, en caso de que el canino no posea características determinantes a una sola raza será catalogado como mestizo.

La presencia o ausencia de bacterias o anticuerpos en las pruebas moleculares y serológicas respectivamente se interpretarán como positivos o

negativos. El género y especie serán identificados de acuerdo con la positividad a los oligonucleótidos específicos utilizados en la prueba de PCR-TR.

La presencia de ectoparásitos se determinará de acuerdo con la información emitida por los propietarios en el cuestionario y la revisión corporal en el perro llevada a cabo por el Médico Veterinario, se catalogará como presente o ausente.

Cuadro 1. Variables de evaluación.

Variable	Definición	Tipo	Escala	Unidad medición
Edad	Tiempo de vida transcurrido del canino, estimado mediante la dentadura	Cuantitativa Independiente Continua Dicotómica	Menor a 12 meses, 12 a36 meses y mayor a 12 meses	Meses
Sexo	Presencia de genitales masculinos o femeninos	Cualitativa Independiente Categórica Dicotómica	Hembra- Macho	N/A
Raza	Grupo de perros con características similares en su aspecto.	Cualitativa Independiente Categórica Politómica	Razas registrada s en el American	N/A

			Kennel Club	
Género y especie de bacterias	Positividad a oligonucleótidos específicos en PCR-TR	Cualitativa Dependiente Categórica Politómica	<i>Anaplasma platys</i> <i>Anaplasma phagocytophilum</i> <i>Ehrlichia canis</i>	Positivo Negativo
Presencia ectoparásitos	Presencia o ausencia de ectoparásitos observables al examen físico.	Cualitativa Independiente Categórica Dicotómica	Presente- Ausente	N/A
Presencia anticuerpos	Positividad o negatividad a la prueba serológica comercial	Cualitativa Dependiente Categórica Dicotómica	Presentes Ausentes	Positivo Negativo

Metodología

Se obtuvieron muestras sanguíneas de perros, provenientes del laboratorio de diagnóstico veterinario “HEMA” que brinda atención a centros de

atención veterinaria (hospitales, clínicas y consultorios) de Mexicali, Baja California.

Fue obtenida la información referente al sexo, edad, raza, acceso a la calle, ectoparásitos y contacto con otros perros por medio del cuestionario epidemiológico. Fue colectada 6ml de sangre utilizando jeringa con aguja de calibre 21 mediante la técnica venopunción en vena cefálica, 3ml fueron colocados en tubo evacuado con EDTA como anticoagulante y 3ml en un tubo sin anticoagulante.

La muestra fue enviada al laboratorio "HEMA" y se llevó a cabo el análisis serológico comercial SNAP 4Dx Plus de marca IDEXX según las indicaciones del fabricante.

Las muestras con anticoagulante fueron trasladadas mediante una hielera refrigerada al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California y fueron almacenadas en refrigeración a 4°C por un periodo de 18 a 24 horas para permitir la sedimentación de los componentes sanguíneos y la formación de la capa leucoplaquetaria de forma natural. El plasma fue aspirado empleando una pipeta de 1000 microlitros (μ l) y depositado en tubos cónicos estériles de 1.5 ml de capacidad, entre 200-300 μ l de capa leucoplaquetaria fue colectada aspirando la capa celular ubicada sobre la columna de eritrocitos. Fue depositado en tubos cónicos estériles de 1.5 ml de capacidad y las muestras de plasma y capa leucoplaquetaria fueron almacenadas en congelación a -20 °C hasta el momento de su procesamiento.

Extracción de ADN

La extracción de ADN de las muestras de capa leucoplaquetaria se realizó con el kit DNeasy® Blood & Tissue Kit de Qiagen, número de catálogo 69506. Para la extracción de ADN se siguió el protocolo para aislamiento de ADN genómico a partir de muestras de sangre completa. El ADN extraído de las muestras de capa leucoplaquetaria fue reconstituido en un volumen final de 50 µl empleando la solución de rehidratación. El ADN extraído fue almacenado en congelación a -20°C hasta el momento de ejecutar las pruebas de PCR en tiempo real.

Oligonucleótidos

Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizaron los programas *GeneRunner* versión 6.1, disponible en <http://www.generunner.net/> y el programa *OligoCalc* versión 3.2, disponible en: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>. A partir de estos programas se diseñaron, evaluaron y seleccionaron los juegos de oligonucleótidos que cumplen con las características físicas y químicas de longitud de 20-24 nucleótidos con un contenido de GC entre 35 y 60%, manteniendo una temperatura de fusión entre 45-65 ° C, evitando repeticiones >3 nucleótidos G o C continuos, y verificando que las secuencias positiva y negativa no produzcan complementariedad y evitar la formación de dímeros u otro tipo de estructuras secundarias aberrantes (cuadro 2).

Se utilizó la plataforma PCR en tiempo real para la amplificación del ADN correspondiente a la secuencia de los genes *msp4* para *Anaplasma*

phagocytophilum, 16 ribosomal de una región homóloga para *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia canis*, disponibles en las bases de datos bajo los códigos MSP4: MW531454.1, 16 ribosomal *E. canis*: NR_118741 y *E.chaffeensis*: MZ433240.1.

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por *Synbio Technologies* (Nueva Jersey, EUA), empacados y enviados liofilizados. A su llegada fueron reconstituidos con agua grado biología molecular, brevemente, los tubos con el liofilizado se centrifugaron a máxima velocidad por 10 segundos; posteriormente, dentro de la campana de flujo laminar, se agregó a cada tubo 10 veces el valor de la concentración en nano moles (nM) referida por el fabricante para obtener una concentración estándar de 100 micro molar (μM). Los tubos se mezclaron en vórtex por 30 segundos a máxima velocidad e incubados en refrigeración a 4°C por 60 minutos y mezclados nuevamente en vórtex de nuevo a máxima velocidad. La concentración de trabajo de los oligonucleótidos reconstituidos será de 10 μM para lo cual se realizó una dilución de la mezcla de la concentración estándar 1:10 en agua grado biología molecular y separada en alícuotas de 200 μl cada una. Las soluciones estándar y las de trabajo de los oligonucleótidos fueron almacenadas en congelación a -20°C hasta el momento de las pruebas de PCR en tiempo real.

Cuadro 2. Características de los oligonucleótidos para la detección de *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* y de una región homóloga para *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia canis*.

Gen	Oligonucleótidos	Producto	Tm
-----	------------------	----------	----

<i>Anaplasma phagocytophilum</i>			
AnapF1			
msp4	5'- GTGCAACTGGCTATGCTATTG -3'	90 nt	75.7 °C
Anap1			
	3'- GTTTGTAGTCACTCTCAGCAAG -5'		
<i>Ehrlichia spp.</i>			
EhrIF1			
16S ribosomal	5'- CCTAACACATGCAAGTCGAAC -3'	92nt	74.1°C
EhrIR1			
	3'- GATTCCTACGCATTACTCACC -5'		
<i>Borrelia burgdorferi</i>			
FlaF1			
FlagB	5'- CTTAAAGTCCAAGACGCTTG-3'	82nt	75.7°C
FlaR1			
	3'- CAGCTGAAGAGCTTGGGAATG.-5'		

Estandarización

Para la estandarización de la PCR en tiempo real se evaluó el juego de oligonucleótidos por triplicado a 200 nM, 400 nM y 800 nM con 1 µl, 2 µl y 3 µl de ADN template en un volumen total de reacción de 20 µl, empleando una mezcla maestra formulada con el fluoróforo SYBR Green (Bio Rad, Hércules, CA, USA), una tinción fluorescente de alta afinidad para ADN de doble banda (Cuadro 3).

Cuadro 3. Optimización de reactivos, concentración y volumen final para *Anaplasma phagocytophilum* y de una región homologa para *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia canis*.

Reactivo	200 nM	400 nM	800 nM
Mezcla maestra	5.0 µl	5.0 µl	5.0 µl

Templete DNA	1-2-3 μ l	1-2-3 μ l	1-2-3 μ l
Oligonucleótido sentido	0.5 μ l	1 μ l	2 μ l
Oligonucleótido antisentido	0.5 μ l	1 μ l	2 μ l
H ₂ O	3-2-1 μ l	2-1-0 μ l	0-0-0 μ l
Volumen final	10 μ l	10 μ l	10-12 μ l

Protocolo de prueba de PCR tiempo real.

Los extractos de ADN obtenidos de la capa leucoplaquetaria de la sangre de los perros rickettsial fueron probados por duplicado en un termociclador *Bio Rad CFX96* (*BioRad*, Hercules, Carolina, EUA). En cada corrida de PCR en tiempo real se utilizarán tres controles positivos de ADN, tres controles de mezcla maestra sin ADN templete, tres controles negativos de agua grado biología molecular y tres controles negativos con aire. Los parámetros de desnaturalización, hibridación y extensión serán calculados empleando la herramienta *Protocol Autowriter* de la paquetería CFX96, tomando en consideración el tamaño del producto del PCR, la secuencia de los oligonucleótidos y el tipo de enzima de la mezcla maestra. Así mismo, para cada corrida se realizó el análisis de curva de disociación a partir de 70°C y hasta 95°C con incremento de 0.5°C para la identificación de productos de amplificación de PCR específicos para cada gen analizado y discriminar entre artefactos distintos a la amplificación del templete de ADN esperado.

Los resultados de las pruebas por PCR en tiempo real fueron considerados positivos cuando la muestra correspondiente logró una señal fluorescente de amplificación por encima del valor de corte que la paquetería CFX96 calculada en cada corrida en un máximo de 40 ciclos. Los resultados fueron considerados negativos cuando la muestra correspondiente no logró desarrollar una señal fluorescente de amplificación por encima del valor de corte en un máximo de 40 ciclos

Análisis estadístico

Los análisis inferenciales se llevarán a cabo utilizando el software Statistix 9® y una estimación de Chi cuadrado para establecer asociaciones entre *A. platys*, *A. phagocytophilum* y *E. canis*. con las variables analizadas. También se calcularon la razón de oportunidad (OR) con intervalos de confianza del 95%.

RESULTADOS

Se analizaron un total de 96 muestras de perros con propietario utilizando la prueba rápida serológica SNAP 4DX Plus. Los resultados mostraron una seroprevalencia general del 50% (48/96). De las muestras, 45.83% (44/96) resultaron seropositivas a *Ehrlichia spp.*, mientras que 4.1% (4/96) mostraron seropositividad a *Anaplasma spp.* Se observaron 3 casos de coinfección, pero no se detectó ningún resultado positivo para *Borrelia burgdorferi* (Cuadro 4).

Del total de muestras sugestivas, se tomaron 60 muestras de manera aleatoria y fueron sometidas a qPCR, donde el 11.66% (7/60) de las muestras fueron positivas únicamente a *Ehrlichia spp.* (Cuadro 5), obteniendo un porcentaje de casos menor, ya que mediante serología de las 60 muestras se obtuvo una seroprevalencia de 56.66% (34/60).

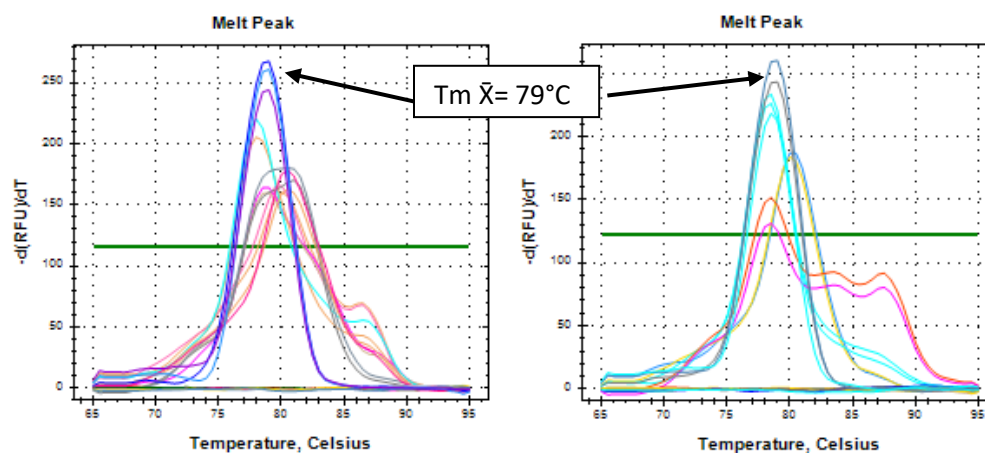


Fig.1 Resultado positivo para *Ehrlichia spp* con base en la presencia de curvas de disociación del producto de PCR para el fragmento homólogo del gen 16S ribosomal.

Los caninos mayores de 3 años muestran asociación significativa respecto a la presentación de casos positivos a *Ehrlichia canis* diagnosticados con la prueba rápida serológica; mientras que el resto de las variables no mostraron significancia estadística (Cuadro 6).

Cuadro 4. Género y frecuencia de patógenos detectados mediante SNAP 4DXPlus en muestras sanguíneas de perros sospechosos a enfermedad rickettsial de un laboratorio de referencia en Mexicali, Baja California, México

Género/especie	Positivos/96	Frecuencia (%)
<i>Ehrlichia spp</i>	44/96	45.83%
<i>Anaplasma spp</i>	4/96	4.1%
<i>Borrelia burgdorferi</i>	0/96	0%
Total	48/96	50%

Cuadro 5. Resultados qPCR a *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, *Rickettsia rickettsi* y de una región homóloga para *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia canis*.

Enfermedad Rickettsial	Positivos
<i>Ehrlichia spp</i>	7/60
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	0/60

Borrelia burgdorferi

0/60

Rickettsia rickettsi

0/60

Cuadro 6. Factores de riesgo asociados a la presencia de *E. canis* respecto a las pruebas serológicas.

Factor de riesgo	Muestras Positivas	(móru	p	OR	IC 95%
<u>Cohabitación</u>					
Presente	27/96	28.12%	0.193	1.71	0.75-3.87
Ausente	17/96				
<u>Acceso Calle</u>					
Presente	22/96	22.91%	0.08	2.05	0.89-4.71
Ausente	22/96				
<u>Garrapatas</u>					
Presente	14/96	17.58%	0.336	1.55	0.62-3.84
Ausente	30/96				
<u>Anemia</u>					
Presente	7/96	7.29%	0.52	-	-
Ausente	5/96				
<u>Trombocitopenia</u>					
Presente	8/96	8.33%	0.30	-	-
Ausente	4/96				
<u>Edad</u>					
>3 años	28/96	29.91%	0.02	2.58	1.12-5.9
1-3 años	16/96				
<u>Raza</u>					
Mestiza	28/96	29.91%	0.68	1.18	0.51-2.71
Pura	15/96				
<u>Sexo</u>					
Hembra	23/96	23.95%	0.55	1.27	0.57-2.85
Macho	21/96				

DISCUSIÓN

El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) desde el 2020 hasta mayo del 2023 en total reportaron 151 casos de enfermedades rickettsiales presentados en humanos, en total en el estado de Baja California. Cabe destacar que el SINAVE discrimina los casos como *Rickettsia rickettsi* y “Otras rickettsiosis” (SINAVE,2023), identificando 17.21% (26/151) como otras enfermedades rickettsiales, sin embargo, no especifican cuáles géneros y especies.

El presente estudio muestra una seroprevalencia general de enfermedades rickettsiales del 50% (48/96) denotándose la alta predominancia de *Ehrlichia* respecto a *Anaplasma*, similar a la obtenida por Tinoco et al. (2007) una prevalencia ajustada de 49.3% (40/94) aunque en el mismo año Haro-Álvarez et al. (2007) determinó una seroprevalencia del 21.6% (83/384) esta diferencia se podría deber a que el método de muestreo no fue por conveniencia. *E. canis* fue el agente más prevalente. Sin embargo, en un estudio más reciente en Mexicali donde utilizaron la prueba serológica rápida SNAP 4Dx PLUS (Backus et al., 2023) se identificó una seroprevalencia de 49.2%% (31/63) presentando los patógenos: *Ehrlichia spp* (31/63), *Anaplasma spp* (12/63)., y *Rickettsia spp.* (51/63) Todos los estudios realizados en perros en Mexicali indican que *Ehrlichia spp.* es la principal enfermedad rickettsial. En otros estudios nacionales indicaron que la seroprevalencia identificada es menor comparado con el estado de Sinaloa presentando 74.5% (113/152) de casos, el Estado de México y Yucatán con 30% (30/100) y 36% (18/50) respectivamente.

Una limitante del estudio es que, durante el diseño de los oligonucleótidos, a pesar de diseñarse para detectar el género *E. canis*, al analizar el fragmento que amplificaría mediante BLAST (NCBI) se observó una inclinación notable hacia el diagnóstico de *E. chaffensis* en lugar de *E. canis*. Es importante seguir trabajando en la clasificación de las especies de *Ehrlichia*, ya que al ser la enfermedad rickettsial más prevalente se requiere identificar las principales especies con la finalidad de obtener un diagnóstico preciso.

Los caninos mayores a 3 años fueron asociados significativamente ($P=0.02$; OR: 2.58; IC 95%) a la presentación de casos positivos a *Ehrlichia canis*, similar a lo encontrado por Ojeda-Chi et al. (2019) en el estado de Yucatán ($P=0.022$; OR: 2.41; IC 95%) y por debajo ($P=<0.001$; OR: 15.39; IC 95%) del estudio realizado por Martínez et al., (2016) en el estado de Quintana Roo.

Huerta y Damáso (2015) mencionan en su estudio que los perros adultos cuentan con mayores oportunidades de encontrarse expuestos al vector que uno joven, puesto que los dueños no suelen sacar a pasear a sus mascotas hasta que completan su esquema de vacunación y/o consideran que tienen un menor riesgo de enfermarse concluyeron al realizar su estudio y encontrar un valor significativo ($P=0.038$; OR: 1.92; IC 95%) de asociación con la edad de los perros y la presentación de la enfermedad en la ciudad de Huánuco, Perú.

CONCLUSIONES

En el estudio, se determinó que la seroprevalencia muestral de *Ehrlichia spp.* en perros fue del 50% (48/96), mientras que la seroprevalencia de *Anaplasma spp.* fue del 4.1% (4/96), fueron identificados 3 casos de coinfección entre *Ehrlichia spp.* y *Anaplasma spp.* No se pudo identificar la presencia de *B. burgdorferi* mediante pruebas serológicas.

La prevalencia muestral diagnosticada a través de qPCR fue de 11.66% (7/60) positivas únicamente a *Ehrlichia spp.*

Los caninos mayores de 3 años muestran asociación significativa respecto a la presentación de casos positivos a *Ehrlichia canis* diagnosticados con la prueba rápida serológica ($p < 0.05$).

LITERATURA CITADA

- Acosta, G., T. Weitzel, J. López, D. Alvarado, and K. Abarca. 2020. Prevalence and Risk Factors of Antibodies to *Anaplasma* spp. in Chile: A Household-Based Cross-Sectional Study in Healthy Adults and Domestic Dogs. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 20:572-579.
- Aguilar-Tipacamu, G., B. I. Carvajal, J. García, C. Machain and J. Mosqueda. 2020. Immuno-molecular prospecting for vector-borne diseases in central Mexico. *Transbound. Emerg. Dis.* 67:185-192.
- Almazán, C., V. H. Gonzalez, I. G. de Mera, A. Cabezas, R. Rodríguez and J. de la Fuente. 2016. Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. *Ticks Tick Borne Dis.* 7:276-283.
- Allison R. W. and S. E. Little. 2013. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. *Vet. Clin. Pathol.* 42:127-144.
- Alves, R. N., M. A. Levenhagen, M. M. Levenhagen, S. E. Rieck, M. B. Labruna and M. E. Beletti. 2014. The spreading process of *Ehrlichia canis* in macrophages is dependent on actin cytoskeleton, calcium and iron influx and lysosomal evasion. *Vet. Microbiol.* 168:442-446.
- Arraga-Alvarado, C. M., B. A. Qurollo, O. C Parra, M. A. Berrueta, B. C Hegarty and E. B Breitschwerdt. 2014. Molecular evidence of *Anaplasma platys* infection in two women from Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 91:1161-1165
- Azevedo, S. S., D. M. Aguilar, S. F. Aquino, R. C. Orlandelli, A. R.

- Fonseca y I. C. P. Uchôa. 2011. Soroprevalência e fatores de risco associados à soropositividade para Ehrlichia canis em cães do semiárido da Paraíba. Braz. J. Vet. Res. An. Sci. 48:14-18.
- Badillo, M., A. Díaz, C. Orozco and R. Lavalle. 2017. Infection by Ehrlichia canis and Anaplasma sp. in dogs attended in veterinary clinics, Barranquilla, Colombia. Rev. MVZ. Córdoba. 22 (Suplemento): 6023-6033.
- Bai, L., P. Goel, R. Jhambh, P. Kumar and V. G. Joshi. 2017. Molecular prevalence and haemato-biochemical profile of canine monocytic ehrlichiosis in dogs in and around Hisar, Haryana, India. J. Parasit. Dis. 41:647-654.
- Baneth, G., S. Harrus, F. S. Ohnona and Y. Schlesinger. 2009. Longitudinal quantification of Ehrlichia canis in experimental infection with comparison to natural infection. Vet. Microbiol. 136:321-325.
- Bouza-Mora, L., G. Dolz, A. Solórzano, J. J. Romero, L. Salazar, M. Labruna and D. M. Aguiar. 2017. Novel genotype of Ehrlichia canis detected in samples of human blood bank donors in Costa Rica. Ticks Tick Borne Dis. 8:36-40.
- CDC, Centers for disease Control and Prevention, 2020. Ticks: Avoiding ticks on people. Disponible en: https://www.cdc.gov/ticks/avoid/on_people.html
Fecha de acceso: 31 de agosto del 2021.
- Clímaco, L. R., C. R. Núñez y H. R. Cardenas. 2020. Evaluación de enfermedades transmitidas por vectores en perros de un área de clima sub-frío de México. Acta Biol. Colomb. 25:219-224.

- Costa, L. M., K. Rembeck, L. M. Passos and M. F. Ribeiro. 2013. Factors associated with epidemiology of *Anaplasma platys* in dogs in rural and urban areas of Minas Gerais State, Brazil. *Prev. Vet. Med.* 109:321-326.
- Dantas-Torres, F. 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit Vectors.* 3:1-11.
- Derakhshandeh, N., H. Sharifiyazdi and M. A. Hasiri. 2017. Molecular detection of *Ehrlichia* spp. in blood samples of dogs in southern Iran using polymerase chain reaction. *Vet. Res. Forum.* 8:347-351.
- Díaz, A. A., B. Corona, M. L. Meli, L. Roblejo, O. Fonseca, A. Pérez and R. Hofmann. 2020. Molecular Diagnosis, Prevalence and Importance of Zoonotic Vector-Borne Pathogens in Cuban Shelter Dogs—A Preliminary Study. *Pathogens.* 9:1-18.
- Dolz, G., L. Ábrego, L. E. Romero, L. Campos-Calderón, L. Bouza-Mora y A. E. Jiménez-Rocha. 2013. Ehrlichiosis y anaplasmosis en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense.* 55:34-40.
- Eberts, M. D., P. P. Vissotto de Paivina, M. J. Beall, B. A. Stillman, R. Chandrashekar and E. B. Breitschwerdt. 2011. Typical and atypical manifestations of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* 47:e86-e94.
- Escárcega, A. M., B. S. Luna, A. D. Mora y F. Jiménez. 2018. Análisis exploratorio de enfermedades Rickettsiales transmitidas por garrapatas en perros de Ciudad Juárez, Chihuahua, México. *Acta universitaria.* 28:72-78.

- Faizal, M. D., A. Haryanto and I. Tjahajati. 2019. Diagnosis and molecular characterization of *Anaplasma platys* in dog patients in Yogyakarta area, Indonesia. *Indones. J. Biotechnol.* 24:43-50.
- Florez-Muñoz, A. A., J. C. Pinilla y A. Rosas. 2020. Estudio de los factores de riesgo asociados a Ehrlichiosis y Anaplasmosis en caninos de Barrancabermeja, Santander. En: *Enfermedades Rickettsiales en Latinoamérica*. S. Arias. Medellín, Colombia. p151-167.
- Fourie, J. J., D. Stanneck, H. G. Luus, F. Beugnet, M. Wijnveld and F. Jongejan. 2013a. Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks feeding on dogs and on artificial membranes. *Vet. Parasitol.* 197: 595–603.
- Fourie, J. J., H. G. Luus, D. Stanneck and F. Jongejan. 2013b. The efficacy of Advantix® to prevent transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Parasite*, 20:1-7.
- Garcia-Garcia, J. C., K. E. Rennoll, S. Pelly, A. M. Milstone and J. S. Dumler. 2009. Silencing of host cell CYBB gene expression by the nuclear effector AnkA of the intracellular pathogen *Anaplasma phagocytophilum*. *Infect Immun.* 77:2385-2391.
- Ghosh, P. M. N. Saleh, K. D. Sundstrom, M. Ientile, and S. E Little. 2021. *Ixodes* spp. from Dogs and Cats in the United States: Diversity, Seasonality, and Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 21:11-19.

- Guedes, P. E., T. N. Oliveira, F. S. Carvalho, R. S. Carlos, G. R. Albuquerque, A. D. Munhoz, A. A. Wenceslau and F. L. Silva. 2015. Canine ehrlichiosis: Prevalence and epidemiology in Northeast Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 24:115-121.
- Halos, L., G. Baneth, F. Beugnet, A. S. Bowman, B. Chomel, R. Farkas, M. Franc, J. Guillot, H. Inokuma, R. Kaufman, F. Jongejan, A. Joachim, D. Otranto, K. Pfister, M. Pollmeier, A. Sainz and R. Wall. 2012. Defining the concept of “tick repellency” in veterinary medicine. *Parasitology* 139:419–423.
- Happi, A. N., A. J. Toepf, C. A. Ugwu, C. A. Petersen and J. E. Sykes. 2018. Detection and identification of blood-borne infections in dogs in Nigeria using light microscopy and the polymerase chain reaction. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports.* 11: 55-60.
- Haro-Alvarez, P., G. Lopez, L. Tinoco, T. Renteria and G. Medina. 2007. Seroprevalence and traceback of animals suspected of carrying *Ehrlichia canis*, in dogs attended in veterinary clinics in Mexicali, Baja California, Mexico. *J. Anim. Vet. Adv.* 6:850-854.
- Harrus, S. and T. Waner. 2011. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *Vet. J.* 187:292–296.
- Hoyos Sifuentes, L. A. 2013. Identificación hematológica, serológica y molecular de *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis* en sangre periférica de humanos en Lima Metropolitana. Tesis de Posgrado. Facultad de Farmacia y

Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
(Abstr.).

Huang, B., M. J. Troese, D. Howe, S. Ye, J. T. Sims, R. A. Heinzen, D. L. Borjesson and J. A. Carloyn. 2010. Anaplasma phagocytophilum APH_0032 is expressed late during infection and localizes to the pathogen-occupied vacuolar membrane. *Microb. Pathog.* 49:273-284.

Huang, B., M. J. Troese, D. Howe, S. Ye, J. T. Sims, N. L. Galloway, D. L. Borjesson and J. A. Carloyn. 2010b. Anaplasma phagocytophilum APH_1387 is expressed throughout bacterial intracellular development and localizes to the pathogen-occupied vacuolar membrane. *Infect. Immun.* 78:864-1873.

Huerto, E. y B. Dámaso. 2015. Factores asociados a la infección por Ehrlichia canis en perros infestados con garrapatas en la ciudad de Huánuco, Perú. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública.* 32:756-760.

Lamason, R. L. and M. D. Welch. 2017. Actin-based motility and cell-to-cell spread of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol*, 35:48-57.

Liu, H., W. Bao, M. Lin, H. Niu and Y. Rikihisa. 2012. Ehrlichia type IV secretion effector ECH0825 is translocated to mitochondria and curbs ROS and apoptosis by upregulating host MnSOD. *Cell. Microbiol.* 14:1037–1050.

Maazi, N., A. Malmasi, P. Shayan, S. M. Nassiri, T. Z. Salehi and M. S. Fard. 2014. Molecular and serological detection of Ehrlichia canis in naturally

exposed dogs in Iran: an analysis on associated risk factors. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 23:16-22.

Maggi, R. G, P. E. Mascarelli, L. N. Havenga, V. Naido and E. B. Breitschwerd. 2013. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. *Parasite Vector.* 6:1-10.

Manoj, R. R., R. Iatta, M. S. Latrofa, L. Capozzi, M. Raman, V. Colella and D. Otranto. 2020. Canine vector-borne pathogens from dogs and ticks from Tamil Nadu, India. *Acta. Trop.* 203:1-12.

Martínez, P. P., M. E. Bolio, R. I. Rodríguez, E. Gutierrez, C. Pérez, S. L. Villegas, and C. H. Sauri. 2016. Associated Factors to Seroprevalence of *Ehrlichia* spp. in dogs of Quintana Roo, Mexico *J. Trop. Med.*, 2016:1-6.

McBride, J. W. and D. H. Walker. 2011. Molecular and cellular pathobiology of *Ehrlichia* infection: Targets for new therapeutics and immunomodulation strategies. *Expert Rev. Mol. Med.* 13:e3.

Montoya, J. A., R. Morchón, N. Costa, J. I. Matos, Y. Falcón and E. Carretón. 2020. Current distribution of selected Vector-Borne Diseases in dogs in Spain. *Front. Vet. Sci.* 7:1-11.

Moroff, S., I. Sokolchik, T. Woodring, C. Woodruff, B. Atkinson and M. R. Lappin. 2014. Detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum* in dogs using an automated fluorescence-based system. *Vet. J.* 202:348-352.

- Movilla, R., C. García, S. Siebert y X. Roura. 2016. Countrywide serological evaluation of canine prevalence for *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* (sensu lato), *Dirofilaria immitis* and *Ehrlichia canis* in Mexico. *Parasite Vector*. 9:1-12.
- Navarrete, M. G., M. D. Cordeiro, C. B. Silva, C. L. Massard, E. R. López, J. C. Rodríguez and A. H. Fonseca. 2018. Serological and molecular diagnosis of *Ehrlichia canis* and associated risk factors in dogs domiciled in western Cuba. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* 14:170-175.
- Nethery, K. A., C. K. Doyle, X. Zhang and J. W. Mc Bride. 2007. *Ehrlichia canis* gp200 contains dominant species-specific antibody epitopes in terminal acidic domains. *Infect. Immun.* 75:4900-4908.
- O' Connor T. P., J. L. Hanscom, B. C. Hegarty, R. G. Groat and E. B Breitschwerdt. 2006. Comparison of an indirect immunofluorescence assay, western blot analysis, and a commercially available ELISA for detection of *Ehrlichia canis* antibodies in canine sera. *Am J Vet Res.* 67:206-210.
- Ojeda-Chi, M. M., R. I. Rodriguez, M. D. Esteve-Gasent, A. A. de León, J. J. Modarelli and S. L. Villegas. 2019. *Ehrlichia canis* in dogs of Mexico: Prevalence, incidence, co-infection and factors associated. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 67:1-6.
- OMS, Organización Mundial de la Salud, 2020. Enfermedades transmitidas por vectores. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact->

sheets/detail/vector-borne-diseases Fecha de acceso: 31 de agosto del 2021.

Otranto, D., F. Danta and E. B. Breitschwerdt. 2009. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends in Parasitology*. 25:157–163.

Pat, H., R. I. Rodriguez, M. E. Bolio-Gonzalez, S. L. Villegas-Perez and E. Reyes-Novelo. 2015. Molecular Diagnosis of *Ehrlichia canis* in Dogs and Ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Yucatan, Mexico. *J. Med. Entomol.* 52:101–104.

Paulino, A., O. Li, L. Hoyos, F. Suárez y D. Díaz. 2013. Detección serológica de *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis* en personal de clínicas veterinarias en Lima Metropolitana. *Rev. Investig. Vet. Perú.* 24:217-221.

Perez, M., M. Bodor, C. Zhang, Q. Xiong, and Y. Rikihisa. 2006. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078:110-117.

Pérez-Machi, S., R. Pedrozo, P. Bittencourt and A. Müller. 2019. Prevalence, molecular characterization and risk factor analysis of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in domestic dogs from Paraguay. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 62:31-39.

Piantedosi, D., B. Neola, N. D'Alessio, F. Di Prisco, M. Santoro, L. Pacifico, G. Sgroi, L. Auletta, J. Buch, R. Chandrashekar, E. B. Breitschwerdt and V. Veneziano. 2017. Seroprevalence and risk factors associated with

- Ehrlichia canis, Anaplasma spp., Borrelia burgdorferi sensu lato, and D. immitis in hunting dogs from southern Italy. Parasitol Res 116:2651–2660.
- Procajlo, A., E. Skupień, M. Bladowski and S. Lew. 2011. Monocytic ehrlichiosis in dogs Polish. J. Vet. Sci. 14:515-520.
- Rikihisa Y. 2010. Anaplasma phagocytophilum and Ehrlichia chaffeensis: subversive manipulators of host cells. Nat Rev Microbiol. 8:328-339.
- Rikihisa, Y. 2011. Mechanisms of obligatory intracellular infection with Anaplasma phagocytophilum. Clin. Microbiol. Rev. 24:469-489.
- Rodríguez-Vivas, R. I., M. E. Bolio y M. M. Ojeda-Chi. 2015. Diagnóstico de la ehrlichiosis monocítica canina: una revisión actualizada. Ciencia y Agricultura. 12:83–98.
- Rodríguez-Vivas, R. I., D. A. Apanaskevich, M. M Ojeda, I. Trinidad, E. Reyes, M. D. Esteve and A. P. de León. 2016. Ticks collected from humans, domestic animals, and wildlife in Yucatan, Mexico. Vet. Parasitol. 215:106-113.
- Rojero-Vazquez, E., G. Gordillo and M. Weber. 2017. Infection of Anaplasma phagocytophilum and Ehrlichia spp. in opossums and dogs in Campeche, Mexico: the role of tick infestation. Front. Ecol. Evol. 5:637-665.
- Sainz, A., X. Roura, G. Miró, A. Estrada, B. Kohn, S. Harrus and L. Solosano. 2015. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. Parasit Vectors, 8:1-20.

- Selim, A., A. Abdelhady and J. Alahadeb. 2020. Prevalence and First Molecular Characterization of Ehrlichia canis in Egyptian dogs. Pak. Vet. J. 41:117-121.
- Severo, M. S., K. D. Stephens, M. Kotsyfakis and J. H. Pedra. 2012. Anaplasma phagocytophilum: deceptively simple or simply deceptive?. Future Microbiol. 7:719-731.
- Shen, Z. M., Z. Zhang, R. W. Stich, W. J. Mitchell and S. Zhang. 2018. Development of a tick-borne pathogen QPCR panel for detection of Anaplasma, Ehrlichia, Rickettsia, and Lyme disease Borrelia in animals. J. Microbiol. Method. 151:83-89.
- Silaghi, C., A. S. Santos, J. Gomes, I. Christova, I. A. Matei, G. Walder, A. Domingos, L. Bell, H. Sprong, F. D. von Loewenich, J. A. Oteo, J. de la Fuente and J. S. Dumler. 2017. Guidelines for the direct detection of Anaplasma spp. in diagnosis and epidemiological studies. Vector Borne Zoonotic Dis. 17:12-22.
- Silva, A. B., S. Canseco, M. D. P. Torre, A. Mayoral, M. Mayoral y L. Mayoral. 2014. Infección humana asintomática por contacto con perros. Un caso de ehrlichiosis humana. Gaceta médica de México. 150:171-174.
- SINAVE, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2020. Boletín epidemiológico. 53:33. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/documentos/boletinepidemiologico-sistema->

nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion-231750 Fecha de acceso: 31 de agosto del 2021.

- Soria-Rodríguez, C. G., N. Galarza and S. Dhillon. 2019. Human granulocytic Anaplasmosis: a case report in Mexico. *J. Pediatr. Neonatal. Care.* 9:32-34.
- Sosa-Gutiérrez, C. G., M. T. Quintero, S. M. Gaxiola, S. Cota, M. D. Esteve and M. G Gordillo. 2013. Frequency and clinical epidemiology of canine monocytic ehrlichiosis in dogs infested with ticks from Sinaloa, Mexico. *J. Vet. Med.* 2013:1-3.
- Sosa-Gutiérrez, C. G., M. Vargas, J. Torres and G. Gordillo. 2014. Tick-borne rickettsial pathogens in rodents from Mexico. *J. Biomed. Eng.* 7: 884-889.
- Sosa-Gutiérrez, C. G., M. Vargas, J. Torres y G. Gordillo. 2016. Tick-borne rickettsial pathogens in questing ticks, removed from humans and animals in Mexico. *J. Vet. Sci.* 17:353-360.
- Stanneck, D. and J. J. Fourie. 2013. Imidacloprid 10%/flumethrin 4.5% collars (Seresto®, Bayer) successfully prevent long-term transmission of Ehrlichia canis by infected Rhipicephalus sanguineus ticks to dogs. *Parasitol. Res.* 112:21-32.
- Starkey, L. and S. Little. 2012. Defeating ticks. Practical tips for preventing tick-borne disease in pets. *Today Vet. Pract.* 2:40-44.
- Stillman, B. A., M. Monn, J. Liu, B. Thatcher, P. Foster, B. Andrews, S. Little, M. Eberts, E. B. Breitschwerdt, M. J. Beall and R. Chandrashekar. 2014.

Performance of a commercially available in-clinic ELISA for detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Ehrlichia ewingii* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 245:80–86.

Straube, J. 2010. Canine Ehrlichiosis – from Acute Infection to Chronic Disease. Institute for Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Germany. Disponible en: https://cvbd.elanco.com/sites/g/files/adhwdz526/files/CVBD_Easy-to-digest_no_7_ehrlichiosis.pdf Fecha de acceso: 31 de agosto del 2021

Sykes, J. E. and C. E. Greene. 2013. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. St. Louis, Mo, USA. p.244-258.

Sykes, J. E. and J. E. Foley. 2013. Anaplasmosis. In: *Canine and Feline Infectious Diseases*. J. E. Sykes. St. Louis, Mo, USA. p.290-299.

Tamay, L., C. Ibarra, y C. Velasquillo. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*. 2:70-78.

Tang, H., J. Zhu, S. Wu and H. Niu. 2020. Identification and characterization of an actin filament-associated *Anaplasma phagocytophilum* protein. *Microb. Pathog.* 147:1-7.

Tinoco-Gracia, L., H. Quiroz, M. T. Quintero, T. B. Renteria, A. Barreras, S. Hori and J. Vinasco. 2007. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* in dogs from a Mexico-US border desert region: pilot study. *J. Anim. Vet. Adv.* 6:758-760

- Waner, T. and S. Harrus. 2013. Canine monocytic ehrlichiosis– From pathology to clinical manifestations. *Isr. J. Vet. Med.* 68:12-18.
- Xiong, A. and Y. Rikihisa. 2012. Subversion of NPC1 pathway of cholesterol transport by *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell. Microbiol.* 14:560-576.
- Ybañez, R. H., A. P. Ybañez, L. L. Arnado, L. M. Belarmino, K. G. Malingin, P. B. Cabilete, Z. R. Amores, M. G. Talle, M. Liu and X. Xuan. 2018. Detection of *Ehrlichia*, *Anaplasma*, and *Babesia* spp. in dogs in Cebu, Philippines. *Vet. World.* 11:14-19.
- Yu, X. J. and D. H. Walker. 2016. Epidemiology, molecular biology, and pathogenic mechanisms of *Ehrlichia* infection. In: *Rickettsiales*. S. Thomas. Wynnewood, PA, USA. p.225-240.
- Yuasa, Y., Y. L. Tsai, C. C. Chang, T. H. Hsu and C. C. Chou. 2017. The prevalence of *Anaplasma platys* and a potential novel *Anaplasma* species exceed that of *Ehrlichia canis* in asymptomatic dogs and *Rhipicephalus sanguineus* in Taiwan. *J. Vet. Med. Sci.* 79:1494-1502.
- Zhang, J. Z., M. Sinha, B. A. Luxon and X. J. Yu. 2004. Survival strategy of obligately intracellular *Ehrlichia chaffensis*: novel modulation of immune response and host cell cycles. *Infect. Immun.* 72:498-507.
- Zetina, M. F., J. A. Gallegos, y K. D. Rosado. 2019. Efectividad de los métodos diagnósticos para la detección de ehrlichiosis monocítica humana y canina. *Rev. Chil. Infectol.* 36:650-655.