

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



"PREVALENCIA Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A ERLIQUIOSIS CANINA (*E. canis*) y ANAPLASMOSIS (*A. platys* y *A. phagocytophilum*) EN PERROS DE LA ZONA URBANA DE SAN LUIS RÍO COLORADO, SONORA, MÉXICO".

TESIS:

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

PRESENTA:

MVZ ZAIDA MURRIETA ZAMORA

ASESOR:

DR. LUIS TINOCO GRACIA

ASESORES:

DR. GILBERTO LOPEZ VALENCIA

DRA. ALMA R. TAMAYO

DR. GILBERTO BARRERAS SERRANO

Prevalencia y Factores de Riesgo Asociados Para Erliquiosis (*E. canis*) y Anaplasmosis (*A. phagocytophilum* y *A. platys*) en Perros de la Zona Urbana de San Luis Río Colorado, Sonora, México. Tesis presentada por Zaida Murrieta Zamora como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el comité parcial indicado:

Dr. Luis Tinoco Gracia
Director de tesis

Dr. Gilberto López Valencia
Asesor

Dra. Alma R. Tamayo Sosa
Asesor

Dr. Alberto Barreras Serrano
Asesor

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias por el apoyo brindado durante la maestría, así como a todos los maestros involucrados en mi aprendizaje durante estos dos años.

A CONACYT por estimular la investigación en México y en especial de la medicina veterinaria.

Doy gracias especiales a mi tutor, el Dr. Luis Tinoco Gracia por todo su conocimiento, su empeño, perseverancia y dedicación pero sobretodo su paciencia conmigo para sacar adelante este proyecto. A mis otros asesores Dr. Gilberto López Valencia, Dra. Sawaco Oshima, Dra. Alma Tamayo , Dr Alberto Barreras , por su siempre gentil disposición para atender mis dudas.

A mis compañeros del Hospital Veterinario de Pequeñas Especies por respaldarme durante este proceso.

A mi familia por su apoyo incondicional para terminar este proyecto.

DEDICATORIA

A mi esposo, por apoyarme siempre incondicionalmente e impulsarme a superarme cada día, a soportar mis malos días, a sustituirme mientras estaba ocupada, a darme palabras de aliento para seguir.

A mis bellos hijos Iktan, Yamileth y Zayra, que son el motor de mi corazón y que entendían que mamá también hacía tarea.

A mi mamá, que siempre tuvo la mejor disposición para ayudarme en lo que necesitara para poder lograrlo.

RESUMEN

La erliquiosis y anaplasmosis caninas son enfermedades transmitidas por garrapatas, de las cuales, la erliquiosis monocítica canina producida por *E. canis* tiene distribución mundial y tiene una alta prevalencia en perros. Existen reportes en México donde han identificado especies de *Anaplasma platys* y *Anaplasma phagocytophilum*, las cuales han infectado humanos con mortalidad variable. Se realizó un estudio observacional transversal en la ciudad de San Luis Río Colorado, Sonora, México, donde se realizó PCR anidado a 231 muestras de sangre de perros con propietario, amplificando el gen *16S rRNA* del género, para especies *E. canis*, *A. phagocytophilum* y *A. platys*. Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Salud Pública Veterinaria de la UABC en Mexicali, B.C. Los productos fueron amplificados en gel de agarosa al 1.5% por electroforesis y se secuenciaron, identificándose las especies *E. canis*, (7.8%), *A. platys* (7.3%) y *A. phagocytophilum* (0.8%). Además se encontraron seis coinfecciones, cuatro fueron con *E. canis* y *A. platys* (12.9%), una con *E. canis* y *A. phagocytophilum* y otra con *A. platys* y *A. phagocytophilum* (3.2%) para cada una. Así mismo los factores de riesgo fueron analizados mediante el programa Statistix 9® estimándose odds ratio (OR) con intervalo de confianza IC al 95%, donde las hembras respecto a machos (OR 2.5) y el salir a la calle (OR 2.3), fueron los que presentaron nivel de significancia $P < 0.05$. Estos resultados confirman la presencia por identificación molecular de estas especies en perros de la ciudad, así como al ser el primer estudio por PCR en el Estado de Sonora.

ABSTRACT

Ehrlichiosis and canine anaplasmosis are diseases transmitted by ticks, which, produced by *E. canis*, canine monocytic ehrlichiosis (CME) has worldwide distribution and has a high prevalence in dogs. There are reports in Mexico where they have identified species of *Anaplasma platys* and *Anaplasma phagocytophilum*, which have infected humans with variable mortality. A cross-sectional observational study was carried out in the city of San Luis Rio Colorado, Sonora, Mexico, where it was nested to 231 blood samples from dogs with owner, PCR amplifying 16S rRNA gene of the genus, species *E. canis*, *A. phagocytophilum* and *A. platys*. The samples were processed in the Laboratory of Veterinary Public Health of the UABC Mexicali, B.C. The products were amplified in agarose gel to 1.5% by electrophoresis and were sequenced, identifying the species *E. canis*, (7.8%), *A. platys* (7.3%) and *A. phagocytophilum* (0.8%). In addition, six coinfections were found, four were with *E. canis* and *A. platys* (12.9%), one with *E. canis* and *A. phagocytophilum* and another with *A. platys* and *A. phagocytophilum* (3.2%) for each. The same risk factors were analyzed using the Statistix 9® program, estimated odds ratio (OR) with confidence interval CI 95%, where the females to males (OR 2.5) and exit to the street (OR 2.3), were those who submitted level of significance $P < 0.05$. These findings confirm the presence by molecular identification of these species in dogs in the city, as well as being the first study by PCR in the State of Sonora.

CONTENIDO

PÁGINA

LISTA DE CUADROS.....	viii
-----------------------	------

LISTA DE FIGURAS.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISION DE LITERATURA.....	3
Etiología.....	3
Epidemiología.....	4
Patogénesis.....	5
Diagnóstico.....	8
<i>Frotis de sangre periférica</i>	8
<i>Bioquímica</i>	9
<i>IFA</i>	9
<i>ELISA</i>	9
<i>Cultivo</i>	11
<i>PCR</i>	11
Tratamiento.....	13
Coinfecciones.....	14
Consideraciones en salud pública.....	15
MATERIALES Y METODOS	18
<i>Muestras</i>	18
<i>Extracción ADN</i>	17
<i>Diagnóstico de los géneros Ehrlichia-Anaplasma</i>	18
<i>PCR anidado</i>	18

<i>Electroforesis</i>	20
<i>Cuestionarios epidemiológicos</i>	20
<i>Análisis estadístico</i>	20
RESULTADOS.....	22
<i>Factores de riesgo</i>	24
<i>Secuenciación</i>	25
DISCUSION.....	26
CONCLUSIONES.....	29
LITERATURA CITADA.....	31

LISTA DE CUADROS

Cuadros

Página

1. Tabla de iniciadores, tamaño amplificado y programa en termociclador.....	19
2. Muestras positivas por especie y coinfecciones.....	20
3. Magnitud de asociación entre los casos de erliquiosis-anaplasmosis y la salida a la calle.....	24
4. Magnitud de asociación entre los casos positivos a enfermedades riquetsiales y el sexo.....	24

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Geles de agarosa para <i>Ehrlichia canis</i> mostrando 401 pb.....	21
2. Geles de agarosa para <i>Anaplasma platys</i> mostrando 345 pb.....	22
3. Gel de agarosa para <i>Anaplasma phagocythopylum</i> mostrando 935 pb.....	23
4. <i>Ehrlichia canis</i> EU376112.1.....	24

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por garrapatas representan un problema creciente de importancia en salud pública, ya que existen reportes en México que *A. platys* y *A. phagocytophillum* han infectado humanos (Guzmán et al, 2014; Silva et al, 2014). Patógenos riquetsiales como erliquiosis y anaplasmosis son transmitidas por la mordedura de la garrapata *R. sanguineus*, *Ixodes* y *Amblyomma americanum*, y causantes de enfermedades febriles agudas (Dema et al, 2005). *Anaplasma phagocytophilum* es causante de la anaplasmosis granulocítica canina y humana, *Anaplasma platys* de la trombocitopenia cíclica canina, *Ehrlichia canis* de la erliquiosis monocítica canina. Estas han sido identificadas como enfermedades infecciosas emergentes en Norteamérica, y el resto del mundo, pudiendo resultar mortales para perros y humanos (Sykes et al, 2010).

Las enfermedades transmitidas por vectores en caninos (ETVC) son comunes, incluyendo coinfecciones con más de un patógeno en perros, particularmente aquellos que están en constante y frecuente exposición a gran cantidad de especies de garrapatas (De Tommasi et al, 2013). Se considera la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* el vector para *E. canis* y *A. platys*, y el perro su reservorio primario. El impacto clínico de esta coinfección en la patofisiología de la enfermedad, induce una enfermedad más severa (Gaunt et al, 2010).

Núñez-ochoa y colaboradores (2003) reportaron una seroprevalencia global en México de 33.1% para *E. canis*, en ese mismo estudio estimaron una seroprevalencia del 61.5% para Sonora. Recientemente Movilla et al (2016), utilizando el SNAP® 4DX® (IDEXX® Laboratories) reportó la seroprevalencia más alta para la región noroeste para *E. canis* (51.0 %) y *Anaplasma* spp. (16.4 %). En otro estudio realizado en Yucatán obtuvieron una prevalencia del 36% utilizando técnicas moleculares (Pat-Nah 2015).

Considerando que no existen cifras actualizadas sobre la epidemiología de esta enfermedad en la región, el objetivo de este trabajo fue **estimar la prevalencia y factores de riesgo asociados para erliquiosis y anaplasmosis mediante PCR anidado en perros de la zona urbana de San Luis Río Colorado, Sonora, México**

REVISIÓN DE LITERATURA

Etiología

La erliquiosis canina es causada por las bacterias *Ehrlichia canis*, *E. ewingii* y *E. chaffeensis*. Son bacterias gram negativas intracelular obligadas, de forma cocoide pleomórfica del orden Rickettsiales, Familia: Anaplasmataceae, Género: *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia*. También dentro de esta familia se encuentran las bacterias *Anaplasma phagocytophilum* y *Anaplasma platys*, las cuales causan la anaplasmosis trombocítica y granulocítica canina respectivamente (Rikihisa et al, 1991; Dumler et al, 2010).

Son transmitidos a los perros y gatos por artrópodos, y muchos se mantienen en la naturaleza a través de la infección de animales salvajes hospedadores. Se reproducen por fisión binaria y tienen tropismo hacia células hematopoyéticas, dentro de las cuales, tienen preferencia por células huésped que infecten: monocitos, granulocitos o plaquetas. Residen en vacuolas de células eucariotas llamadas mórulas, las cuales son racimos de bacterias localizadas intracelularmente (Skotarczack et al, 2003).

Se transmite por la mordedura de la garrapata, entre ellas, *Rhipicephalus sanguineus*, causante principal de la erliquiosis monocítica canina (EMC) por *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys* causante de trombocitopenia canina. Así como también la garrapata *Dermacentor variabilis* actúa como vector. En un reporte en Brasil, se identificaron dos linajes de *R. sanguineus*, tropical y templado distribuidos en todo América del sur (Cicuttin et al, 2015).

Esta infección ha sido reportada en perros de Asia, África, Europa y en América. En Estados Unidos, está diagnosticada más frecuentemente en perros que viven en estados del sureste y suroeste, pero debido a la infección subclínica y crónica, los perros pueden ser transportados a regiones no endémicas y subsecuentemente desarrollar la enfermedad (Qurollo et al, 2014).

Los chacales, zorros y coyotes también actúan como hospedadores (familia Canidae). El organismo se transmite transestadialmente con la garrapata y no transovárica. No hay predilección de sexo o edad documentada, sin embargo, la raza Pastor Alemán son reportadas como susceptibles y su pronóstico es más pobre (Sykes et al, 2010; Harrus 2015).

A. phagocytophilum causa la anaplasmosis granulocítica canina. Se le llamó previamente *E. equi*, *E. phagocytophila*, y en humanos, ehrlichiosis granulocítica humana. Este organismo tiene la habilidad de causar la enfermedad en diversas especies de huésped como rumiantes, perro, gato, caballo, venado, variedad de roedores, coyotes, y es un importante patógeno emergente en humanos de distribución mundial. Su vector es el complejo *Ixodes persulcatus*: *I. scapularis* e *I. pacificus* en E.U, *I. ricinus* en Europa, probable *I. persulcatus* en Asia (Sainz et al, 2015). Uno de los mamíferos reservorios primarios en Estados Unidos es el ratón pata blanca, así como el venado cola blanca.

La anaplasmosis trombocítica canina es causada por *A. platys* donde las mórulas afectan las plaquetas. El vector se cree es *Rhipicephalus sanguineus* (Greene 2006).

Epidemiología

En Europa sólo se han identificado infecciones en perros por *E. canis*, *A. phagocytophilum* (donde la seroprevalencia va de un 0- 50% y 3-57% respectivamente) y *A. platys* donde la prevalencia varía del 4 al 70% (Sainz et al 2015).

En Estados Unidos, *Ehrlichia ewingii* fue la bacteria transmitida por garrapata más prevalente en el perro durante 2008-2010 y 2012 con 3.8% siendo consistente en otro realizado en el 2010 con el 5.1%, seguido fue *E. chaffeensis* con 3.1% y siendo para *E. canis* y *A. platys* la más baja (1.8% y 1.5% respectivamente). En el Caribe, fueron más altas con 27.6% y 10.3% respectivamente, y se esperaban por *R. sanguineus* (vector para *E. canis* y potencial vector en *A. platys*). En Canadá,

tuvo valores de seroprevalencia inesperadas ya que *Rhipicephalus sanguineus* está raramente documentada, fueron *E. canis* 3.2% y *A. platys* con 1.8% (Quorollo et al 2014).

En Europa, se reporta una seroprevalencia del 3-57%, para *A. phagocytophilum* siendo el vector *Ixodes ricinus*.

En 10 provincias en China se realizó detección molecular por PCR de enfermedades transmitidas por vectores, encontrando prevalencia para la enfermedad por *E. canis* de 1.3% y 4.1% en garrapatas *R. sanguineus* (Xu Da et al 2015).

En la República Mexicana se tiene una seroprevalencia para *E. canis* del 33.1% y en el estado de Baja California de 70.2% (Nuñez-Ochoa 2003). Situada en el noroeste, en Culiacán Sinaloa, tuvieron una seroprevalencia de 74.5% para *E. canis* en perros (Sosa Gutierrez et al, 2013).

En la ciudad de Mexicali, B.C, se han hecho estudios a perros donde obtuvieron una seroprevalencia del 49.3%. Así mismo en un estudio en el 2003, se encontró una alta prevalencia de garrapatas en perros, donde el 59.6% estaban infestados, identificándose en el 100% *Rhipicephalus sanguineus* (Tinoco et al, 2007, Tinoco et al, 2009).

Recientemente en otro estudio realizado en Mexicali, donde se realizó diagnóstico por PCR punto final, se tomaron 110 muestras en perros con signos compatibles con erliquiosis donde se identificó un 90% de infectados con *E. canis*, el 11.8% por *A. phagocytophilum* y *A. platys* con un 10% (Guzman et al, 2014).

Patogénesis del género *Ehrlichia*-*Anaplasma*

La infección del huésped vertebrado ocurre cuando la garrapata infectada ingiere sangre y sus secreciones salivales contaminan el sitio en donde se alimenta. La transmisión por *Rhipicephalus sanguineus* ocurre transestadialmente.

También se transmite por transfusiones de sangre de donadores infectados (Harrus 2015).

Las etapas en el proceso de invasión a la célula incluyen adhesión, internalización y proliferación celular, seguido por exocitosis y diseminación intercelular. Varios tipos de proteínas de membrana externas, incluyendo glicoproteínas (gp) 19, gp 36 y gp 140, están asociadas con la adhesión e internalización a células huésped (Harrus 2015).

El curso de la enfermedad se divide en tres fases: aguda, subclínica y crónica, basándose también en la signología clínica y anomalías clinicopatológicas.

La fase aguda se inicia después de un periodo de incubación de 8-20 días y dura de dos a cuatro semanas, durante las cuales las bacterias se multiplican en tejido reticuloendotelial. La bacteria entra al torrente sanguíneo y sistema linfático localizando las células del sistema fagocítico mononuclear del bazo, hígado y nódulos linfáticos donde comienza su reproducción en el citoplasma de los monocitos. En esta fase el canino puede manifestar fiebre, depresión, anorexia, linfadenomegalia y pérdida de peso. Descarga ocular y nasal, edema periférico y menos común, petequias y equimosis. Los signos neurológicos pueden incluir ataxia, convulsiones, signos vestibulares, defectos en nervios craneales, y pueden ocurrir como resultado de meningitis o hemorragias (Greene 2006).

Los hallazgos al laboratorio son: trombocitopenia, leucopenia, anemia e hiperglobulinemia. La trombocitopenia es uno de los principales hallazgos en esta enfermedad, que se desarrolla debido al incremento en el consumo de plaquetas por los cambios inflamatorios en el endotelio de los vasos sanguíneos incrementando el secuestro esplénico de plaquetas, y daño o destrucción inmunomediada, resultando en una disminución del promedio de vida de éstas, llevándolas de 9 días a 4 en promedio, después de 2-4 días del comienzo de la infección, además de la inhibición de migración plaquetaria (Waner et al, 2004).

Durante la fase activa, mecanismos inmunes asociados a células CD4 y citocinas tipo1 son requeridas para la inmunidad. Hay evidencia que las células CD8 y la inmunidad humoral tienen un rol significativo en la eliminación de *Ehrlichia* spp durante la fase activa. También ha sido reportado en perros con EMC, tienen niveles más altos de CD3, CD8 linfocitos T citotóxicos y menor CD21 linfocitos B en sangre periférica comparados con perros sanos (Villaescusa et al 2015).

Los signos agudos se pueden resolver después de 2-4 semanas después de lo cual, el perro puede permanecer infectado subclínicamente. Los signos que produce *A. phagocytophilum* pueden ser muy inespecíficos como fiebre, depresión, inapetencia y ocurren después de un periodo de incubación de 1- 2 semanas. Signos musculoesqueléticos como claudicación, rigidez y renuencia a caminar. Los hallazgos de laboratorio incluyen trombocitopenia, presente en el 80% de los casos, linfopenia, eosinopenia, y anemia no regenerativa. En la química sanguínea puede revelar hipoalbuminemia y enzimas hepáticas moderadamente elevadas (Sykes 2010). La infección parece ser inmunosupresora. El microorganismo sobrevive en los neutrófilos inhibiendo la fusión del fagolisosoma, inhibición de la apoptosis celular. Por lo que se está propenso a otras infecciones (Rikihisa 1991).

En el caso de *A. platys*, después de un periodo de incubación de 1-2 semanas, la trombocitopenia ocurre en intervalos entre 1-2 semanas. Las mórulas son visibles en frotis de sangre justo antes al decline de las plaquetas, pero desaparecen rápido. La severidad de los signos clínicos varía dependiendo del origen geográfico de la cepa de *A. platys* (Gaunt 2010).

La fase subclínica. Ésta se da de los 40-120 días pos infección, en la cual los perros se encuentran persistentemente infectados por meses o años sin signos clínicos pero sí con trombocitopenia leve. En perros infectados experimentalmente se ha identificado ADN de esta bacteria en aspirados esplénicos, obtenidos de 34 portadores persistentes, lo que sugiere que el bazo es el órgano donde permanece *E. canis* en los casos subclínicos (Harrus 1998). Inclusive se realizaron

experimentos donde se encontró que perros esplenectomizados presentaron una forma menos severa de la enfermedad aguda en comparación con los perros enteros. Estos resultados sugieren un compromiso del bazo en la patogénesis de EMC, por la liberación de mediadores de la inflamación y/o sustancias esplénicas, que han sido propuestas como un elemento fundamental en la patogénesis de la enfermedad (Harrus et al, 1999; Skotarczak 2003).

La persistencia a la infección está determinada por resultados de la variación antigénica de las proteínas de membrana externas, principalmente gp120 y p28 (Zhang et al, 2003).

Fase crónica: Puede presentarse meses o años después. Se caracteriza por letargia, inapetencia, tendencia a hemorragias como epistaxis, edema periférico, palidez, fiebre, pérdida de peso, linfadenomegalia, esplenomegalia, disnea, uveítis anterior, desprendimiento y hemorragia retinal. Los hallazgos de laboratorio más comunes son trombocitopenia, leucopenia, pancitopenia por hipoplasia de la médula ósea, hipergamaglobulinemia y en casos graves, llevar a la muerte del paciente. Infecciones oportunistas secundarias como papilomatosis, infecciones por protozoarios, infecciones del tracto urinario o recientemente, las coinfecciones con otros patógenos transmitidos por vectores (Skotarczak et al, 2003; Waner et al, 2000).

Diagnóstico

Frotis de sangre periférica.

Durante la primera semana de la enfermedad, el examen microscópico de frotis de sangre por tinción de Wright puede revelar mórulas (elementos mononucleares) en el citoplasma de monocitos, siendo sólo el 20% encontrado en los pacientes, y para *E. canis*, del 4-6%. Sin embargo, aunque las mórulas en neutrófilos infectados por *A. phagocytophilum* es hasta un 60%, no pueden ser diferenciadas de otras *Ehrlichia* spp (Mylonakis et al, 2003). La localización de la mórula en los neutrófilos en un área endémica es altamente sugestiva, sin

embargo no puede ser distinguida por *E. ewingii* y pueden estar presentes en un 7-37% de los neutrófilos circulantes (Skotarczak et al, 2003). Esta técnica tiene baja sensibilidad, debido a la pequeña cantidad de bacterias presente en la muestra, además de que las mórulas son visualizadas en la fase aguda (de Farias R. et al, 2012).

Bioquímica sanguínea

Las principales anormalidades bioquímicas vistas en los perros infectados con erliquiosis son la hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e hipergamaglobulinemia. La baja concentración de gammaglobulinas asociada a la pancitopenia sugiere que el estado inmune del animal pancitopénico infectado con *E. canis* está más comprometido y, por lo tanto, las infecciones secundarias pueden ocurrir más frecuentemente en estos perros. Un aumento transitorio moderado en la actividad de la aminotransferasa y de la fosfatasa alcalina puede presentarse (Skotarczak 2003).

IFA (Inmunofluorescencia indirecta)

Una de las ventajas de esta técnica es permitir determinación de los niveles de anticuerpos y sus cambios en el tiempo. La presencia de títulos de anticuerpos anti *E.canis* a una dilución mayor a 1:40 se considera evidencia de exposición. Es importante que el clínico tenga en cuenta las reacciones cruzadas que se presenten y que pueden confundir el diagnóstico. En áreas endémicas a otras especies de *Ehrlichia* las reacciones cruzadas ente *E.canis*, *E. ewingii*, deben tomarse en cuenta (Waner, Harrus 2004).

ELISA (Ensayo por inmunabsorción ligado a enzimas)

Técnicas cuantitativas de laboratorio son más sensibles y específicas que los test rápidos. Algunos kits comerciales son cualitativos y sólo muestran resultados positivos o negativos, sin decirnos la cantidad de niveles de anticuerpos. Una prueba serológica positiva indica una infección actual o pasada pero no siempre denota la condición de una enfermedad en curso. La persistencia

de anticuerpos pueden persistir por varios meses o años. Sin embargo la seroprevalencia en áreas endémicas es alta (Harrus 2002, Gaunt 2010).

Un perro puede ser seronegativo a pesar de tener una infección. Es común durante el periodo de incubación en las fases agudas de la enfermedad, cuando las cargas bacterianas son bajas: en *E. canis*, la producción de anticuerpos ocurre 12-14 días después de la infección (Little 2010).

Recientemente está colocado en el mercado Snap 4Dx® (laboratorios IDEXX USA), donde según los datos del fabricante reporta 96.2% de sensibilidad y 100% de especificidad para *E. canis*. ELISA es eficaz para detectar anticuerpos contra este agente en cualquier fase de la enfermedad, y se ha reportado una correlación muy estrecha entre los resultados de esta técnica e IFA, por lo que ELISA puede ayudar al diagnóstico de *E. canis*, sin embargo, se debe de tomar en cuenta las reacciones cruzadas que tiene con otras especies del género, como *E. chaffeensis* y *E. ewingii* (Waner, 2000), además de que su resultado no distingue entre una infección actual o una exposición pasada al agente. También se puede utilizar para detectar anticuerpos para *A. phagocytophilum* aunque falsos negativos pueden ocurrir en la fase aguda de la enfermedad. Puede ocurrir reacción cruzada con *Anaplasma platys* y posiblemente con otras especies *Ehrlichia* (Harrus 1998).

Ocurre reacción cruzada con serología de *E. ewingii* con antígeno *E. canis*, así como también de *E. chaffeensis* debido a esto, el diagnóstico por PCR específico ha sido desarrollado para esta especie y ofrece la única manera para confirmar la infección con *E. ewingii* (Sykes 2010).

Se acepta en general que no es muy relevante la reacción cruzada entre *Ehrlichia* y *Anaplasma*. Sin embargo, se ha descrito entre *E. canis* y *A. phagocytophilum*, particularmente cuando uno de los patógenos está presente en títulos muy altos. Aparentemente entre *E. canis* y *A. platys* no hay reacción cruzada, y si la hay entre *A. phagocytophilum* y *A. platys*. Cuando los anticuerpos tienen reacción cruzada con uno o más patógeno/antígeno, los títulos de anticuerpo que están más altos indican cual es el patógeno que está infectando al

perro. Debido a esto, la serología debe complementarse con técnicas moleculares como PCR o secuencia de DNA (Ahmad et al 2015).

Muchos perros con enfermedad aguda *A. phagocytophilum*, pueden ser negativos en serología, y los títulos pueden reflejar una exposición previa (hasta 8-10 meses antes). Por lo que la demostración de un aumento hasta cuatro veces puede ser requerido. En perros experimentalmente infectados, anticuerpos IgG son los primeros detectables 8 días después de la de la exposición inicial y 2-5 días después de la aparición de la mórula (Egenvall 2000).

Para *A. platys* hay reacción cruzada con *A. phagocytophilum* por lo que serología no es diagnóstica. En perros infectados experimentalmente con *A. platys*, los anticuerpos fueron detectados en el día 16 (Gaunt et al, 2010).

Cultivo

Cultivo en sangre para *E. chaffeensis* y para *A. phagocytophilum* se puede realizar en cultivo celular promielocítico humano HL-60 y en células ISE6, IDE8 de garrapata *Ixodes scapularis*. *E. canis* y *E. chaffeensis* se pueden cultivar en línea celular de macrófagos caninos DH82 (Nair 2016). Debido a *A. phagocytophilum* tiene preferencia para crecer en células granulocíticas, se ha propagado células humanas HL-60 y células de leucemia promielocíticas KG-1, mielomonocíticas THP-1, células endoteliales. El ligando más estudiado es PSGL-1 (CD162) al cual las bacterias se adhieren a superficie de proteína-2 (Msp2), el cual es una parte de complejo adhesina, donde dicha proteína es la más abundante de la bacteria (Dumler 2005).

PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Es muy útil en el diagnóstico y altamente sensible. La detección del DNA del patógeno específico en asociación clínica es la evidencia de una enfermedad activa. El PCR es una técnica que se ha desarrollado varios tipos: convencional, anidada, en tiempo real y múltiple. El PCR en tiempo real permite la cuantificación de cargas bacterianas. También nos permite investigar fragmentos de gen específicos después de la amplificación. La secuencia de fragmentos de gen

amplificados por PCR nos revela la identificación específica de especies de *Ehrlichia/Anaplasma* que infectan al perro (Sainz et al, 2015). El PCR en tiempo real fue desarrollado para detectar infección de *Ehrlichia* o *Anaplasma* en sangre periférica proporcionando alta sensibilidad similar a la obtenida con muestras esplénicas.. Se debe tener en mente que resultados falso negativos pueden ocurrir debido a la ausencia de patógenos en la muestra. Por ejemplo, la bacteremia puede ser intermitente en algunos perros o en enfermedad específica como *A. platys*, también por estar presente por debajo del nivel mínimo detectable de la prueba, puede estar ausente debido a la administración de antibiótico.

El PCR anidado tiene la ventaja de brindar alta sensibilidad y especificidad, ya que el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con iniciadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada, y para *E. canis* refieren que aumenta su sensibilidad hasta 100%, para *A. phagocytophilum* del 60-90% (Waner et al 2000; Dumler et al, 2007).

Un PCR negativo, debe ser interpretado como la no detección de DNA del patógeno en la muestra, mas no significa que la muestra este libre del patógeno. La muestra ideal para PCR es sangre periférica con EDTA. Se sugiere que aspirados esplénicos pueden ser especímenes óptimos. También cuando se localizan por microscopia mórulas en el citoplasma de neutrófilos o células mononucleares en tejido o fluido se utiliza para corroborar el diagnóstico. La única modalidad disponible para la identificación definitiva de *E. ewingii* en humanos es mediante PCR. (Brandon et al 2014).

Varias técnicas se han desarrollado para la detección de la bacteria *A. phagocytophilum* en sangre y en tejidos, como PCR convencional, anidado y en tiempo real, de los genes *16S rRNA*, *msh4*, *groEL*, *ankA* y *p44* (Ahmad et al, 2015). Se ha desarrollado PCR específica para *A. platys* utilizando aspirados esplénicos o de médula ósea, considerando realizarlo cuando en sangre salen negativos (Harrus 2004). En España la amplificación el gen *16S rRNA* y gen *gltA*, dio una cepa muy parecida a la registrada en Francia y Japón. En la amplificación del gen

gltA, un fragmento de 1443 pares bases fue obtenido, y solo se detectaron 3 nucleótidos diferentes en comparación con otras cepas (Aguirre et al 2006)

Tratamiento

El tratamiento de elección en perros para *E. canis* son tetraciclinas (clortetraciclina, oxitetraciclina, minociclina, doxiciclina). En particular doxiciclina a dosis de 5 mg/kg dos veces al día vía oral ó 10 mg/kg una vez al día por 28 días. En algunos casos se recomienda prolongar el tratamiento más de 4 semanas, en casos de portador subclínico (Carrade et al, 2009).

La doxiciclina además, tiene propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias asociadas con proliferación en la función de los leucocitos, síntesis de citocinas, y actividad metaloproteinasa. Afectan funciones quimiotácticas, fagocíticas y metabólicas de los neutrófilos, inhiben proliferación de linfocitos e induce apoptosis mediada ligando Fas/Fasm especialmente en células T. Inhiben la síntesis de algunas citocinas como factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , así como interleucinas (IL)-1,-2 y -6 (Villaescusa et al, 2015)

En un estudio donde se comparó el efecto de esta droga en perros sanos y enfermos con *E. canis* sobre los valores en hematología, química sanguínea y linfocitos en sangre periférica, encontraron que no hay cambios en los efectos antimicrobianos, incrementa la hemoglobina corpuscular media, aumento el conteo plaquetario, afecta el conteo de linfocitos B en sangre periférica, y disminuye niveles de creatinina sin cambios significativos en ambos grupos (Villaescusa et al 2015, Harrus 2015).

Para *A. phagocytophilum* la dosis de doxiciclina es de 5 mg/kg cada 12 hrs por 2-3 semanas y hay mejoría de los signos en 24-48 hrs. Se recomienda que si el perro con anaplasmosis diagnosticada que no responda rápido a la terapia o con moderada a severa enfermedad clínica, sean realizadas pruebas para otras enfermedades transmitidas por garrapatas (Alleman et al, 2008). Para *A. platys*,

doxiciclina 5 mg/kg cada 12 hrs por 2 semana, ó 5-10mg cada 12-24hrs por 8-10 días (Harvey 2006).

Coinfecciones

Las coinfecciones concurrentes de animales con dos o más vectores son relativamente comunes ya que algunas tienen el mismo vector. En consecuencia, coinfección con *E. canis* y *A. platys* ocurre frecuentemente (Gaunt et al, 2010).

Así también otras enfermedades transmitidas por vector se han mostrado coexistir en el mismo perro, incluyendo otros patógenos transmitidos por garrapatas (*Babesia*, *Hepatozoon spp.*), especies de mosquitos y parásitos intestinales. Debido al vector artrópodo compartido y la concurrente exposición a múltiples vectores, las coinfecciones ocurren con otros patógenos transmitidos por garrapata (*Borrelia*, *Bartonella*, *Rickettsia*, *Arboviral spp*). *A. phagocytophilum* y *B. burgdorferi* son transmitidas por la misma especie de garrapata *Ixodes*, las coinfecciones entre estos dos patógenos son comunes (De Tommasi et al, 2013; Quorollo et al, 2014).

Regularmente dichas coinfecciones tienden a empeorar las condiciones y enmascarar otras. Muchas enfermedades transmitidas por vectores tienen características especiales en causar signos clínicos similares y hallazgos de laboratorio en perros. Estas similitudes, complican el diagnóstico e incrementa la lista de diagnósticos diferenciales (De Tommasi et al, 2013)

En un estudio en Estados Unidos, determinaron la seroprevalencia y coinfección utilizando ELISA (SNAP M-A) de Idexx Laboratories, el cual abarcaba Estados Unidos, Canadá y el Caribe durante el periodo de 2008-2010 y 2012, donde la coinfección es definida como seroreactividad a más de un patógeno. *Anaplasma spp*, *Ehrlichia spp* o *Borrelia spp* (Bb), se detectó en 4.0%; seroreactividad a dos patógenos fue de 3.1%, a tres patógenos 0.7%, a 4 patógenos 0.1% y cinco patógenos 0.05%. Las coinfecciones más comunes fueron: *E. ewingii* + *E. chaffeensis*: 1.4%; *A. phagocytophilum* + *Bb*: 1.2%; *E. ewingii* + *Bb*: 0.6% y *E. canis* + *A. platys*: 0.3%. (Quorollo et al, 2014).

En un reporte indican la coinfección en la misma célula sanguínea con dos patógenos intracelulares transmitidos por el mismo vector *R. sanguineus* (*E. canis* y *Hepatozoon canis*) pero con diferente mecanismo de transmisión (Baneth, 2015).

Consideraciones de salud Pública

Debido a que la distribución de la garrapata cambia a través de las fluctuaciones de los ecosistemas, migración de vida salvaje, incremento en el transporte internacional de animales de compañía, el diagnóstico y manejo de enfermedades transmitidas por garrapatas en perros y humanos se ha vuelto medicamente complejo y más desafiante (Demma et al, 2005; Fourie et al, 2013).

El reconocer factores de riesgo y prevalencia individual y coinfecciones de una región en particular es epidemiológicamente importante para salud pública y para el diagnóstico en los clínicos (Qurollo et al, 2014).

Como factores de riesgo se mencionan actividades al aire libre de alto riesgo como jardinería, excursionismo, individuos inmunocomprometidos, personas que reciban transfusiones (Ahmad, 2015).

La erliquiosis monocítica humana (EMH), causada por *E. chaffeensis*, fue diagnosticada por primera vez en Estados Unidos en 1987. Después en 1990 basando en diferencias en la secuencia del gen que codifica 16S rRNA entre *E. canis* y la bacteria aislada del paciente, se consideró una nueva especie: *E. chaffeensis*. (Anderson BE, et al 1991). Se reportó el primer caso que involucró a médula ósea en una persona de 65 años (Brandon et al 2014). Durante el 2000-2007 se reportó en Estados Unidos un aumento en la incidencia de 0.80 a 3.0 casos por millón/persona/año. La letalidad fue de 1.9 y el rango de hospitalización fue de 49% (Dahlgreen et al 2011).

En humanos *Anaplasma phagocytophilum* causa la anaplasmosis granulocítica humana, es una enfermedad febril parecida a la del perro. La muerte es rara, pero ha ocurrido por complicaciones por infecciones secundarias. Los perros son muy importantes al actuar como centinelas para la infección en humanos (Dumler 2005). Es reconocida en Estados Unidos, en Estados del atlántico medio, en oeste medio, y norte de California, así como muchos lugares

en Europa y Asia donde las garrapatas *Ixodes* muerden humanos. Las manifestaciones más frecuentes en humanos son malestar, fiebre, mialgia, y dolor de cabeza, una minoría puede presentar también artralgia, vómito, diarrea, afectación a tracto respiratorio, hígado o sistema nervioso central. Las anormalidades de laboratorio más frecuentes son: trombocitopenia, leucopenia, anemia y elevaciones en transaminasa hepática. Estudios seroepidemiológicos sugieren que muchas infecciones no son reconocidas y en áreas endémicas de Estados Unidos representa un 15 a 36% de la población que ha sido identificada, reportándose en 42 ciudades en el mundo, con un 5% de letalidad global (Dumler et al, 2005).

En Estados Unidos, durante el periodo 2000-2007, la incidencia se incrementó de 1.4 a 3.0 casos por millón por persona/año, y un rango de fatalidad del 0.6% y de hospitalización del 36%. (Dahlgren et al, 2011).

Cabe mencionar que en dicho país desde 1998 la anaplasmosis y erliquiosis humana son enfermedades notificables a nivel nacional y deben ser reportados al departamento de salud del Estado o a Centros de control y prevención de enfermedades (CDC 2013). En un reporte del 2005, la incidencia de dichas enfermedades durante 2001-2002 fue 0.6-1.4 casos por millón, por lo que es notable su incremento durante los últimos años (Demma et al, 2005).

En Europa, una seroprevalencia mediana de 6.2-21% y en otros estudios desde 1-21% (Dumler et al, 2005, Ahmad 2015). Aproximadamente un 5-7% de los pacientes requieren hospitalización.

Recientemente en Mexicali, B.C. en un estudio utilizando PCR punto final para los generos *Ehrlichia* y *Anaplasma*, se analizaron 200 muestras de personas con signos compatibles con riquetsiosis, donde el 96.5% resultó infectado por *E. canis*, por *A. platys* con un 19%. y *A. phagocytophilum* 2%. Esta ultima especie, el vector transmisor de dicha enfermedades, no se encuentra en et al, 2014).

En Mexicali, *R. sanguineus* es la única garrapata reportada hasta el momento en la entidad, sugiriendo que esta puede actuar como transmisora en los patógenos encontrados. El 65.1% de perros muestreados en Mexicali resultó con

infestación de garrapata *R. sanguineus* (Haro-Álvarez et al, 2007; Tinoco-Gracia et al, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se analizaron un total de 231 muestra de ADN obtenidas de perros con propietario de la zona urbana en la ciudad de San Luis Río Colorado Sonora durante el periodo del 15 de junio 2014 al 15 de junio del 2015 y que pertenecían al banco de sangre del laboratorio de Salud Pública Veterinaria Fueron analizadas con el fin de identificar las bacterias que producen enfermedades rickettsiales tales como *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* y *Anaplasma phagocytophilum*.

Extracción del ADN

Se realizó la extracción de ADN con el kit (DNeasy Blood & Tissue Kit (250) Qiagen®) solo a las muestras que eran insuficientes (debido a que se hubiera terminado la muestra o no fuera suficiente para el PCR).

Diagnóstico de los géneros *Ehrlichia-Anaplasma* (EA)

La presencia de los géneros *Ehrlichia-Anaplasma* (EA) en perros se estimó mediante PCR convencional, amplificando el gen 16S rRNA del género, obteniendo 31 muestras positivas, las cuales, fueron seleccionadas para realizar PCR anidado (lista de iniciadores en cuadro 1),

PCR anidado

De las 31 muestras que fueron positivas para el género EA se procedió a realizar el PCR anidado para el género y especie *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* y *Anaplasma phagocytophilum*. (Lista de iniciadores, tamaño amplificado y protocolos en cuadro 1). Para *Ehrlichia canis* se utilizó un control positivo y control negativo, en los demás, 2 controles negativos. El primer control negativo contenía la mezcla maestra (Taq polimerasa, agua molecular e iniciadores de primer paso) sin ADN, y para anidar, se tomaba 1µl de esta reacción y se colocaba con la

mezcla maestra e iniciadores del segundo paso. El segundo control negativo se realizó con la mezcla maestra y el par de iniciadores del segundo paso. Los protocolos en el termociclador Techne-Genius para cada par de iniciadores se realizaron de acuerdo a los autores citados.

Cuadro 1. Tabla de iniciadores, tamaño amplificado y programa en termociclador

Patógeno	Secuencia de oligonucleótidos	Tamaño amplificado pb	Programa de amplificación
<i>Ehrlichia-Anaplasma</i>	EHR16SD (5'-GGTACCYACAGAAGAAGTCC-3') EHR16SR (5'-TAGCACTCATCG TTTACAGC-3') (Fernandes-Ferreira, Figueiredo-Cerqueira et al. 2007)	345	Desnaturalización 95°C/min Ciclos40 { 94°C/1 min 60°C/1 min 72°C/1 min Extension { 72°C/5 min Hold 8°C
<i>Ehrlichia canis</i>	ECC (AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC) ECB (CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA) (Fernandes-Ferreira et al., 2007) Anidado ECAN5 (CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA)	478	Desnaturalización 95°C/min Ciclos40 { 94°C/1 min 60°C/1 min 72°C/1 min Extension { 72°C/5 min Hold 8°C
<i>Anaplasma platys</i>	HE3 (TATAGGTACCGTCATTATCTTCCTAT) Kocan et al., 2000, Murphy et al., 1998, Kim et al. 2006, Wen et al., 1997, Breitschwerdt et al., 1998) Anidado EPLAT5 (TTTGTCGTAGCTTGCTATGAT) EPLAT3 (CTTCTGTGGGTACCGTC)	401 359	Desnaturalización 95°C/5 min Ciclos40 { 94°C/30 seg 53°C/1 min 72°C/15 seg Extension { 72°C/5 min Hold 8°C
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	EE-1 (TCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCC) EE-2 (AGTCACTGACCCAACCTTAAATGGCTG) EE-3 (GTGGAACGGATTATTCTTTATAGCTTGC) EE-4 (CCCTTCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC) (Barlough et al., 1996, Kim et al., 2006, Madigan et al., 1995, Yang et al., 2013).	928	Desnaturalización 95°C/5 min Ciclos40 { 94°C/1 min 56°C/2 min 72°C/15 seg Extension { 72°C/5 min Hold 8°C

Electroforesis

Los productos de amplificación de PCR fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (Agarose LE, Analytical Grade Promega, Co USA) en solución amortiguadora TAE 1X (Tris acetato, EDTA), utilizando SafeView® Classic, (Applied Biological Materials Inc.) durante 30 minutos. Se consideró una muestra positiva cuando en la revisión en la cámara ultravioleta, coincidiera con el marcador de pares de bases y la banda de peso específica para cada uno de los patógenos, en el caso de E. canis, con el control positivo. Para prevenir la contaminación de las muestras, las preparaciones, la extracción del ADN, la amplificación y detección de productos de PCR se realizaron en diferentes áreas de laboratorio (Chang et al., 2000).

Cuestionario epidemiológico

Con el fin de evaluar los factores de riesgo para la presencia de enfermedades riquetsiales se utilizó un cuestionario epidemiológico que incluyó: la edad (≤ 1 año y > 1 año), el sexo, salida a la calle de la mascota, fumigación, presencia de escombro, presencia garrapatas, desparasitación, vive dentro o fuera de casa, si lleva al médico veterinario, si es importante llevar la mascota al médico veterinario, emaciación, claudicación y depresión.

Análisis Estadístico

Se realizó un estudio observacional transversal utilizando una base de datos generada en programa EXCEL con la información de los cuestionarios epidemiológicos aplicados a los propietarios. La prevalencia se obtuvo a partir de la fórmula de Daniel (2002):

$$\text{Prevalencia} = \frac{\text{número de positivos}}{\text{número de muestras analizadas}} \times 100$$

Para evaluar si los factores de riesgo estuvieron asociados a la enfermedad se utilizó chi-cuadrada en el programa Statistix 9®, además se estimó la razón de momios (OR) con índice de confianza IC 95%.

RESULTADOS

De las 231 muestras, 31 (13.4%) fueron positivas para los géneros EA, de las cuales 18 (7.8%) fueron positivas para la infección por *E. canis* (figura 1), 17 (7.3%) para *A. platys* (figura 2) y 2 (0.8%) para *A. phagocytophilum* (figura 3).

De las 31 muestras que resultaron positivas a los géneros EA, se encontraron 4 coinfecciones con *E. canis* y *A. platys* (12.9%), una para *E. canis* y *A. phagocytophilum*, y otra para *A. platys* y *A. phagocytophilum* (3% para ambas).

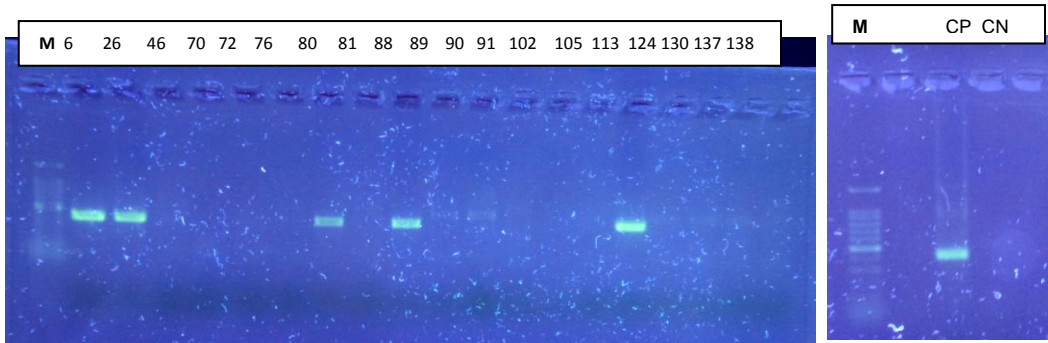
Cuadro 2.- Muestras positivas por especie y coinfecciones

Género	Positivos/analizadas	Prevalencia
EA	31/231	13.4%
<i>E. canis</i>	18/231	7.8%
<i>A. phagocytophilum</i>	2/231	0.8%
<i>A. platys</i>	17/231	7.3%

Coinfecciones

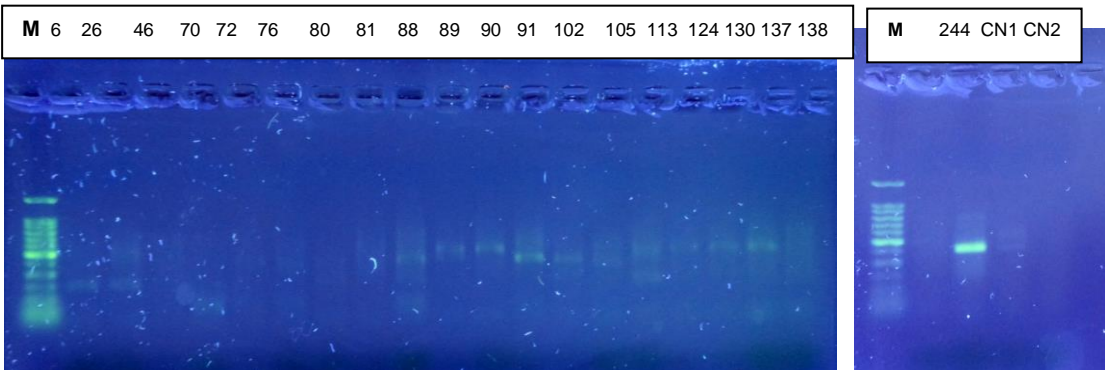
<i>E. canis</i> + <i>A. platys</i>	4/31	12.9%
<i>E. canis</i> + <i>A. phagocytophilum</i>	1/31	3.2%
<i>A. platys</i> + <i>A. phagocytophilum</i>	1/31	3.2%

Figura 1. Geles de agarosa para *Ehrlichia canis* mostrando 401 pb



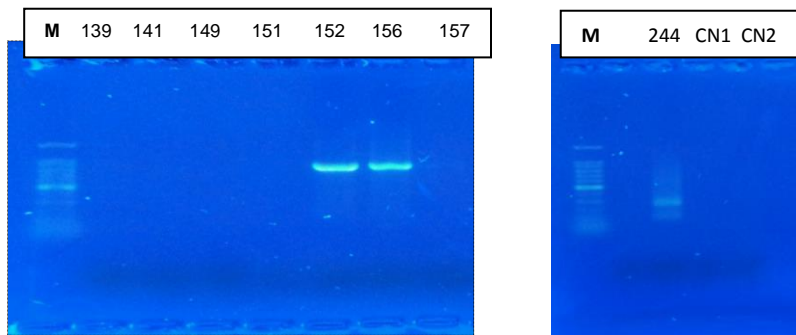
M: marcador pares de bases (100pb), CP control positivo, CN(-): control negativo

Figura 2. Geles de agarosa para *Anaplasma platys* mostrando 345 pb



M: marcador de pares de bases (100pb), CN1: control negativo 1, CN2: control negativo 2

Figura 3. Gel de agarosa para *Anaplasma phagocytopillum* mostrando 935 pb



Factores de riesgo

El cuadro 3 muestra la asociación entre los casos de erliquiosis-anaplasmosis y la salida de los perros a la calle, donde se puede observar que los perros que salen a calle tiene 2 veces más probabilidad de enfermar que los que no salen a la calle.

Cuadro 3. Magnitud de asociación entre los casos de erliquiosis-anaplasmosis y la salida a la calle.

Variable	EA+	EA -	TOTAL	OR	95% IC
Salen a la calle	21	96	117	2.31	1.03 - 5.17
No salen calle	10	106	116		
Total	31	202	233		

$P < 0.05$

OR= Odds Ratio.

95% IC = Intervalo de confianza

Con respecto al sexo, las hembras presentaron 2.5 veces más probabilidad de presentar estas enfermedades con respecto a los machos (cuadro 4).

Cuadro 4. Magnitud de asociación entre los casos positivos a enfermedades riquetsiales y el sexo.

Variable	EA+	EA -	TOTAL	OR	95% IC
Macho	14	136	150		
Hembra	17	66	83	2.5	1.016 - 5.38
Total	31	202	233		

EA *E. canis*, *A. platys*, *A. phago*

$P < 0.05$

OR= Odds Ratio.

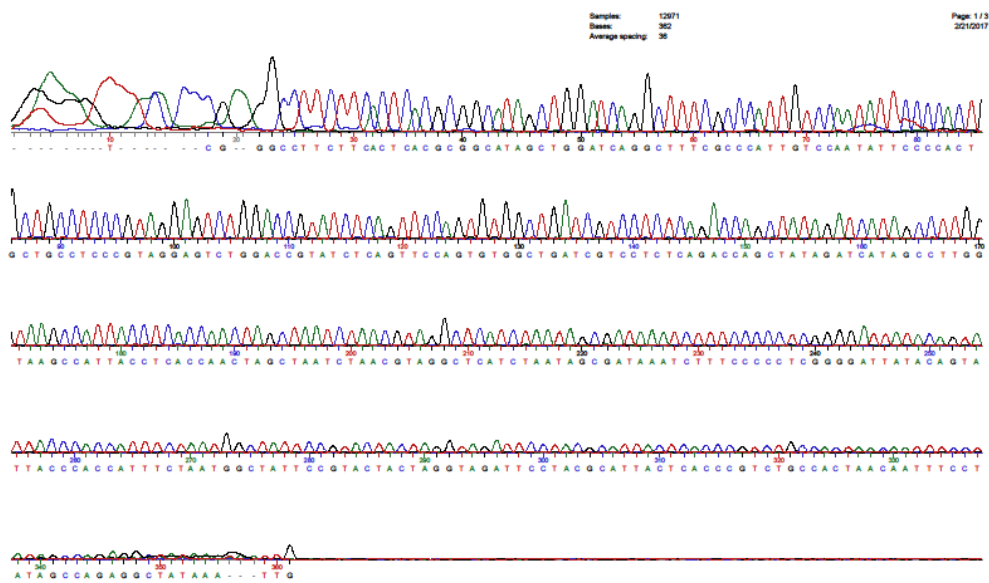
95% IC = Intervalo de confianza

En las demás variables no se encontró asociación estadísticamente significativa con la enfermedad.

SECUENCIACIÓN

Ocho muestras positivas para *E. canis*, 2 para *A. platys* y 1 para *A. phagocytophilum* se mandaron secuenciar al laboratorio Eurofins MWG Operon y al Laboratorio de Ecología y Enfermedades Infecciosas de la Universidad de California, Davis. Fueron analizadas con el programa BLAST de National Center for Biotechnology Information (NCBI), obteniendo una similitud entre 97-99%. Coincideron en los registros para *E. canis* EU376112.1, para *A. platys* KU500911.1 y para *A. phagocytophilum* KY458570.1.

Figura 4. *Ehrlichia canis* EU376112.1



DISCUSIÓN

Este trabajo representa el primer estudio mediante PCR anidado para la identificación de las especies *E. canis*, *A. platys* y *A. phagocytophilum* en muestras sanguíneas de perros del Estado de Sonora. La prevalencia para el género *Ehrlichia-Anaplasma* fue de 13.4%, para erliquiosis por *Ehrlichia canis* fue 7.8%, para Anapalsmosis por *Anaplasma platys* de 7.3% y para *Anaplasma phagocytophilum* de 0.8%

Actualmente, la prevalencia de la infección de *E. canis* por PCR en el Estado de Coahuila y Durango fue 4% en una población de 100 perros sanos infestados con garrapatas (Almazán et al, 2016), la cual es similar a la obtenida en este estudio de 8%. En Costa Rica se encontró una seroprevalencia para *E. canis* de 32.1% en perros, de los cuales mediante PCR, se encontró solo 3.2% con la bacteria, donde atribuyeron la discrepancia de resultados entre estas técnicas, es que pudiera estar relacionado al estado de infección del perro (Barrantes-González et al, 2016). También en Buenos Aires, Argentina, los resultados fueron similares, de 223 perros, el 6.7% (15/30) fue positivo para *E. canis* y el 7.2% (16/30) para *A. platys* (Cicutin 2016). En Uruguay, 4/191 (4.2%) fue positivo para *A. platys*, ninguno para *E. canis* (Carvalho 2017). En Yucatán, México estimaron un 36% por PCR anidado para *E. canis* en perros, sin embargo este porcentaje se encontró solo en perros de control animal, ya que los perros de casa muestreados no presentaron la infección por lo que en éstos perros se elevó hasta el 45% (Path-Na Henry et al 2015).

En este estudio, probablemente, al ser perros con propietario de la zona urbana de San Luis, el porcentaje de infección por fue menor, ya que los perros al andar en zonas suburbanas pudieran infestarse de garrapatas más frecuentemente y contraer la enfermedad. Este estudio difiere de las altas prevalencia para erliquiosis encontradas en Sudamérica donde hay reportes de hasta 69% en Brasil (Tanikawa et al 2013), 54% en Colombia (Rojas et al 2013), 47% en Costa Rica (Romero et al 2011).

En contraste con Estados Unidos, en el área surcentral, la prevalencia para la infección por *E. canis* es 0.9 %, *A. platys* de 2.3% y 0% para *A. phagocytophilum*, siendo *E. ewingii* el agente más identificado, sin embargo la garrapata *Amblyomma americanum* en esa zona es abundante (Little et al, 2010). En otro reporte en Estados Unidos, Canadá y el Caribe, utilizando el SNAP® Multi-Analyte Assay (SNAP® M-A) (IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, Maine, USA), en 6582 sueros de perros entre 2008-2010 y 2012, la seroprevalencia en Estados Unidos fue de 1.8% de infección para *E. canis*, 1.5% para *A. platys*, 3.4% *A. phagocytophilum*, siendo *E. Ewingii* el agente más identificado con 3.6%; para Canadá, 3.2% *E. canis* y 1.8% *A. platys*, para el Caribe 27.6% y 10.3% respectivamente (Qurollo et al, 2014).

Es importante tener en cuenta que las infecciones subclínicas y crónicas no se diagnostican tan fácilmente como infecciones agudas cuando se utiliza la sangre canina para la detección de *E. canis*. Por lo tanto, idealmente, para realizar PCR se debe considerar utilizar la sangre y los aspirados esplénicos para superar esta limitación (Harrus 2004).

Respecto a las coinfecciones, en este estudio, se encontró 19.3% (6/31); siendo el más común *E. canis* y *A. platys* con un 12.9% (4/31), seguido de *E. canis* y *A. phagocytophilum* con 3.2% (1/31); así como *A. platys* y *A. phagocytophilum* 3.2% (1/31). No se encontraron coinfecciones con tres agentes. Este porcentaje es similar con el estudio realizado en Estados Unidos donde se reporta 15.4% de coinfección y 13.3% para un agente (Little et al 2010). En el reporte con péptidos específicos (Qurollo et al, 2014) las coinfecciones fueron de 4%, dos patógenos 3.1%, tres patógenos 0.7%, cuatro patógenos 0.1% y cinco patógenos 0.05%. De los cuales, la coinfección más común fue *E. ewingii* con *E. chaffeensis* (1.4%), y la más baja *E. canis* y *A. platys* (0.3%).

Respecto a los factores de riesgo evaluados, los que tuvieron un nivel de significancia $P < 0.05$, fueron las hembras respecto a machos (OR 2.5) y el salir a la calle OR 2.5. Factores como la edad (≤ 1 año y > 1 año), fumigación, presencia de escombros, presencia de garrapatas, desparasitación, si vive dentro o fuera de casa, si lleva al médico veterinario, si es importante llevar la mascota al médico

veterinario, emaciación, claudicación y depresión, no se observó correlación significativa en el presente estudio.

Referente al factor de riesgo por sexo, hay estudios como el de Costa 2007, donde los machos fueron reportados con una alta asociación para la seropositividad para *E. canis*, ya que al ser preferidos en granjas porque ayudaban en el trabajo con el ganado y otros animales de producción tenían mayor exposición a los vectores por garrapatas. También Batmax 2001 y Maazi et al 2014 encontraron relación significativa en los machos. Otros estudios no han encontrado correlación entre sexo y la positividad de estas enfermedades (Carvalho et al 2008, Rodríguez-Vivaz et al 2005; Brandao et al 2015). Sin embargo, en la revisión de este trabajo, las hembras fueron estadísticamente significativas, y por lo que se asocia a la probable llegada de perros machos hacia la hembra por cuestiones de reproducción y así contagiar con el vector y/o por la salida a la calle de las hembras por la misma razón. Hasta el momento de la revisión bibliográfica de este trabajo, solo se encontró un estudio por Dzieguel et al (2016) con ese factor de riesgo asociado solo a *E. canis*

La salida o acceso a la calle como factor de riesgo, coincide con otros estudios realizados (Barrantes-González et al 2016), ya que están expuestos a adquirir el vector al andar fuera de casa y contagiarse del vector o varios de ellos.

CONCLUSIÓN

Se identificaron molecularmente mediante PCR anidado las especies *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* y *Anaplasma phagocytophilum* en perros con propietario de la ciudad de San Luis Río Colorado, Sonora. La prevalencia encontrada para Erliquiosis fue de 7.3% y Anaplasmosis fue de 7.8 (*A. platys*) y 0.8% (*A. phagocytophilum*). Se considera un porcentaje bajo para erliquiosis canina ya que es una zona con el clima cálido y condiciones favorables para la bacteria, sin embargo se debe tener en cuenta que algunos perros pueden ser portadores subclínicos y otros con enfermedad crónica y aunque en estudios de laboratorio pudieran ser consistentes con erliquiosis, es necesario complementarlo con otras técnicas diagnósticas.

Aunque no se encontraron prevalencias tan altas como en otras regiones del país, o regiones de Sudamérica es importante tomar las medidas preventivas en las mascotas para que en un futuro dichas enfermedades no puedan dispersarse en la población canina además de considerar el riesgo zoonótico que implican.

También se identificaron coinfecciones entre estas especies por lo que el Médico Veterinario debe considerarlas en aquellos pacientes que pudieran presentar signología más severa o persistente. Se debe tener en cuenta que un diagnóstico fiable debe ser basado en signología clínica, análisis de laboratorio, pruebas serológicas y métodos de detección molecular en los pacientes ya que no existe un método único que garantice el diagnóstico exacto de estas enfermedades.

Respecto a los factores de riesgo encontrados, la salida a la calle ha sido identificada en otros estudios, como Movilla en 2016, indico que tienen un riesgo de infección del 42%, ya que están expuestos a adquirir el vector. Las hembras como factor de riesgo, no muy reportado a diferencia de los machos que hay más estudios, sin embargo en este trabajo, se asocia a probable época reproductiva y acceso a la calle o acercamientos de perros de la calle para fines reproductivos.

LITERATURA CITADA

- Aguirre E, Tesouro M. A., 2006. Genetic Characterization of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* in dogs in Spain. J. Vet. Med. B53,197-200. 2006
- Ahmad Farman. 2015 *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: Rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. Parasitol Res;114:3341-57.
- Alleman R., Heather W.2008. An update on anaplasmosis in dogs. Vet Med 212-220.
- Almazán C., González-Alvarez V, H., De Mera F., Cabezas-Cruz A., Rodríguez-Martínez, De La Fuente J. 2016. Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. Ticks Tick Borne Dis. 7:276–83.
- Anderson B.E., Dawson J.E. 1991. *Ehrlichia Chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. J Clin Microbiol,29, 2838-2842.
- Baneth G., Harrus S. 2015. Canine vector-borne co-infections: *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* in the same host monocytes. Veterinary parasitology 208 (30-34).
- Barlough, J. E., Madigan, J. E., Derock, E. & Bigornia, L. 1996. Nested polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia equi* genomic DNA in horses and ticks (*Ixodes pacificus*). Vet Parasitol, 63, 319-29.
- Barrantes-González A., V., Jiménez R., A., Romero, Z., J. 2016. Serology, molecular detection and risk factors of *Ehrlichia canis* infection in dogs in Costa Rica. Ticks and tick-borne Diseases 7 1245-1251.
- Batmaz H, Nevo E, Waner T, Senturk S, Ylmaz Z, Harrus S. 2001. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Turkey. Vet Rec. 148: 665–666.
- Brandon Allen M., Pritt B.S. 2014. First reported case of *Ehrlichia ewingii* involving human bone marrow. J.Clin Microbiol 52(11):4102-4104.
- Brandao Guedes P. M., De Andrade O. T., Carvalho F.S., Alberto C.S., Albuquerque G. R. 2015. Canine ehrlichiosis: prevalence and epidemiology in northeast Brazil. Braz J Vet Parasitol, 24(2):115-121.

- Breitschwerdt Edward, Hegarty B.C. 2014. Intravascular persistence of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewwingii* DNA in the blood of a dog and two family members. *Parasites and vectors* 7:298.
- Carvalho L., Armua F. M., Sosa N., Felix M., L., Venzal J., M. 2017. *Anaplasma platys* in dogs from Uruguay. *Ticks and tick-borne Disease*. 8 241-245.
- Carvalho F. S., Wenceslau A. A., Carlos R. S., Albuquerque G. R. 2008. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. *Genet Mol Res*. 2008 Jul 29; 7(3):657-62.
- Carrade D. D., Foley J. E., Borjesson D. L., Sykes J. E., 2009. Canine granulocytic Anaplasmosis: A review. *J Vet Intern Med*. 23(6):1129-1141. oi:10.1111/j.1939-1676.2009.0384.x.
- CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC).2013.Statistics and epidemiology of anaplasmosis. <http://www.cdc.gov/anaplasmosis/>.
- Chang, Y. F., Novosol, V., Mcdonough, S. P., Chang, C. F., Jacobson, R., Divers, T., Quimby, F. W., Shin, S. & Lein, D. H. 2000. Experimental Infection of Ponies with *Borrelia burgdorferi* by Exposure to Ixodid Ticks. *Vet Pathol*, 37, 68-76.
- Cicuttin G., Tarragona E.L. 2015. Infection with *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* (Rickettsiales:Anaplasmataceae) in two lineages of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari:Ixodidae) from Argentina. *Ticks and Tick borne diseases*. 724-29.
- Cicuttin L., G., De Salvo N., M., Gury D., F. 2016. Molecular characterization of *Ehrlichia Canis* Infecting Dogs, Buenos Aires. *Ticks And Tick-Borne Diseases* 7 954-957.
- Costa L. M., Rembeck K, Ribeiro M. F, Beelitz P., Pfister K., Passos L. M. 2007 Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. *J Vet*. 174: 673– 676.
- Dahlgreen F. S., Mandel E.J. 2011. Increasing incidence of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* in the United States 2002-2007. *Am J Trop Med Hyg*. 85(1),2011,124-131.
- Demma L., Holman R.C. 2005. Epidemiology of human ehrlichiosis and anaplasmosis in the United States 2001-2002. 2005 *Am J Trop Med Hyg* 73(2),400-409.

- De Farias R. T. E., Paiva de Almeida A. M., Camboin L. E. M., Antas C. A., Alves C. E. K. 2012. An Assessment of whole blood and fractions by nested PCR as a DNA source for diagnosing canine ehrlichiosis and anaplasmosis. The Sc World J. Article ID 605743. Doi:10.110/2012/605743.
- De Tommasi A. S., Otranto D. 2013. Are vector-borne pathogen coinfections complicating the clinical presentation in dogs?. *Parasites & vectors*, 6:97.
- Dumler J. S., Barbet A. F. 2001. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order of Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designations of *Ehrlichia equi* and 'HGE' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophilum*. *Inter J of Syst and Evol Microb* 51, 2145-65.
- Dumler J. S., Choi K.S. 2005. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerging infectious disease* .11,12:1828-1834.
- Egenvall A., Lilliehook I., Bjoersdoff A., Engvall E.O. 2000. Detection of granulocytic *Ehrlichia* species DNA by PCR in persistently infected dogs. *Vet Rec* 146(7):186-90.
- Fernandes-Ferreira, R., Figueiredo-Cerqueira, A., Müller P. A., Matheus-Guimarães, C., Garcia De Sá, A., Da Silva A., F., Massard, C. & Pereira Almosny, N. R. 2007. *Anaplasma platys* Diagnosis in Dogs: Comparison Between Morphological and Molecular Tests. *Intern J Res Med*, 5, 113-119.
- Fourie J. J., Luus H.G. 2013. The efficacy of Advantix to prevent transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Parasite*, 20, 36.
- Gaunt, S., Beall, M., Stillman, B., Lorentzen, L., Diniz, P., Chandrashekar, R. & Breitschwerdt, E. 2010. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasit Vectors*, 3, 33.
- Greene C.E. . 2006. *Infectious Diseases of the dog and cat*. New York: Elsevier Health Sciences 3.
- Guzmán T. J., Tinoco-Gracia L., Medina B.G. López V. G. 2014. Detección e identificación mediante PCR punto final de *E. canis*, *A. phagocytophilum* y *a. Platys* en humanos y perros de Mexicali, Baja California. Tesis de Maestría. Univ Auton Baja California.

- Haro-Alvarez, P., López V. G., Tinoco-Gracia, L., Rentería E, T. & Medina-Basulto, G. 2007. Seroprevalence and Traceback of Animals Suspected of Carrying *Ehrlichia canis*, in Dogs Attended in Veterinary Clinics in Mexicali, Baja California, Mexico *Journal of Animal and Veterinary Advances.*, 6, 850-854.
- Harrus S., Allerman A.R., Bark H., Mahan S.M., 2002. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. *Vet Microbiol* 86(4):361-8.
- Harrus S. 2015. Perspectives on the pathogenesis and treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). 2015. *The veterinary Journal* 204, 239-40.
- Harrus S., Waner T., Aizenberg I., Foley Je Poland A.M., Bark H. 1998. Amplification of erlichial DNA from dogs 34 months after infection ith *Ehrlichia canis*. *J Clin Microbiol* 36(1):73-6.
- Harrus S., Waner T., Bark H., Jongejan F., Cornelissen Aw. 1999. Recent avances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *37:2745-2749*.
- Harrus S., Kenny M., Miara L., Aiseberg I., Waner T. 2004. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for dignosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. *Antimicrobials agents of Chemotherapy* 48 4488-4490.
- Harvey J.W., 2006. Thrombocytotropic anaplasmosis (*A. platys* [*E. platys*] infection) in Greene CG infectious disease of the dog and cat. 3rd ed 229-31.
- Kim, C. M., Yi, Y. H., Yu I, D. H., Lee, M. J., Cho, M. R., Desai, A. R., Shringi, S., Klein, T. A., Kim, H. C., Song, J. W., Baek, L. J., Chong, S. T., O'guinn M, L., Lee, J. S., Lee, I. Y., Park, J. H., Foley, J. & Chae, J. S. 2006. Tick-borne rickettsial pathogens in ticks and small mammals in Korea. *Applied and environmental microbiology*, 72, 5766-76.
- Kocan, A. A., Levesque, G. C., Whitworth, L. C., Murphy, G. L., Ewing, S. A. & Barker, R. W. 2000. Naturally occurring *Ehrlichia chaffeensis* infection in coyotes from Oklahoma. *Emerging infectious diseases*, 6, 477-80.
- Little S.E.2010. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Vet clin North Am Small Anim Prac* 40(6):1121-40.
- Little S., O Connor P., T., Hempsted J., Saucier J. 2010. *Ehrlichia Ewingii* infection and exposures rates in dogs from the southcentral United States. *Veterinary Parasitology* 175 355-360.

- Madigan, J. E., Richter, P. J., Jr., Kimsey, R. B., Barlough, J. E., Bakken, J. S. & Dumler, J. S. 1995. Transmission and passage in horses of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *The Journal of infectious diseases*, 172, 1141-4
- Mylonakis M.E., Koutinas A.F., Billins C.,2003. Evaluations of citology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Vet Microbiol.* 91(2-3):197-204.
- Movilla R., Garcia C., Siebert S., Roura X. 2016. Countrywide Serological evaluation Of Canine Prevalence For *Anaplasma spp.*, *Borrelia burgdorferi* (Sensu Lato), *Dirofilaria Immitis* And *Ehrlichia Canis* In Mexico. *Parasites And Vectors* 9 421. DOI 10.1186/S13071-016-1686-Z
- Murphy, G. L., Ewing, S. A., Whitworth, L. C., Fox, J. C. & Kocan, A. A. 1998. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Veterinary parasitology*, 79, 325-39.
- Nair A. D. S., Cheng C.,Ganta C.K., Sanderson M.W. 2016. Comparative experimental infection study in dogs with *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *Anaplasma platys* and *A. phagocytophilum*. *PLOS ONE* 11(2):doi:10.1371/journal.pone.0148239.
- Núñez-Ochoa . 2003. "Estudio de la seroprevalencia de *Ehrlichia canis* en México." *AMMVEPE* 14(4): 83-85.
- Parola Philippe, Paddock C.D., 2013. Update on tick-borne Rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clinical Microbiology Reviews.*,26,4:657-702.
- Pat-Nah Henry, Rodriguez-Vivas R. I., Bolio-Gonzalez M.E., 2015. Molecular diagnosis of *Ehrlichia Canis* in Dogs and ticks *Rhipicephalus sanguineus* (acari:Ixodidae) in Yucatan, Mexico. *J. Med. Entomol.* 52(1): 101-104.
- Qurollo B., Hegarty B.C., 2014. A serological survey of tick-borne pathogens in dogs in north america and the caribbean as assessed by *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, and *Borrelia burgdorferi* species-specific peptides. *Infections ecology and epidemiology*,4:24699.
- René-Martellet Magalie, Lebert I., 2015. Diagnosis and incidence risk of clinical canine monocytic ehrlichiosis under field conditions in southern Europe. *Parasites and vector*, 8:3.

- Rikihisa Yasuko. The tribe ehrlichieae and ehrlichial diseases. 1991. Clinical microbiology reviews 236-308.
- Rodríguez-Vivas, R., Albornoz, R. & Bolio, G. 2005. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. *Vet Parasitol*, 127, 75-9.
- Rojas A., Rueda A., Díaz D., L. 2013. Identificación de *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard) Moshkovski mediante PCR anidada. *Vet y Zootec*. 7(1):37-48
- Romero L., E., Meneses A., I., Salazar L., Jimenez M., Romeroc J.,J., Aguiar D., M., Labruna M., B., Dolz G. 2011. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Costa Rica. *Cent Am Res Vet Sci*. 91 95-97.
- Sosa Gutierrez, C.G., Quintero M. T., Gaiolla C.S. Cota G.S. 2013. Frequency and clinical epidemiology of canine monocytic Ehrlichiosis in Dogs infested with ticks from Sinaloa, Mexico. *J Vet Med art ID 797019* .
- Starkey, L.A., Barret A.W. 2015 Persistent *Ehrlichia ewingii* infection in dogs after natural tick infestation. *J Vet Intern Med*; 29:552-55.
- Sainz A., Roura X., Miro G., Estrada-Peña A., Kohn B. 2015. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites and vectors* 8:75.
- Silva A.B., Piña C. S., Gabriel De La Torre M., Mayoral S. A., Mayoral M.A. 2014. Infección humana asintomática por contacto con perros. Un caso de ehrlichiosis humana. *Gaceta médica de México*.150:171-4.
- Skotarczack B. 2003. Canine ehrlichiosis. *Ann Agric Environ Med*. 10,137-141.
- Sykes Jane E. 2010. Ehrlichia, Anaplasmosis, Rocky Mountain Spotted feock verm and Neorickettsial Infection en *Textbook of veterinary Internal medicine* 7th Ed, vol 1, cap 206:901-909.
- Tanikawa A., Labruna M., B., Costa A., Aguiar D., M., Justiniano S.,V., Mendes R., S., Melo A., I., T., Alves C., J.2003. *Ehrlichia canis* in semiarid region of Northeastern Brazil: Serology, molecular detection and associated factors. *Res Vet Sci* 94 474-477.

- Tinoco-Gracia L, Quiroz R.M. 2009. Prevalence of ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in dogs from an urban Mexico-U.S.border region: a pilot study. *Vet Rec.* 164(2): 59-61.
- Tinoco-Gracia L., Quiroz R., M. 2007. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* in dogs from a Mexico-U.S. Border desert región: pilot estudy. *J Anim. Vet. Ad.* 6(5): 758-760.
- Unver, A., Pérez M., 2001. "Molecular and Antigenic Comparison of *Ehrlichia canis* Isolates from Dogs, Ticks, and a Human in Venezuela." *J. Clin. Microbiol.* 39(8): 2788-2793.
- Villaescusa A., Garcia Sancho. 2015. Effects of doxycycline on haematology, blood chemistry and peripheal blood lymphocyte subsets of healthy dogs and dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. *The veterinary journal* 204,3, 263-268.
- Waner, T., Strenger, C. 2000. "Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence test for the assay of *Ehrlichia canis* antibodies in dogs." *J Vet Diagn Invest* 12(3): 240-244.
- Waner, T., Harrus S. 2004. "Ehrlichiosis monocítica canina" en Recent advances in Canine Infectious diseases. *IVIS* (www.ivis.com) No. A0108.0400.ES.
- Wen, B., Rikihisa, Y., Mott, J. M., Greene, R., Kim, H. Y., Zhi, N., Couto, G. C., Unver, A. & Bartsch, R. 1997. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *J Clin Microbiol*, 35, 1852-5.
- Xu Da, Zhang J., Shi Z., Song C., Zheng X., 2015. Molecular detection of vector-borne agents in dogs from ten provinces of China. *Parasit vector* 8:501.
- Yang, J., Liu, Z., Guan, G., Liu, Q., Li, Y., Chen, Z., Ma, M., Liu, A., Ren, Q., Luo, J. & Yin, H. 2013. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants, rodents and ticks in Gansu, north-western China. *J. Med. Microbiol.*, 62, 254-258.
- Zhang Xiao-Feng, Zhang J-Z. 2003. Experimental *Ehrlichia chaffeensis* infection in beagles. *J. Med Microbiol.* 52:1021-1026,

