

**Universidad Autónoma de Sinaloa  
Colegio en Ciencias Agropecuarias  
Maestría en Ciencias Agropecuarias**



**TESIS:**

**IDENTIFICACIÓN DE *Anaplasma phagocytophilum* EN  
CANINOS DE CULIACÁN, SINALOA.**

**Que para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias Agropecuarias**

**PRESENTA:**

**MVZ. CARMEN GABRIELA CORONADO TREJO**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO**

**CO-DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO**

**ASESORES:**

**MC. NOHEMÍ CASTRO DEL CAMPO  
MC. HECTOR MANUEL LÓPEZ PÉREZ**

**CULIACÁN ROSALES, SINALOA, MÉXICO, AGOSTO DE 2014**

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **Carmen Gabriela Coronado Trejo**, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

## **MAESTRIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

### **CONSEJO PARTICULAR**

**DIRECTORA:** Dra. Idalia Enríquez Verdugo \_\_\_\_\_

**CO-DIRECTORA:** Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho \_\_\_\_\_

**ASESORA:** M.C. Nohemí Castro del Campo \_\_\_\_\_

**ASESOR:** M.C. Héctor Manuel López Pérez \_\_\_\_\_

## **DEDICATORIA**

**Dedicada a mis padres, mi esposo y mis queridos hijos.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Directora de Tesis, Dra. Idalia Enríquez Verdugo, eres una persona de grandes valores y siempre estuviste para apoyarme y darme la confianza de salir adelante en este proyecto. Por todos los consejos, orientación y paciencia en corregir mis errores, de corazón le doy las gracias.

Mi co-directora Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho, mis asesores M.C. Nohemí Castro del Campo y M.C. Héctor Manuel López Pérez, gracias por su tiempo y sabios consejos.

A mi familia por su apoyo incondicional, mis padres José Inés y Esperanza, mi esposo Cristhian Francisco y mis hijos Christian Gabriel y Diego Michel, fueron mi principal inspiración para salir adelante, los amo.

A mis maestros durante estos dos años de formación, Dr. Jesús José Portillo Loera, Dr. Rubén Barajas Cruz y Dr. Javier Alonso Romo Rubio, gracias por sus enseñanzas y dedicación.

A mis colegas y equipo del Laboratorio de Parasitología, gracias por su apoyo y atenciones.

A CONACYT por brindar su apoyo en esta investigación y formación académica.

Sin ustedes no habría sido posible la realización de este proyecto.

Gracias.

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
ÍNDICE DE CUADROS.....	Vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	Viii
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	Xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Generalidades.....	3
2.2. Signos clínicos.....	5
2.3. Lesiones .....	6
2.4. Vectores y Trasmisión. ....	6
2.5. Tratamiento y control.....	8
2.6. Epidemiología.....	8
2.7. Diagnóstico .....	11
2.7.1. Diagnóstico clínico.....	11
2.7.2. Diagnóstico de laboratorio.....	12
2.7.2.1. Frotis sanguíneo .....	12
2.7.3. Pruebas serológicas.....	12
2.7.3.1. ELISA .....	12
2.7.3.2. Inmunofluorescencia.....	13
2.7.4. Métodos moleculares .....	13
2.8. Importancia .....	13
III. HIPÓTESIS.....	16
IV. OBJETIVOS.....	17
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
5.1. Muestreo.....	18
5.2. Tamaño de muestra.....	18
5.3. Obtención de muestras.....	18
5.4. Transporte de muestra.....	19
5.5. Análisis de muestras .....	19
5.5.1. Análisis microscópico.....	19

5.5.2. Análisis serológico por ELISA.....	19
5.5.3. Extracción de ADN .....	19
5.5.4. PCR .....	20
5.5.5. PCR anidado .....	20
5.6. Purificación.....	21
5.7. Secuenciación .....	21
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
VII. CONCLUSIÓN.....	27
VIII. LITERATURA CITADA.....	28
IX. ANEXOS.....	38

**ÍNDICE DE CUADROS**

<b>CUADRO</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>PÁGINA</b>
1	Detección de microorganismos en sangre por el método ELISA.....	22
2	Frecuencia de perros positivos a <i>Ehrlichia canis</i> / <i>E. ewingii</i> y <i>Anaplasma phagocytophilum</i> / <i>A. platys</i> por el método de ELISA en Culiacán, Sinaloa.....	23
3	Frecuencia de <i>A. phagocytophilum</i> en caninos de Culiacán, Sinaloa.....	25
4	Número de perros muestreados por edad.....	38
5	Razas de perros muestreados .....	39
6	Cantidad de perros muestreados por sexo.....	39
7	Microorganismos observados por análisis microscópico en las muestras de sangre de perro.....	40

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>FIGURA</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>PÁGINA</b>
1	Gel de agarosa al 2% teñido con Gel Red™. Donde se señala carril 1 MT de 1Kb; carriles 2, 7, 8 y 9 a <i>Anaplasma spp.</i> por PCR.....	24
2	Gel de agarosa al 2%, teñido con Gel Red™. Donde se señala carril 1: MT de 1Kb; carriles 2, 7 y 8: <i>Anaplasma phagocytophilum</i> por PCR anidado .....	24
3	Neutrófilo teñido con Giemsa-Wright, donde se observan cuerpos de inclusión de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> por microscopía óptica a 100x (Melter <i>et al.</i> , 2007).....	38



## RESUMEN

### Identificación de *Anaplasma phagocytophilum* en caninos de Culiacán, Sinaloa.

Carmen Gabriela Coronado Trejo

*Anaplasma phagocytophilum* es una bacteria, causante de la enfermedad llamada “anaplasmosis granulocítica canina”, siendo el vector las garrapatas, transfiriendo la bacteria a la sangre de los vertebrados de los cuales se alimenta. Durante la última década la anaplasmosis se ha convertido, por su alta incidencia y morbilidad en una importante enfermedad zoonótica emergente. Antes llamada *Ehrlichia phagocytophilia*, *E. equi* y Anaplasmosis Granulocítica Humana; *A. phagocytophilum* es una bacteria gram-negativa, de forma cocoide o pleomórfica, afectan a los granulocitos de los mamíferos, incluyendo al humano. La primera identificación en un canino fue en 1982 en el estado de California en los Estados Unidos, tomando gran interés por la sintomatología similar a los humanos y luego reportándose en otras partes de Europa y Asia. El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo identificar a *A. phagocytophilum* por medio de PCR anidado presente en los caninos del municipio de Culiacán, Sinaloa. Se tomaron 153 muestras de sangre de perros, con o sin presencia de garrapatas, con o sin signos de la enfermedad, la sangre se extrajo a través de punción de la vena yugular, colectando 5 ml de sangre en tubos con anticoagulante. Se realizó análisis serológico por ELISA, con resultados de 13.77% de muestras positivas a *Ehrlichia canis/E. ewingii* y 1.30% a *A. phagocytophilum/A. platys*, a estas se les extrajo ADN, debido a que ambas pertenecen a la familia *Anaplasmatacea*, con un alto grado de similitud en el gen 16S rRNA (93%); mediante la técnica fenol- cloroformo. Se realizó el PCR para *Anaplasma spp*, donde 4 muestras de ADN amplificaron el gen 16S rRNA a 750pb, a estas 4 se les realizó PCRn, *A. phagocytophilum*, de las cuales 3 muestras (1.96%) amplificaron a la parte interna del gen de *A. phagocytophilum* a 500pb donde se obtuvo reacción cruzada con *Ehrlichia spp*. Los resultados del presente estudio confirman la presencia de *A. phagocytophilum* en caninos de Culiacán, Sinaloa, lo cual representa un riesgo para la salud animal y pública por la posible transmisión de esta bacteria a los propietarios de mascotas como a los médicos veterinarios por contacto directo o indirecto. Para el control de esta enfermedad se necesita realizar más estudios a nivel molecular y lograr un mejor conocimiento de la bacteria para lograr prevenir mediante vacunas contra esta enfermedad zoonótica.

*Palabras clave: Anaplasma phagocytophilum, caninos, PCRn.*

## ABSTRACT

### Identification of *Anaplasma phagocytophilum* in canines of Culiacán, Sinaloa.

Carmen Gabriela Coronado Trejo

*Anaplasma phagocytophilum* is a bacterium that causes the disease named “canine granulocytic anaplasmosis”, being as the vector the ticks, transferring the bacterium to the blood of the vertebrates in which they feed. During the last decades anaplasmosis has become, for the high incidence and morbidity in an important zoonotic emerging disease. *A. phagocytophilum* before named *Ehrlichia phagocytophilia*, *E. equi* and Human granulocytic anaplasmosis, is a gram negative bacterium, coccoid or pleomorphic, affect granulocytic leukocytes of a wide range of hosts including humans, wild and domestic animals. The first identification was in a canine from California, USA, taking great interest the human like symptomatology, and then being reported in another countries of the world. This research work had as objective to identify *A. phagocytophilum* through nested PCR in canines from the town of Culiacán, Sinaloa. 153 whole blood samples were collected from canines, with or without ticks, with or without illness from the jugular vein, collecting 5 ml of whole blood in tubes with anticoagulant. Serological test ELISA was performed, obtaining 13.77% positive samples to *Ehrlichia canis/E. ewingii* and 1.30% with cross reaction to *A. phagocytophilum/A. platys*, taken all this as positives (by sharing 92% homology). ADN is extracted by phenol chloroform technique. PCR was performed to *Anaplasma spp.*, 4 samples amplified to 750 bp of a part the gen ARNr 16S, then was performed the PCR nested, of which 3 samples (1.96%) amplified to 500bp the gen *A. phagocytophilum*, obtaining cross reaction with *Ehrlichia spp.* The results of this study confirm the presence of *A. phagocytophilum* in canines of Culiacán, Sinaloa, representing a risk to the animal and human health for the possible transmission of the disease to the owners and veterinarians. To the control of the bacterium more research is needed to be done in a molecular level and achieve a better understanding of the bacterium and create preventives vaccines for this zoonotic disease.

*Keywords: Anaplasma phagocytophilum, canines, PCRn.*

## I. INTRODUCCIÓN

*Anaplasma phagocytophilum* es la bacteria causante de la enfermedad llamada “anaplasmosis granulocítica canina” (Barth *et al.*, 2014; Rymaszewska y Grenda, 2008; Dumler, 2012). Durante la última década *A. phagocytophilum*, se ha convertido, por su alta incidencia y morbilidad, en una de las más importantes enfermedades zoonóticas emergentes (Berzina y Matise, 2013; Pérez-Sánchez *et al.*, 2006). La Anaplasmosis es el nombre con el que se denomina a la enfermedad causada por varias especies de *Anaplasma*, siendo las más comunes *A. marginale*, *A. ovis* y *A. phagocytophilum*. La patogenicidad está relacionada a animales domésticos y humanos (Rymaszewska y Grenda, 2008; de la Fuente *et al.*, 2006). Pero solo la especie *A. phagocytophilum* infecta a seres humanos. Esta bacteria pertenece a la familia de los microorganismos obligados intracelulares, gram negativos, pleomórficos. Los vectores más comunes que transmiten la bacteria son las garrapatas de los géneros *Ixodes spp*, *Dermacentor spp*, *Rhipicephalus spp* y *Amblyomma spp*. El órgano blanco de *A. phagocytophilum* son los neutrófilos de los mamíferos (Dumler *et al*, 2005; Rihikisa, 2010, 2011). En perros la enfermedad es caracterizada típicamente por un cuadro de fiebre aguda, depresión, mialgia, anorexia, letargo y reduce las plaquetas; en personas infectadas el cuadro clínico es muy similar (Melter *et al.*, 2007; Ravnik *et al.*, 2011; Eberts *et al.*, 2011; Dumler *et al.*, 2011). Las enfermedades ocasionadas por transmisión de las garrapatas a los perros han sido de gran importancia en los Estados Unidos, reportan que el uso de acaricidas e insecticidas como inefectivos para terminar con el ciclo enzoótico y manifestando necesidad de más datos para conocer el desarrollo de la bacteria y prevalencias alrededor del mundo (Bowman *et al.*, 2009). Los hombres a lo largo de la historia han estado en contacto directo o indirecto con animales de compañía, fruto de este contacto es que se producido enfermedades en humanos conocidas como zoonosis. El contacto con sangre de animales infectados, el empleo de hemoderivados y la transmisión perinatal son vías de adquisición de la enfermedad (Nicholson *et al.*, 2010; Rihikisa, 2011).

De acuerdo con estudios serológicos realizados en áreas endémicas, los perros naturalmente infectados con *A. phagocytophilum* generalmente permanecen y se vuelven en portadores asintomáticos; debido a esta relación estrecha entre perros y humanos al igual que con las garrapatas y junto con el difícil diagnóstico y el potencial zoonótico de *A. phagocytophilum* debe considerarse a los perros como reservorios importantes (Santos *et al.*, 2011). En los Estados Unidos se registran más de 2900 casos anuales en caninos, con prevalencias de un 17 a 50% (Carrade *et al.*, 2009), en Europa se reportan prevalencias de 0.8% a 56.5% en caninos, evaluados por diferentes métodos (Khon *et al.*, 2011) y en humanos 45% (Rihikisa *et al.*, 2006), ocupando en los Estados Unidos el segundo lugar *A. phagocytophilum* como causante de la enfermedad febril de transmisión por garrapatas en humanos; en México el primer reporte publicado en caninos fue en la Ciudad de Monterrey, con 3% de prevalencia mediante estudios serológicos (Salinas-Melendrez *et al.*, 2014). En Culiacán, Sinaloa, existen factores de riesgo que provocan la heterogeneidad de las especies de Anaplasma, como las condiciones climáticas, la presencia del vector *Rhipicephalus sanguineus* en un 46% que la trasmite y los hospederos (caninos y humanos) a los cuales se adaptan. Por lo que el objetivo de este trabajo fue identificar *Anaplasma phagocytophilum* por medio de PCR anidado presente en los caninos del municipio de Culiacán, Sinaloa.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Generalidades.

*Anaplasma spp.* incluye al nuevo patógeno que infecta a los humanos, cuyo nombre original de la enfermedad fue Ehrlichiosis granulocítica humana, y en los rumiantes anteriormente conocida como *Ehrlichia phagocytophila* y en los equinos *Ehrlichia equi*, ahora todas son llamadas *A. phagocytophilum* (Rikihisa, 2011; Woldehiwet, 2010; Stuen *et al.*, 2002, 2013). Se le designó ese nombre formalmente debido a la nueva clasificación realizada por Dumler *et al.* (2001), basándose en estudios de genética molecular, descubriendo el alto grado de similitud en el gen 16S rRNA (99.8%) (Inokuma *et al.*, 2002; Poitout, *et al.*, 2005; Dyachenko, *et al.*, 2013; Ybañez, *et al.*, 2013). Es considerado un patógeno emergente, debido a que el número de infecciones se ha incrementado en las poblaciones de zonas endémicas, causando en los humanos “Anaplasmosis granulocíticas humana” (Woldehiwet, 2006; Chan *et al.*, 2013; Dahlgren *et al.*, 2011). Esta enfermedad ha sido reconocida en diversos mamíferos, incluyendo humanos, gatos, perros, caballos, rumiantes y especies silvestres (Corona y Martínez, 2009; Brown, 2012). Anaplasmosis es el nombre más común que se le denomina a la enfermedad causada por varias especies de *Anaplasma*, siendo las especies más comunes *A. marginale*, *A. ovis* y *A. phagocytophilum*. La patogenicidad está vinculada a animales domésticos y a humanos (Rymaszewska y Grenda, 2008; de la Fuente, *et al.*, 2006). Solo la especie *A. phagocytophilum* es causante de zoonosis; la severidad de la enfermedad varía de asintomática a severa (Rikihisa *et al.*, 2009).

La bacteria *A. phagocytophilum* es una bacteria Gram-negativa, intragranulocítica, de la clase *Alphaproteobacteria* (Rikihisa *et al.*, 2010; Huhn *et al.*, 2014). Morfológicamente son cocos o elipsoidales, están envueltas en dos membranas (Woldehiwet, 2010), la membrana externa es ondulada, con la cual crea un espacio periplásmico irregular, el tamaño de la bacteria generalmente es de 0.4 a 1.3  $\mu\text{m}$ , pero puede llegar hasta 2  $\mu\text{m}$ ; el tamaño del genoma es de 1.47 Mb y se divide por fisión binaria (Rihikisa, 2011; Severo *et al.*, 2012), no se tiñen con la tinción de Gram, aunque se pueden poner de manifiesto en las células que infectan mediante las tinciones de Wright y Giemsa, apareciendo como una especie de agregados

citoplasmáticos (mórulas) (Oteo y Brouqui, 2006). Esta bacteria es intracelular obligada, puede sobrevivir en ambientes hostiles dentro de los neutrófilos, siendo estos su órgano blanco, inhiben las funciones de su hospedero y regulan su actividad antimicrobiana (Garyu *et al.*, 2005), donde se reproduce formando mórulas, dentro de ellos, colonizando así a las células blancas más abundantes del organismo; la infección a esta células se ha demostrado que ocurre a través de la unión del ligando PSGL-1 (por sus siglas en inglés: P-selectin glycoprotein ligand-1), permitiendo su internalización (Granick *et al.*, 2008). Los neutrófilos generalmente tienen una vida muy corta, ya que entran a la sangre periférica (promedio de vida de 6 a 10 horas) (Woldehiwet, 2006), y estos son la línea primaria de defensa inmune de los mamíferos, lo cual sorprende que *A. phagocytophilum* la encuentre adecuada para habitarla (Severo *et al.*, 2012) y con respuesta antimicrobiana innata; *A. phagocytophilum* inhibe la apoptosis de los neutrófilos para maximizar su reproducción bacteriana, utilizando el sistema de secreción tipo IV, conocido como T4SS (por sus siglas en inglés: Type 4 Secretion System) (Rikihisa *et al.*, 2010; Foley y Nieto, 2006), siendo uno de los seis tipos de sistemas de secreción descritos, en el cual los microorganismos transportan macromoléculas, tales como proteínas y ADN a través de la envoltura celular (Al-Khedery *et al.*, 2012; Wallden *et al.*, 2010). El T4SS, son complejos de macromoléculas, usados tanto por bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas (Gillespie *et al.*, 2010), este sistema consiste de 12 componentes denominados VirB1-VirB11 y VirD4, que transfieren el complejo proteína – ADN en un solo paso desde el citoplasma hasta la célula eucariota (González-Pedrajo, 2003; Fronzes *et al.*, 2009); a diferencia de otros miembros de la familia *Rickettsiaceae*, los cuales escapan de los fagosomas y se reproducen directamente en el citoplasma de las células eucariotas, los miembros de la familia *Anaplasmatacea* se duplican en la membrana de las vacuolas con el citoplasma de su hospedero de la célula eucariota (Rikihisa, 2011), una vez que el hospedero adquiere la infección con *A. phagocytophilum*, adquiere resistencia a la enfermedad y desarrollan inmunidad específica utilizando la bacteria su proteína de superficie mayor MSP2 (Foley *et al.*, 2009). *Anaplasma spp.*, no crecen en los medios de cultivo habituales y precisan para su crecimiento de líneas celulares (células

promielocíticas HL-60 y precursores mielomonocíticos) (Oteo y Brouqui, 2006). La enfermedad clínica usualmente ocurre dentro de 1 a 2 semanas, después de haber sido transmitida la bacteria *A. phagocytophilum* por la mordedura de la garrapata, aunque basada en información obtenida por zonas endémicas, la mayoría de los perros expuestos no muestran signos clínicos durante largos períodos (Stuen, 2007; Annen *et al.*, 2012). Como métodos diagnósticos se pueden utilizar la microscopia óptica y análisis serológicos ELISA (por sus siglas en inglés: enzyme linked immunosorbent assay) e IFA (por sus siglas en inglés: indirect fluorescent antibody) que se encuentran comercialmente disponibles (Ebani *et al.*, 2013). Aproximadamente, un 40% de los perros clínicamente enfermos no producen niveles detectables de *A. phagocytophilum* en pruebas serológicas, otro de los motivos es las reacciones cruzadas con otras especies de Anaplasmas (Ebani *et al.*, 2013), en contraste al utilizar PCR (por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction), se pueden detectar secuencias de ADN del organismo específico en la sangre en las etapas iniciales de la enfermedad (Eberts *et al.*, 2011), dando mayor confiabilidad debido que se pueden usar oligonucleótidos específicos para el patógeno que se sospecha, con una rápida y precisa detección. El gen 16S rRNA es el más común utilizado para detección de microorganismos, conserva el mejor linaje de la familia Procarionota (Rymaszeswska, 2005), estableciendo así relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procarionotas (Rodicio y Mendoza, 2004), además de los análisis de secuencias específicos para grupos, especies o incluso serotipos bacterianos (Janda y Abbott, 2007).

## **2.2. Signos clínicos.**

De acuerdo con los estudios serológicos realizados en zonas endémicas, perros naturalmente infectados con *A. phagocytophilum* generalmente permanecen sanos y se vuelven portadores asintomáticos (Miro *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2011). Las manifestaciones clínicas más comunes de Anaplasmosis granulocítica canina son inapetencia, fiebre, mucosas pálidas, sangrado espontáneo, taquipnea, abdomen tenso, diarrea, vómito, linfonodos agrandados, (Silaghi *et al.*, 2011; Jensen *et al.*, 2007; Ebani *et al.*, 2013), letargia, anorexia, depresión y fiebre (Al Izzi *et al.*, 2013).

La exploración física no muestra datos destacables; ocasionalmente conjuntivitis y adenopatías (Oteo y Brouqui, 2006; Salinas-Meléndrez *et al.*, 2014). En el caso de animales de granja, la enfermedad puede aparecer como subclínica o con mucha signología; y son similares a los de los perros, muestran pérdida de peso corporal y reducción de la producción láctea; los animales sin atención médica les puede provocar la muerte (Rymaszewska y Grenda, 2008; Woldehiwet, 2010; Carrade *et al.*, 2009).

Los humanos, los equinos y los perros desarrollan signos clínicos similares (Scorpio *et al.*, 2011; Mayne, 2011; Severo *et al.*, 2012). Debido a la estrecha relación que existe entre los perros y los humanos, así como las garrapatas, junto con la dificultad de diagnosticarla y el potencial zoonótico de *A. phagocytophilum* se debe considerar a los perros como un reservorio importante (Carrade *et al.*, 2009; Melter *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2011).

### **2.3. Lesiones.**

Los cambios patológicos en caninos incluyen infiltrados inflamatorios en múltiples órganos, perivascular linfocitocíticos, hepatitis con infrecuente apoptosis, médula ósea normocelular, suave depleción linfoide, hiperplasia fagocítica mononuclear en bazo y linfonodos y raramente necrosis esplénica. Se ha observado hematofagocitosis en médula ósea, hígado y bazo. Raramente se ha identificado por pruebas inmunohistoquímicas. Los neutrófilos infectados no están asociados con lesiones patológicas (Dumler *et al.*, 2005; St. Clair, 2012; Barth *et al.*, 2014).

### **2.4. Vectores y transmisión.**

La relación entre los humanos y los perros ha sido establecida desde hace miles de años, eventualmente algunos ectoparásitos de los animales domésticos llegan a parasitar al humano (Dantas-Torres *et al.*, 2006). Las garrapatas parasitan a humanos y animales alrededor de todo el mundo, siendo vectores de enfermedades zoonóticas originadas por diversos microorganismos como virus, bacterias y parásitos. Se han descrito más de 800 especies de garrapatas: *Ixodes spp.*, *Rhipicephalus spp.*, *Dermacentor spp.*, *Hyalomma spp.* y *Haemaphysalis spp.* por



mencionar algunas (Rymaszewska y Grenda, 2008; Woldehiwet, 2010; Stuen *et al.*, 2013; Zivkovic *et al.*, 2009).

La garrapata es un vector biológico esencial, en el cual *A. phagocytophilum* se reproduce y persiste a través de su desarrollo al alimentarse de sus hospederos (Rihikisa, 2011; Tveten *et al.*, 2013)

La garrapata responsable de la transmisión de *A. phagocytophilum* en Europa es *Ixodes ricinus* (Stuen *et al.*, 2013; Bown *et al.*, 2009; Ebani *et al.*, 2013), mientras que en EEUU las garrapatas de patas negras del oeste *Ixodes pacificus* e *Ixodes scapularis* parecen ser los vectores primarios (Ebani *et al.*, 2013). *I. ricinus* en su etapa de ninfa y adulto, es responsable de la transmisión de *A. phagocytophilum* (Smrdel *et al.*, 2010). La persistencia en el artrópodo durante todo el año es de mucha importancia para una bacteria, como *A. phagocytophilum*, que no puede ser transmitida por vía transovárica de una garrapata hembra adulta a su descendencia (Neelakanta *et al.*, 2010).

Las larvas de *I. scapularis* adquieren *A. phagocytophilum* dos días después de la succión de sangre de ratones infectados, una vez en la garrapata la bacteria migra a través del intestino hacia las glándulas salivales. Las larvas evolucionan a ninfas, después a su forma adulta, mientras que las bacterias persisten en los acinos secretores de las glándulas salivales. Al alimentarse la garrapata, la bacteria se replica y migra de las glándulas salivales hacia el hospedador mamífero (para invadir los granulocitos), y la transmisión de *A. phagocytophilum* ocurre entre 24 y 48 horas después de la mordedura de la garrapata (Oteo y Brouqui, 2006; Severo *et al.*, 2012; Rihikisa, 2011; Allison y Little, 2013). Estudios recientes muestran que *A. phagocytophilum* requiere de la proteína P11 que se encuentra en las garrapatas para migrar del hemocito a las glándulas salivares de la garrapata y ya estando ahí se alimenta de la proteína SALP16 (salivary protein 16) para sobrevivir (Severo *et al.*, 2012). Estudios de zoonosis en los Estados Unidos, han detectado que la garrapata *Ixodes scapularis* es vector de la bacteria y la transmite a humanos (Clark, 2012). En América del Sur, *Rhipicephalus sanguineus*, se le denomina garrapata café del perro, y ha sido detectada en humanos sintomáticos (Abarca *et al.*, 2008; Dantas-Torres, 2008, 2010). Estudios realizados por Gaxiola *et al.* (1997), encontraron un 46% de

prevalencia de *R. sanguineus* en los caninos de la ciudad de Culiacán, Sinaloa, México, respaldando así los estudios realizados por Tinoco-Gracia *et al.* 2007) considerando a esta como la responsable de parasitar y transmitir diversas enfermedades a los perros, encontrado que *R. sanguineus* es exclusiva de perros y humanos. Es importante destacar que la transmisión no solo puede ocurrir por la mordedura de la garrapata sino también al tener contacto con sangre contaminada y por transfusiones sanguíneas (Zhang *et al.*, 2008, 2013; Chan *et al.*, 2013).

## **2.5. Tratamiento y control.**

Estudios demuestran la eficacia de la Doxiciclina como antibiótico de amplio espectro para el tratamiento de *A. phagocytophilum*, usando dosis de 5 a 10 mg/kg, durante 7 a 10 días (Gaunt *et al.*, 2010). En perros el tratamiento de elección es el mismo que en humanos, Doxiciclina, usando unas dosis recomendada de 10 mg/kg cada 12 horas por un período promedio de 15 días (Jensen *et al.*, 2007; Manna *et al.*, 2004). Como prevención y control de *A. phagocytophilum*, se debe educar a las personas acerca de las garrapatas, prevención de la exposición a la mordida de estas y un control eficaz, manteniendo a los perros libres de garrapatas, ya sean removidas con pinzas comercialmente disponibles, también utilizando insecticidas tales como permetrinas y fipronil que tienen acción por 25 días después de la aplicación (Carrade *et al.*, 2009), con nombres comerciales como Frontline® y Advantix® dando niveles de protección ya probados en lugares como Italia y África (Davoust *et al.*, 2013). Al igual un cuidado correcto de las mascotas basándose en visitas regulares a clínicas veterinarias ayuda al control y diagnóstico oportuno de enfermedades *Rickettsiales* (Nicholson *et al.*, 2010).

## **2.6. Epidemiología.**

*A. phagocytophilum* es capaz de persistir entre las diferentes estaciones de actividad de las garrapatas al pasar por las diferentes especies de mamíferos (Stuen *et al.*, 2014). La enfermedad anteriormente llamada Ehrlichiosis granulocítica animal se conocía desde los años treinta identificada por Gordon *et al.* (1932) en Escocia, esta enfermedad y su agente etiológico no despertaron interés hasta 1994, momento en

que se detectaron los primeros casos de infección en humanos (Chen *et al.*, 1994, Oteo y Brouqui, 2006, Ketargina *et al.*, 2011; Bakken y Dumler, 2006). Desde entonces se han publicado trabajos que aportan datos epidemiológicos puntuales (Monsalve *et al.*, 2009). La enfermedad en algunos pacientes resultó letal, y al agente infeccioso lo denominaron como agente de la “EGH” (ehrlichiosis granulocítica humana). Chen *et al.* (1994) secuenciaron el gen 16S rRNA de dicho agente y comprobaron que poseía una identidad del 99.9% y 99.8%, respectivamente, con el gen homólogo de la antes llamada *E. phagocytophila* y de la antes llamada *E. equi*, señalando la posibilidad de que las tres fueran la misma (Pérez-Sánchez *et al.*, 2006).

También se descubrió que el patrón epidemiológico de la anaplasmosis granulocítica, es parecido al de la enfermedad de Lyme, porque comparten vectores, reservorios animales y ciclos de transmisión, pero el perfil de Anaplasmosis es menos complejo, estando implicado solo un agente infeccioso (Monsalve *et al.*, 2009; Pérez-Sánchez *et al.*, 2006; Oteo y Brouqui, 2006).

Los perros, como la gente son huéspedes incidentales y se infectan a través de la mordida de la garrapata del género *Ixodes* (Nicholson *et al.*, 2010) y *R. sanguineus* (Abarca *et al.*, 2008; Dantas-Torres, 2008, 2010). *Anaplasma spp.* se transmite a través de la mordida de la garrapata en estadio de ninfa infectada o en estadio de garrapata adulta que fue previamente infectada durante su fase larval o ninfa mientras se alimentaba de un animal infectado de esta rickettsia, usualmente animales salvajes, son los principales reservorios (Nicholson *et al.*, 2010). En el año de 1982 se reportó la primera identificación en un perro con Anaplasmosis fue en el estado de California en los Estados Unidos (Carrade *et al.*, 2009; López *et al.*, 2007; Abarca *et al.*, 2008; Rejmanek *et al.*, 2012; Ebani *et al.*, 2013).

Casos de Anaplasmosis granulocítica canina, han sido reportados en Norte América, abarca estados de California, Washington, Illinois, Minnesota, Wisconsin, Missouri y Colombia Británica. En Europa, casos de perros infectados se ha reportado en Austria, Italia, Suiza, Suecia, Alemania, Polonia y Reino Unido. En el caso de los

reservorios esos varían según la región geográfica pueden ser los reservorios de *A. phagocytophilum*, tales como ratas, chinchillas y aves (Carrade *et al.*, 2009).

En Europa los perros muestran prevalencias de 1-6% y hasta un 55% según la región, diagnosticados mediante pruebas moleculares específicas, y el ADN da positivo a *A. phagocytophilum*; quedando en discusión si los perros actúan como hospederos reservorios (Stuen *et al.*, 2013). En España las prevalencias en perros van de 5% a 19%, siendo el vector la garrapata *Ixodes spp* y *R. sanguineus* (Miro *et al.*, 2013).

Los humanos son susceptibles a muchas enfermedades rickettsiales, siendo *A. phagocytophilum* la causante de la Anaplasmosis humana. Un estudio realizado en Slovenia, por Vichová *et al* (2014), mostró que aproximadamente el 15.4% de los humanos presentaban anticuerpos contra *A. phagocytophilum*, aunque no hubo diferencia en la prevalencia de anticuerpos de las personas con exposición a los perros expuestos. En los Estados Unidos las infecciones son de reporte obligatorio, en el año 2005 se reportaron 700 casos de Anaplasmosis humana, con un incremento de 2963 casos desde 1994. La ocurrencia de las infecciones por *A. phagocytophilum* ocurre a nivel internacional, incluyendo los Estados Unidos, Europa y Asia. Estas regiones corresponden a áreas donde se encuentra la garrapata del género *Ixodes* (*I. scapularis* en Oeste de los Estados Unidos, *I. pacificus* en el Este de los Estados Unidos, *I. ricinus* en Europa e *I. persulcatus* en Asia, mordiendo estas a humanos. Mamíferos pequeños, tales como ratas de patas blancas (*Peromyscus leucopus*); *Neotoma fuscipes*, *Apodemus*, *Microtus* o *Clethrionomys species*, actúan como reservorios (Ogden *et al.*, 1998; Dumler *et al.*, 2007). En China, Zhang *et al*, (2008), describieron un brote de *A. phagocytophilum* en humanos, en ausencia de la garrapatas como vector, se descubrió que este suceso ocurrió por contacto directo con secreciones respiratorias y sangre de 250 venados que sacrificaron los trabajadores

Otros factores de riesgo en los perros incluye la estación del año y presentarse en conjunto con otros patógenos transmitidos por las garrapatas, tales como *E. canis*, *B. burgdoferi* por mencionar algunos (Li *et al.*, 2011). En los Estados Unidos, se ha diagnosticado más frecuentemente la enfermedad en los perros por *A. phagocytophilum* en los meses de Abril a Julio. En Berlín, 17 de 18 casos reportados ocurrieron durante los meses de Abril a Septiembre. La distribución estacional reflejan período de alza de ninfas y garrapatas adultas, al igual que los humanos incrementan sus actividades al aire libre. La media de edad de los perros es de 6 a 8 años, mostrando más susceptibilidad las razas de perros Golden retrievers, quizás por ser la raza común para realizar actividades al aire libre (Carrade *et al.*, 2009). En América del Sur se ha descrito la presencia de Anaplasmosis en humanos mediante estudios serológicos realizados en Argentina, Brasil y Venezuela, aislada de los perros y en *R. sanguineus*; en Chile se describió en el año de 1974, y actualmente su presencia es masiva en las estaciones de primavera y verano en caninos (Abarca *et al.*, 2008).

Dumler, describió en el año 2013, en los Estados Unidos, *A. phagocytophilum* por diagnóstico en sangre, mediante frotis sanguíneos teñidos con Giemsa y Wright, encontrando mediante microscopia óptica a 100x cuerpos de inclusión llamados mórulas en los neutrófilos, en un 75% de los pacientes, y confirmó su presencia a través de PCR.

## **2.7. Diagnóstico.**

### **2.7.1. Diagnóstico clínico.**

En los perros el diagnóstico de enfermedades bacterianas por transmisión de garrapatas, incluye un amplio espectro de enfermedades, que pueden presentarse de forma subclínica, infección inaparente a severa, y potencialmente fatal (Allison y Little, 2013). El diagnóstico presuntivo se basa en examen físico del animal, la historia de contacto con las garrapatas y observación de hemoparásitos en extendido de sangre periférica (Rojas-Triviño *et al.*, 2013). Las manifestaciones clínicas aparecen de 1 a 2 semanas después de la mordida de la garrapata (Eberts *et al.*,

2011). Las anomalías observadas con mayor frecuencia en el laboratorio son trombocitopenia, linfopenia, anemia, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia y elevada actividad enzimática hepática (Ebani *et al.*, 2013; Khon *et al.*, 2011).

## **2.7.2. Diagnóstico de laboratorio.**

### **2.7.2.1. Frotis sanguíneo.**

La familia *Anaplasmatacea* infecta células hematopoyéticas, lo cual facilita su observación microscópica en muestras de sangre, médula ósea, aspirados de tejidos y líquido sinovial (Allison y Little, 2013). El examen microscópico mediante frotis sanguíneo, se realiza con las tinciones Giemsa– Wright. Se observa a través de microscopía óptica en campo de 100x (Rikihisa, 1991), observando en neutrófilos microcolonias llamadas “mórulas” (Allison y Little, 2013). La mayor sensibilidad es durante la primera semana de infección (Dumlet *et al.*, 2007), con porcentajes de neutrófilos infectados de 0.5 a 30%, en cambio durante la fase crónica se dificulta su detección (Allison y Little, 2013), mostrando poca sensibilidad (Schotthoefer *et al.*, 2013). En conclusión es un método accesible, de bajo costo, con el inconveniente de confundirse con otros miembros de la familia *Anaplasmatacea* que también infectan células sanguíneas (Rufino *et al.*, 2013; Allison y Little, 2013).

## **2.7.3. Pruebas serológicas.**

### **2.7.3.1. ELISA.**

Las enfermedades transmitidas por las garrapatas se encuentran a nivel mundial, con acceso a pruebas serológicas comerciales para facilitar su detección oportuna. El examen está basado en la detección de un péptido sintético P44/MSP2 actúa como un antígeno específico para unirse al anticuerpo del suero del perro infectado. Identifica *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *E. canis*, *E. ewingii* y *B. burdogferi*, con la desventaja de reaccionar a dos bacterias sin distinguir entre ellas, lo cual se conoce como reacciones cruzadas, por consecuencia de utilizar los mismos anticuerpos. El test es rápido y de fácil uso, resultando útil para el diagnóstico clínico, con sensibilidad y especificidad de 95% respectivamente (Barth *et al.*, 2014).

### **2.7.3.2. Inmunofluorescencia.**

Es una técnica rápida y confiable para la determinación de anticuerpos en el suero de los pacientes, usado en investigaciones; se basa en la unión del anticuerpo presente en el suero del individuo a evaluar, con los antígenos expresados en la superficie y el citoplasma de las células infectadas, que han sido fijadas a un portaobjetos. Primero se incuba el suero del paciente con las células infectadas y no infectadas; luego se realiza un lavado con solución amortiguadora y se agregan anticuerpos contra la Inmunoglobulina G conjugada con isotiocianato de fluoresceína, este último es una sustancia que se pone fluorescente a la exposición de la luz ultravioleta y emite una luz de color verde característica; el conjugado se unirá a los anticuerpos del paciente si la reacción es positiva, leyéndose la prueba en un microscopio de fluorescencia, mientras que las células de control no fluorescen viéndose un color rojo (Murray *et al.*, 2003). Las desventajas son las reacciones cruzadas con otras bacterias tales como *A. platys* y *E. canis* (Barth *et al.*, 2014) con sensibilidad de 27% a 37% para *A. phagocytophilum* (Dumler *et al.*, 2007; Eberts *et al.*, 2011).

### **2.7.4. Métodos moleculares.**

El diagnóstico por métodos moleculares se basan en la detección y caracterización de secuencias de ácidos nucleicos por PCR y confirmar la presencia de la bacteria causante de la enfermedad (Allison y Little, 2013). Ensayos basados en el uso del PCR en el gen 16S rRNA han sido muy valiosos para la detección de bacterias patógenas que son difíciles de aislar y cultivar en el laboratorio, este gen ha contribuido en gran medida a la diferenciación de las especies en el género *Anaplasma* (Dumler *et al.*, 2001; Clarridge, 2004). Otros estudios de amplificación de ADN de *A. phagocytophilum* utilizan genes tales como *msp4*, *groEL* o *ankA*, esto debido a la posible detección de otras especies de *Anaplasma* (Carrade *et al.*, 2009). En conclusión el uso de PCR para diagnósticos ofrece ventajas sobre estudios serológicos y frotis sanguíneos, con sensibilidad de 100% (Schotthoefer *et al.*, 2013).

## **2.8. Importancia.**

*A. phagocytophilum* es una enfermedad emergente de tipo zoonótico que se ha estudiado durante los últimos años. Los perros son afectados por las garrapatas, cumpliendo las mascotas un rol actual en la sociedad, donde casi todas las familia poseen un perro o un gato, quedando en mayor riesgo propietarios de mascotas y personas dedicadas al área de la salud, por las posibles implicaciones zoonóticas de la presencia de ectoparásitos y su riesgo de transmisión de zoonosis (Zhang *et al.*, 2008; Salinas-Meléndrez *et al.*, 2014). En los recientes años, ha crecido el interés en estudiar a las bacterias del género *Anaplasma*, especialmente *A. marginale*, *A. ovis* y *A. phagocytophilum*, las diferentes especies de *Anaplasma* juegan un papel importante en los criadores, aumentando los costos de los servicios veterinarios; cuando se trata de ganado ocasiona abortos, baja producción de leche y carne y puede llegar hasta la muerte; en el caso de perros los costos para los propietarios se aumentan y los gastos de diagnóstico, hospitalización y tratamiento hacen muchas veces que los perros no reciban la atención adecuada, recordando que los gastos en el uso de preventivos para la enfermedad tales como collares garrapaticidas, insecticidas para fumigación de hogares y baños incrementa aún más los costos anuales, siendo estos necesarios a los largo del año. Cuando se trata de personas solo *A. phagocytophilum* causa patogenicidad, causando Anaplasmosis granulocítica humana, muchas veces los síntomas son leves pero en individuos con bajas defensas, adultos mayores, personas con trasplantes puede ser fatal (Rymaszewska y Grenda, 2008; Bakken y Dumler, 2006). No existe la cultura de aplicar métodos de detección para el diagnóstico de esta enfermedad, aún cuando la enfermedad se presenta a nivel mundial, con porcentajes de 5 a 37%, y son los perros una fuente de infección para los humanos (Melter *et al.*, 2007), en los Estados Unidos tiene el segundo lugar de enfermedad de transmisión de por las garrapatas (Huang *et al.*, 2010).

En el estudio realizado en el país de Chile por Abarca *et al.*, en el año 2008, evidenciaron la presencia de *A. phagocytophilum* en humanos, transmitida por la garrapata del perro *R. sanguineus*, que actúa como transmisor de zoonosis de perros a humanos, destacando en este estudio la infestación domiciliaria por garrapatas en



un 90% de los hogares visitados, indicando que debe ser considerado no solo como problema de medicina veterinaria sino también de salud pública.

El impacto de los patógenos transmitidos por las garrapatas tanto en humanos como perros continúa en crecimiento, se anticipa que así seguirá y que es necesario implementar monitoreo en las poblaciones de caninos y humanos para obtener cepas viables e identificar si los organismos son patógenos. Los cambios biogeográficos provocados por las prácticas en agricultura, cambios climáticos, han llevado a diseminarse en diferentes regiones geográficas tanto las garrapatas como la fauna silvestre, por lo cual es necesario implementar técnicas moleculares e implementar métodos de vigilancia en caninos y evitar infestaciones de garrapatas (Nicholson, *et al.*, 2010). En los humanos se debe tomar en cuenta la sintomatología para hacer la historia clínica completa e indagar si existen mascotas en su entorno y si estas han tenido presencia de garrapatas, para realizar un diagnóstico temprano, con las pruebas pertinentes y así aplicar la antibioterapia oportuna (Hernandez- Ayazo y Said, 2013).

### III. HIPÓTESIS

En Culiacán, Sinaloa, existen factores de riesgo que provocan la diversidad de las especies de Anaplasma, como las condiciones climáticas, la presencia del vector *Rhipicephalus sanguineus* que la trasmite y los hospederos (caninos y humanos) a los cuales se adaptan. Por lo que *Anaplasma phagocytophilum* se encuentra presente en los caninos de la región.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general.

Identificar *Anaplasma phagocytophilum* por medio de PCR anidado presente en los caninos del municipio de Culiacán, Sinaloa.

### 4.2. Objetivos específicos.

Detectar *Anaplasma phagocytophilum* mediante la técnica de ELISA.

Identificación de *Anaplasma spp.* mediante la técnica de PCR.

Identificación de *Anaplasma phagocytophilum* mediante la técnica de PCR anidado.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en caninos de Culiacán, Sinaloa y las muestras de sangre se procesaron en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa, ubicado en la ciudad de Culiacán, Sinaloa, México; geográficamente ubicada en las coordenadas 24°48' latitud Norte y 107°23' longitud Oeste, con una altura de 60 msnm, temperatura media anual de 24.8°C, con 33.3 y 16.3°C como temperaturas máximas y mínimas promedio, y 44.5 y 1.5°C de temperatura máxima y mínimas extremas; con 144, 159 y 92 días despejados, medio nublados y nublados al año, respectivamente; precipitación pluvial promedio anual de 675mm, con lluvias en verano (julio a septiembre), el clima de la región es tropical seco (BWh y BSh) de acuerdo a la clasificación de Koeppen (INEGI, 2009).

### 5.1. Muestreo.

Se tomaron muestras sanguíneas, de caninos de la ciudad de Culiacán, Sinaloa, con o sin presencia de garrapatas, con o sin signos de enfermedad.

### 5.2. Tamaño de la muestra.

El tamaño de la muestra se determinó mediante “selección intencionada o muestreo por conveniencia” siendo esta una técnica de muestro no probabilístico, quedando en tamaño de la muestra en manos del investigador (Thrusfield, 1990).

### 5.3. Obtención de muestras.

Se tomaron 150 muestras de sangre de caninos de Culiacán, Sinaloa, las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena yugular, se colectaron 5 ml de sangre en tubos de plástico con succión por vacío con anticoagulante (EDTA), cada tubo se rotuló con el nombre y/o número de cada animal muestreado.

#### **5.4. Transporte de muestras.**

Las muestras se colocaron en un contenedor a 4°C y fueron transportadas al Laboratorio de Parasitología de la FMVZ/UAS. Las muestras se refrigeraron a 4°C, hasta su uso.

#### **5.5. Análisis de muestras.**

##### **5.5.1. Análisis microscópico.**

A las muestras recolectadas se les realizó un frotis sanguíneo, para su posterior análisis al microscopio a 100x, observándose a doble ciego (Rikihisa, 1991).

##### **5.5.2. Análisis serológico por ELISA.**

Las muestras previamente observadas al microscopio que mostraron mórulas en neutrófilos se tomaron como sospechosas, para su posterior análisis mediante la técnica de ELISA del laboratorio IDEXX, llamadas SNAP® 4Dx® Test kit, para identificación de *Anaplasma phagocytophilum*. Siguiendo el protocolo del fabricante. Se tomaron 3 gotas de sangre y 4 gotas del conjugado (proviene en los kits), vaciando en un tubo de plástico desechable, se invirtió el tubo 4 a 5 veces para su combinación, y se vertió todo el contenido en el pocillo de muestra del dispositivo SNAP® 4Dx®. Cuando el conjugado corrió por la ventanilla, se accionó el SNAP® 4Dx® y se esperó 8 minutos para la aparición del resultado, esperando la aparición del punto azul que indicó positividad a *A. phagocytophilum*.

##### **5.5.3. Extracción de ADN.**

Se obtuvo el ADN mediante la técnica fenol-cloroformo. A 300 µl de sangre completa de canino se agregó amortiguador de lisis (TE: tris 100 mM y EDTA 10 mM), dodecilsulfato de sodio (SDS) al 20%, se incubaron a 37°C con calor seco y a 56°C con calor húmedo por una hora respectivamente. Se agregó fenol (1:1), se centrifugó por 2 minutos a 12000 RPM, se obtuvo la fase sobrenadante y se añadió cloroformo (1:1), se centrifugó por 2 minutos a 12000 RPM, se obtuvo el sobrenadante y se añadió etanol, se congeló por 24 horas a -20°C. Se centrifugó por 20 minutos a 12000 RPM y se decantó. A la pastilla obtenida se le agregó 50 µl de agua inyectable

estéril. El ADN se observó en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™ en luz ultravioleta (Sambrook *et al.*, 1989).

#### 5.5.4. PCR.

Se realizó la mezcla de reacción a 7 µL (Buffer 10X MgCl<sub>2</sub>, DNTPs, H<sub>2</sub>O inyectable estéril, Taq Polimerasa, oligonucleótidos y ADN). La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Labnet multigene), por 35 ciclos, la temperatura de desnaturalización fue de 94°C por 1:00 minuto, la alineación a 52°C por 1:00 minuto y la extensión a 72°C por 1:00 minuto (Jiménez *et al.*, 2009).

Los oligonucleótidos para identificar *Anaplasma spp.* se construyeron a partir del gen 16S rRNA. Forward: 5'-GGCTTTTGCCTCTGTGTTGT-3'. Reverse: 5'-CTTGACATCATCCCCACCTT-3 (Molad *et al.*, 2009).

El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™, observando el tamaño del fragmento amplificado (732 pb) en luz ultravioleta por comparación con marcadores de tamaño 1 Kb DNA ladder (Sambrook, 1989; Jiménez *et al.*, 2009).

#### 5.5.5. PCR anidado.

La amplificación se realizó con el grupo de oligonucleótidos internos: Forward 5'-CTTTATAGCTTGCTATAAAGAA-3' y Reverse: 5'-GTTAAGCCCTGGTATTTTAC-3'. El PCR se realizó a un volumen de reacción final de 7 µl (Buffer 10X MgCl<sub>2</sub>, DNTPs, H<sub>2</sub>O inyectable estéril, Taq Polimerasa, oligonucleótidos y reacción de PCR a muestras que amplificaron al gen de *Anaplasma spp.*). La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Labnet multigene), por 38 ciclos, la temperatura de desnaturalización fue de 94°C por 0:45 segundos, la alineación a 42°C por 0:45 segundos y la extensión a 72°C por 0:45 segundos (Molad *et al.*, 2009).

El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed™, observando el tamaño del fragmento amplificado 509-pb en luz ultravioleta, por comparación con marcadores de tamaño 1 kb (Noaman y Shayan, 2009).

## 5.6. Purificación.

Las muestras positivas por PCR anidado a *A. phagocytophilum*, se les realizó el proceso de purificación, utilizando el kit QIAquick® Gel Extraction Kit (50), de QIAGEN®. El kit está diseñado para extraer y purificar ADN de 70 bp a 10 kb, extraídos de gel de agarosa en TAE o TBE buffer.

El procedimiento se llevo a cabo según las indicaciones del fabricante. Se cortó con bisturí el fragmento de ADN de las bandas del gel de agarosa, colocándose la banda de gel en un tubo sin color, se agregó 3 volúmenes de Buffer QG a 1 volumen de gel (100 mg – 100 µl). Se Incubó a 50°C por 10 minutos. Después de que el gel se disolvió, se checó que el color de la mezcla fuera amarilla (similar al Buffer QG sin la agarosa disuelta). Se agregó 1 volumen de isopropanol a la mezcla y se colocó la columna de QIAquick® en un tubo para colección de 2 ml, después se centrifugó por 1 min. para unir el ADN, se colocó la muestra en la columna de QIAquick® y se centrifugó por 1 min, se desechó el sobrenadante y colocó la columna de QIAquick® de regreso a la columna del tubo, se agregó 0.75 ml de Buffer PE para lavar a la columna de QIAquick® y se centrifugó por un min., se desechó el sobrenadante y se centrifugó la columna de QIAquick® por un min. adicional a 12900 rpm, se colocó en la columna de QIAquick® dentro de un microtubo de 1.5 ml. Para diluir el ADN, se agregaron 50 microlitros de agua en el centro de la membrana del QIAquick® y se centrifugó la columna por 1 min.

## 5.7. Secuenciación.

Los resultados de las muestras se enviaron a los laboratorios MacroGenUSA Corp. donde se analizarán en la base de datos del GenBank® BLAST® <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> , para comparar la secuencia recibida con la base de datos de secuencias analizadas y descritas previamente de otras bacterias de la Familia *Anaplasmataceae* pertenecientes a otros países, buscando un 95% de similitud para después clasificarlas en base a lo anteriormente descrito.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 153 muestras de sangre de caninos de Culiacán, Sinaloa, con o sin signos de enfermedad, con o sin garrapatas que se obtuvieron, se les realizó la prueba de ELISA, 9 muestras resultaron positivas a *E. canis*/*E. ewingii*, y de ellas en conjunto a *A. phagocytophilum*/*A. platys* y 1 en conjunto con *Dirofilaria immitis*, como se muestra en el cuadro 1, donde se presenta reacción cruzada.

**Cuadro 1.** Detección de microorganismos en sangre por método de ELISA.

Microorganismo	CANINOS								
	57	30	38	147	35	39	14	29	34
<i>A. phago/A.platys</i>							+		+
<i>E. canis/E. ewingii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. burdogferi</i>									
<i>D. immitis</i>					+				

Lim *et al*, en 2010, analizaron mediante serología la sangre de perros de cacería de Korea, utilizando el mismo que ELISA que nuestro estudio (SNAP® 4Dx® de laboratorios IDEXX), el porcentaje de positivos a *A. phagocytophilum* fue de 18.8%, determinando que esto es debido a la exposición continua de garrapatas por cazar en una zona boscosa, coincidiendo con nuestro estudio en la presencia de reacción cruzada con *A. platys*, ya que el SNAP® 4Dx® no distingue la diferencia entre estas dos, siendo necesario la realización de estudios moleculares

La reacción cruzada que puede dar en los resultados serológicos como lo describió Salinas-Meléndrez en el 2014, donde publicaron un estudio de prevalencia para encontrar anticuerpos de *A. phagocytophilum* en perros de esa ciudad, analizando 391 muestras de sangre de perros, detectando por el método de ELISA, utilizando el SNAP, donde obtuvieron como resultado 12 muestras positivas, resultando en un 3% de frecuencia para *A. phagocytophilum* y 44% para *E. canis*. En comparación con nuestro estudio obtuvimos 5.8% de frecuencia de animales positivos a *E. canis* y 1.30% *A. phagocytophilum* en los caninos de Culiacán, Sinaloa,



como se muestra en el cuadro 2. La diferencia puede deberse quizás al tamaño de muestra, pero indicando que en ambos trabajos ya han identificado la presencia estas bacterias en los perros al detectarles anticuerpos contra *A. phagocytophilum* mostrando reacción cruzada, siendo necesario continuar con más investigaciones.

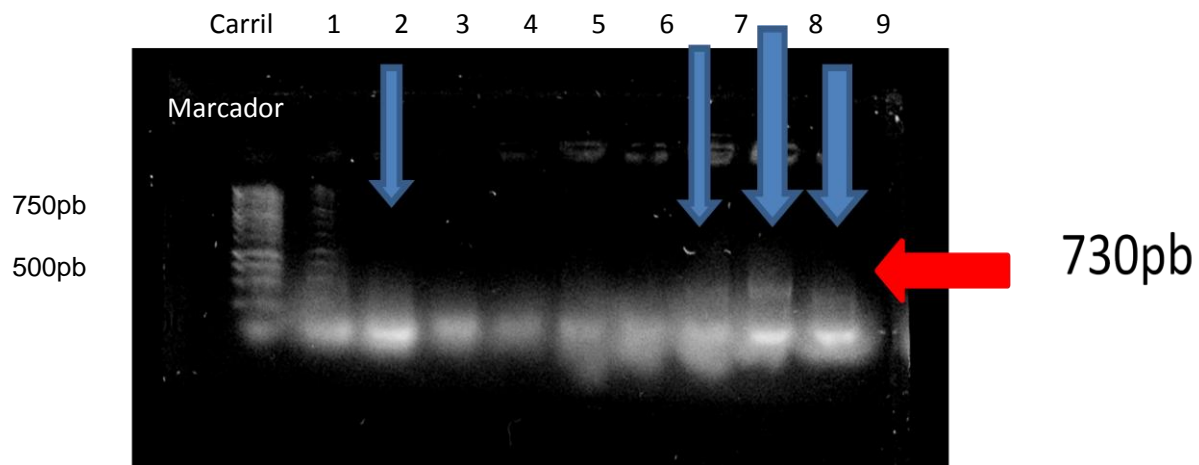
**Cuadro 2.** Frecuencia de perros positivos a *E. canis*/*E. ewingii* y *A. phagocytophilum*/*A. platys* por método de ELISA en Culiacán, Sinaloa.

<b>Caninos muestreados</b>	<b>Positivos <i>E. canis</i>/<i>E. ewingii</i></b>	<b>Positivos <i>A. phagocytophilum</i>/<i>A. platys</i></b>
153	9	2
%	5.88%	1.30%

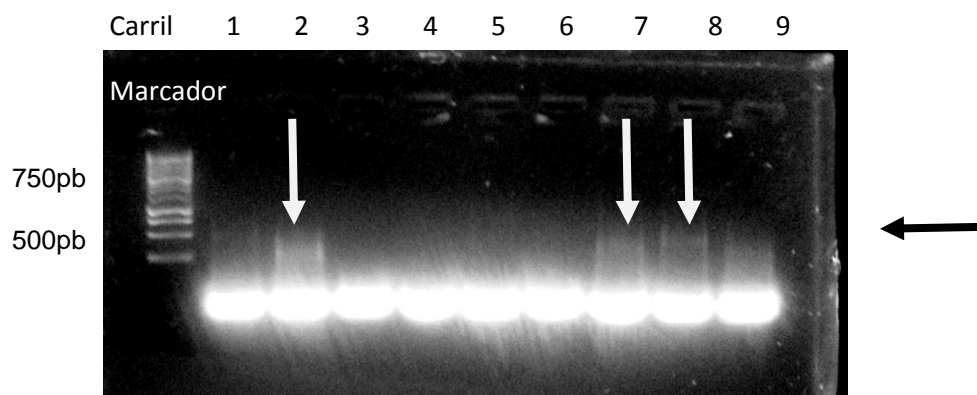
Países Europeos, realizan estudios en enfermedades causadas por las garrapatas, teniendo mayor conocimiento en estos agentes infecciosos, logrando diagnósticos oportunos. Tal es el caso de los estudio realizado por Kohn *et al*, en el 2011, donde estudio la prevalencia de *A. phagocytophilum* en perros, en Alemania, detectando por diferentes metodologías, como IFA, ELISA, y PCR, encontrando diferencia entre estos tres métodos, siendo más confiable la técnica molecular. Además, detectaron que los perros mostraron reacciones cruzadas en algunas enfermedades, tales como *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *E. canis* y *E.ewingii*. Sugiriendo como vector principal a la garrapata marrón del perro, *R. sanguineus*, concluyendo que las infecciones son endémicas en Alemania y que no existe diferencia entre perros sanos y enfermos, y que no influye raza y edad para adquirir la enfermedad.

Levi, *et al.* en 2006, realizaron un estudio de seroprevalencia de *A. phagocytophilum* en caballos y perros, en Israel. Donde se analizaron la sangre de 195 perros, donde 9% fueron positivos a *A. phagocytophilum* y 30% a *E. canis*, demostrando la posibilidad de reacciones cruzadas con estas dos bacterias, y como agente causal de la infección la garrapata *R. sanguineus*.

En nuestro estudio coincidimos que las técnicas moleculares tienen mayor precisión que las ELISA, ya que de las 4 positivas a *Anaplasma spp.* 2 (figura 1) de ellas resultaron positivas en reacción cruzada con *A. phagocytophilum/A. platys* con *E. canis/E. ewingii*, y por PCR, 2 resultaron ser positivas a *A. phagocytophilum*, como se observa en la figura 1, donde se muestran 3 amplificaciones correspondientes a una parte interna del gen 16S rARN de *A. phagocytophilum* descrito anteriormente por Noaman y Shayan en el 2009.



**Figura 1.** Gel de agarosa al 2%, teñido con Gel Red™. Donde se señala carril 1 MT de 1Kb; carriles 2, 6, 7 y 8 a *Anaplasma spp.* por PCR.



**Figura 2.** Gel de agarosa al 2%, teñido con Gel Red™. Donde se señala carril 1 MT de 1Kb; carriles 2, 7 y 8 a *A. phagocytophilum* por PCR anidado.

En base al PCR anidado, la frecuencia de *A. phagocytophilum* en caninos de Culiacán, Sinaloa, es de 1.96%, como se muestra en el cuadro 3.

**Cuadro 3.** Frecuencia de *A. phagocytophilum* en caninos de Culiacán, Sinaloa.

Caninos muestreados	Positivos	Negativos
153	3	150
% 100	1.96	98.04

Jensen *et al.*, en el año 2007, identificaron *A. phagocytophilum* en perros de Alemania, muestreando perros con y sin signos de enfermedad, dividiéndolo en dos grupos, el de los sanos (1) y los enfermos (2). Utilizaron el gen 16S rARN para PCR anidado. No encontraron diferencia significativa entre los dos grupos, presentando porcentajes 44.9% y 41.9% respectivamente, llegando a la conclusión de que existe un alto riesgo de adquirir la infección con *A. phagocytophilum*.

Melter, *et al.*, en el 2007 reportó un caso de *A. phagocytophilum* en un perro joven, en la República Checa, encontrado mórulas en los neutrófilos en los frotis sanguíneos realizados, y compararon con el análisis de IFA y amplificando el gen 16S rARN. La amplificación de la secuencia de ADN específica y la detección de anticuerpos, apoyaron a un diagnóstico confiable. Estos datos proporcionan mayor confiabilidad en estudios moleculares; en nuestro análisis de los dos positivos a *A. phagocytophilum*/*A. platys* por método de ELISA, solo uno de ellos resultó positivo por PCR a *A. phagocytophilum* logrando obtener un diagnóstico certero, sin embargo obtuvimos 2 con reacción cruzada con *E. canis*/*E. ewingii* y ambos resultaron positivos a *A. phagocytophilum* en PCR anidado.

Otro factor importante son las personas que realizan trabajos donde pueden exponerse a factores de riesgo para adquirir la enfermedad, como granjeros, guardabosques y médicos veterinarios, Chmielewska-Badorá *et al.*, en el 2012, realizó un estudio serológico, donde encontró porcentajes desde 23% hasta 37.5% de anticuerpos contra *A. phagocytophilum* en humanos.

En el censo realizado en 2014, en la ciudad de Culiacán, Sinaloa, arrojó la cantidad de 1 perro por cada 6 habitantes, esto en colonias populares. Teniendo Culiacán la cantidad de 858 838 habitantes, según el censo de INEGI 2014, dando por resultado un total de 143 106 perros, esta cantidad es significativa para realizar estudios pertinentes con respecto a enfermedades infecciosas transmitidas por garrapatas; demostrando en este trabajo por primera vez la identificación de *A. phagocytophilum* en perros de Culiacán, Sinaloa.

Es importante seguir con estudios sobre a factores de riesgo de la enfermedad para realizar un adecuado y oportuno diagnóstico de esta, desde que se presenta a consulta con los signos clínicos, siguiendo por un análisis sanguíneo, además de la presencia de garrapatas y el cambio climático. Maggi *et al* (2014), realizaron un estudio de comparación de diagnósticos serológicos y moleculares, para el diagnóstico de enfermedades causadas por garrapatas en perros, arrojando como conclusión que estas dos pruebas deben usarse de manera paralela para un buen diagnóstico.

Las herramientas de detección de enfermedades están cada vez más a la mano de los profesionistas en esta área, es necesario seguir con las investigaciones para tener mayor conocimiento sobre los patógenos que están expuestos las mascotas y principalmente reconocer el potencial zoonótico, al cual se queda expuesto. *A. phagocytophilum* es una bacteria zoonótica que usualmente no se diagnóstica en las diferentes especies que infecta y escasos los exámenes que se realizan de rutina, esto debido a la poca documentación en México. En base a los estudios realizados en otros países, en necesario ampliar el conocimiento, conocer a los vectores, sus rutas de transmisión y las medidas de control, para evitar riesgos de transmisión.

## VII. CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio confirman la presencia de *Anaplasma phagocytophilum* por PCR anidado, en caninos de Culiacán, Sinaloa, lo cual representa un riesgo para la salud animal y pública.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Abarca, K., J. López, P. González, A.J. Dabanch, M. Torres, V. Solari y C. Perret. 2008. Evidencia Seroepidemiológica de Exposición Humana a *Anaplasma sp* en Santiago, Chile. *Revista chilena de Infectología*. 25(5):358-361.
- Al Izzi, S., D.S. Martin, R.Y.Y. Chan y C. Leutenegger. 2013. *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys* infection in a dog. *Veterinary Clinical Pathology* ISSN 0275-6382. 42(4):471-475.
- Al-Khedery, B., A.M. Lundgren, S. Stuen, E.G. Granquist, U.G. Munderloh, C.M. Nelson, A.R. Alleman, S.M. Mahan y A.F. Barbet. 2012. Structure of the type IV secretion system in different strains of *Anaplasma phagocytophilum*. *BMC genomics* 13:678.
- Allison, R.W. y S.E. Little. 2013. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. *Vet Clin Pathol*. 42(2):127–144.
- Annen, K., K. Friedman, C. Eshoa, J. Gottschall, T. Straus y M. Horowitz. 2012. Two cases of transfusion- transmitted *Anaplasma phagocytophilum*. *Am J Clin Pathol*. 137:562-565.
- Bakken, J. y S. Dumler. 2006. Clinical diagnosis and Treatment of Human Granulocytotropic Anaplasmosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 1078:236–247.
- Barth, C., R. K. Straubinger, E. Muller, C. Sauter-Louis, y K. Hartmann. 2014. Comparison of different diagnostic tools for the detection of *Anaplasma phagocytophilum* in dogs. *Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology*. 0(0):1-5.
- Berzina, I. y I. Matise. 2013. Association between *Anaplasma phagocytophilum* seroprevalence in dogs and distribution of *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks in Latvia. *Ticks and tick-borne diseases*. 11:47-51.
- Bowman, D., S.E. Little, L. Lorentzen, J. Shields, M.P. Sullivan y E.P. Carlin. 2009. Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdoferi*, *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: Results of a national clinic- based serological survey. *Veterinary parasitology*. 160:138-148.
- Bown, K.J., X. Lambin, N. Lambin, N.H. Ogden, M. Begon, G. Telford, Z. Woldehiwet y R. Birtles. 2009. Delineating *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in coexisting, Discrete enzootic cycles. *Emerging Infectious Diseases*. 15(12):1948-1954.

- Brown, C.W. 2012. Adaptive immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation: implications for bacterial persistence. *Comparative Immunology Microbiology Infectious Diseases*. 35:241-252.
- Carrade, D.D., J.E. Foley, D.L. Borjesson y J.E. Sykes. 2009. Canine Granulocytic Anaplasmosis: A Review. *Journal Veterinary Intern Med*. 23:1129-1141.
- Clarridge, J.E. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 17(4):840-862.
- Chan, K., S. A. Marras, y N. Parveen. 2013. Sensitive multiplex PCR assay to differentiate Lyme spirochetes and emerging pathogens *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti*. *BMC microbiology*. 13(295):1-15.
- Chen, S.M., J.S. Dumler, J.S. Bakken y D.H. Walker. 1994. Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol*. 32:589-595.
- Chmielewska-Badora, J., A. Moniuszko, W. Zükiewicz-Sobczaki, J. Zwolinski, J. Piatek y S. Pancewicz. 2012. Serological survey in persons occupationally exposed to tick-borne pathogens in cases of coinfections with *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Bartonella spp.* and *Babesia microti*. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 19(2):271-274.
- Clark, K.L. 2012. *Anaplasma phagocytophilum* in small mammals and ticks in northeast Florida. *Journal of Vector Ecology*. 37(1):262-268.
- Corona, B. y S. Martínez. 2009. Differences and similarities between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*. *Rev. Salud. Anim.* 31(1):1-7.
- Dantas-Torres, F., L. Aguiar y S.P. Brandao-Filho. 2006. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 39:64-67.
- Dantas-Torres, F. 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1986) (Acari: Ixodidae): From Taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*. 152: 173-185.
- Dantas-Torres, F. 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*. 3(26): 1-11.
- Dahlgren, F.S., E.J. Mandel, J.W. Krebs, R.F. Massung y J.H. McQuiston. 2011. Increasing Incidence of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* in the United States, 2000-2007. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85(1):124-131.

- Davoust, B., O. Mediannikov, J. Chene, R. Massot, R. Tine, M. Diarra, J.P. Demoncheaux, P. Scandola, F. Beugnet y L. Chabanne. 2013. Study of ehrlichiosis in kennel dogs under treatment and prevention during seven months in Dakar (Senegal). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 36:613- 617.
- De la Fuente, J., A. Torina, V. Naranjo, S. Nicosia, A. Alongi, F. LaMantia y K. Kocan. 2006. Molecular characterization of *Anaplasma platys* strains from dogs in Sicily, Italy. *BMC Veterinary Research*. 2(24):1-5.
- Dumler, J.S., A.F. Barbet, P.J. Cornelis, J. Bekker, G.A. Dasch, G.H. Palmer, S.C. Ray, Y. Rikihisa y F. R. Rurangirwa. 2001. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmatacea*: uniification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designations of *Ehrlichia equi* and HGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51:2145-2165.
- Dumler, J.S. 2005. *Anaplasma* and *Ehrlichia* Infection. *New York Academy of Sciences*. 1063:361-373.
- Dumler, J.S. 2011. The biological basis of severe outcomes in *Anaplasma phagocytophilum* infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 64:13-20.
- Dumler, J.S. 2012. Is Human Granulocytic Ehrlichiosis a New Lyme Disease? Review and Comparison of Clinical, Laboratory, Epidemiological, and some Biological Features. *Clinical Infectious Diseases*. 25(1):43-47.
- Dumler, J.S. 2013. Ehrlichiosis y anaplasmosis en América. *Acta Médica Costarricense. Colegio de Médicos y Cirujanos de Costa Rica*. 3:29-33.
- Dyachenko, V., C. Geiger, N. Pantchev, M. Majzoub, L. Bell-Sakyi, I. Krupka y K. Straubinger. 2013. Isolation of canine *Anaplasma phagocytophilum* strains from clinical blood samples using the *Ixodes ricinus* cell line IRE/CTVM20. *Veterinary Microbiology*. 162:980-986.
- Ebani, V. V., F. Bertelloni, B. Turchi, and D. Cerri. 2013. Serological and molecular survey of *Anaplasma phagocytophilum* in Italian hunting dogs. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*. 20(2):289-292.
- Eberts, M.D., P.P. Vissotto de Palva Diniz, M.J. Beall, B.A. Stillman, R. Chandrashekar y E.B. Breitschwerdt. 2011. Typical and Atypical manifestations of *Anaplasma phagocytophilum* Infection in dogs. *Journal American Animal Hospital Association*. 47:6. Nov/Dec.



- Foley, J.E., N.C. Nieto, A. Barbet y P. Foley. 2009. Antigen Diversity in the Parasitic Bacterium *Anaplasma phagocytophilum* Arises from Selectively-Represented, Spatially Clustered Functional Pseudogenes, PLoS ONE. 4(12): e8265.
- Foley, J. y N. Nieto. 2006. *Anaplasma phagocytophilum* subverts ticks salivary gland protein. TRENDS in Parasitology. 23(1):3-5.
- Fronzes, R., E. Schafer, L. Wang, H.R. Saibil, E.V. Orlova y G. Waksman 2009. Structure of a Type IV Secretion System Core Complex. Science. 323:266-268.
- Garyu, J., K. Choi, D.J. Grab y J.S. Dumler. 2005. Defective Phagocytosis in *Anaplasma phagocytophilum*- Infected Neutrophils. Infection and Immunity. 73 (2):1187-1190.
- Gaunt, S.D., M.J. Beall, B.A. Stillman, L. Lorentzen, P. Diniz, R. Chandrashekar y E.B. Breitschwerdt. 2010. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. Parasitic & Vectors. 3(33):1-10.
- Gillespie, J.J., K.A. Brayton, K.P. Williams, M.A. Quevedo, W.C. Brown, A.F. Azad y B.W. Sobral. 2010. Phylogenomics Reveals a Diverse *Rickettsiales* Type IV Secretion System. Infection and Immunity. 78(5):1809-1823.
- González-Pedrajo, B. y G. Dreyfus. 2003. Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias gram negativas: Biogenesis flagelar y translocación y factores de virulencia. Mensaje Bioquímico, VolXXVII. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>) (ISSN-0188-137X).
- Granick, J., D. Reneer, J. Carlyon y D.L. Borjesson. 2008. *Anaplasma phagocytophilum* infects cells of the megakaryocytic lineage through sialyted ligands but fails to alter platelet production. Journal of Medical Microbiology. 57:416-423.
- Hernández- Ayazo, H. y M.C. Said. 2013. Entendiendo las Ehrlichiosis Humanas y destacando a un agente causal *Anaplasma phagocytophilum*. Revista Ciencias Biomédicas. 4(1):165-169.
- Huang, B., M.J. Troese, D. Howe, S. Ye, J.T. Sims, R.A. Heinzen, D.L. Borjesson y J.A. Carlyon 2010. *Anaplasma phagocytophilum* APH\_1387 Is Expressed through Bacterial Intracellular Development and Localizes to the Pathogen-Occupied Vacuolar Membrane. Microbial Pathogenesis. 49:1864-1873.
- Huhn, C., C. Winter, T. Wolfsperger, N. Wuppenhorst, K. S. Smrdel, J. Skuballa, M. Pfaffle, T. Petney, C. Silaghi, V. Dyachenko, N. Pantchev, R.K. Straibinger, D. Schaarschmidt-Kiener, M. Ganter, M.L. Aardema y F. VonLoewenich. 2014.

Analysis of the population structure of *Anaplasma phagocytophilum* using multilocus sequence typing. PloS one. 9(4): e93725.

- INEGI. 2009. Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática, Censo Agrícola Ganadero y Forestal 2007. Obtenido el 17 de febrero del 2011 en <http://mapserver.inegi.org.mx/geografia/espanol/estados/sin/clim.cfm?c=444&e=09>
- Inokuma, H., M. Oyamada, P.J. Kelly, L.A. Jacobson, P.E. Fournier, K. Itamoto, M. Okuda y P. Brouqui. 2002. Determination of the Nucleotide Sequences of Heat Shock Operon *groESL* and the Citrate Synthase Gene (*gltA*) of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* for Phylogenetic and Diagnostic Studies. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 43(6):1132-1136.
- Janda, J.M. y S.L. Abbott. 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils and Pitfalls. Journal of Clinical Microbiology. 45(9):2761-2764.
- Jensen, J., D. Simon, H.M. Escobar, J.T. Soller, J. Bullerdiek, P. Beelitz, K. Pfister y I. Nolte. 2007. *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. Journal compilation. Blackwell Verlag Berlin. Zoonoses and Public Health. 54:94-101.
- Jimenez, O.R., G.J.J. Mosqueda, R.A. Sahagun, R.E.E. Rojas, O.N. Oviedo y S.D. Rodriguez. 2009. Análisis. "In Silico" de la protein VirB9 en cepas mexicanas de *Anaplasma marginale*. VII Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria. Mérida, Yucatán, México. Pag.100.
- Ketargina, O., J. Geller, A. Alekseev, H. Dubinina, G. Efremova, N. Mishaeva, V. Vasilenko, T. Kuznetsova, L. Järvekülg, S. Vene, A. Lundkvist y I. Golovljova. 2011. National Institute for Health Development. Clinical Microbiology and Infection, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 18:40-46.
- Kohn, B., C. Silaghi, D. Galke, G. Arndt y K. Pfister. 2011. Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. Research in Veterinary Science. 91: 71-76.
- Levi, O., T. Waner, G. Baneth, A. Keysary, Y. Bruchim, J. Silverman y S. Harrus. 2006. Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* among Healthy Dogs and Horses in Israel. Israel Institute for Biological Research . J. Vet. Med. 53: 78-80.
- Li, H., Y. Zhou, W. Wang, D. Guo, S. Huang y S. Jie. 2011. The clinical characteristics and outcomes of patients with Human Granulocytic anaplasmosis in China. International Journal of Infectious Diseases 15; e859-e866.

- Lim, S., P.J. Irwin, S. Lee, M. Oh, K. Ahn, B. Myung y S. Shin. 2010. Comparison of selected canine vector-borne diseases between urban shelter and rural hunting dogs in Korea. *Parasites & Vectors*. 3:32.
- López, Del P.J., K. Abarca y T. Azúcar. 2007. Evidencia clínica y serológica de rickettsiosis canina en Chile. *Revista Chilena de Infectología*. 24: 189-193.
- Maggi, R.G., A.J. Birkenheuer, B.C. Hegarty, J.M. Bradley, M.G. Levi y E.B. Breitschwerdt. 2014. Comparison of serological and molecular panels for diagnosis of vector borne diseases in dogs. *BioMed Central. Parasites & Vectors*. 7(127): 1-9.
- Mayne, P.J. 2011. Emerging incidence of Lyme borreliosis, babesiosis, bartonellosis, and granulocytic ehrlichiosis in Australia. *International Journal of General Medicine*. 4: 845-852.
- Manna, L., A. Alberti, L.M. Pavone, A. Scibelli, N. Staiano y A.E. Gravino. 2004. First molecular characterization of a granulocytic *Ehrlichia* strain isolated from a dog in South Italy. *The Veterinary Journal*. 167: 224–227.
- Melter, O., I. Stehlik, H. Kinska, I. Volfovai, V. Tichai y D. Hulinskas. 2007. Infection with *Anaplasma phagocytophilum* in a young dog: a case report. *Veterinary Medicina*. 52(5): 207–212.
- Miro, G., A. Montoya, X. Roura, R. Galvez, y A. Sainz. 2013. Seropositivity rates for agents of canine vector-borne diseases in Spain: a multicentre study. *Parasites & vectors*. 6:117.
- Molad, T., M.L. Fleiderovitz, I. Fish, I. Savitsky, Y. Krigel, B. Leibovitz, J. Molloy, F. Jongejan y V. Shkap. 2006. Molecular and serological detection of *A. centrale* and *A. marginale* infected cattle grazing within an endemic area. *Veterinary Microbiology*. 113: 55-62.
- Monsalve, S., S. Mattar y M. González. 2009. Zoonosis transmitidas por animales silvestres y su impacto en las enfermedades emergentes y reemergentes. *Revista MVZ Córdoba*. 14(2): 1762-1773.
- Murray PR., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, 2003. *Yolken Editors. Manual of Clinical Microbiology*. 8th. ed. Washington, D.C. ASM Press.
- Neelakanta, G., H. Sultana, D. Fish, J.F. Anderson y E. Fikrig. 2010. *Anaplasma phagocytophilum* induces *Ixodes scapularis* ticks to express an antifreeze glycoprotein gene that enhances their survival in the cold. *The Journal of Clinical Investigation*. 120(9): 3179-3190.

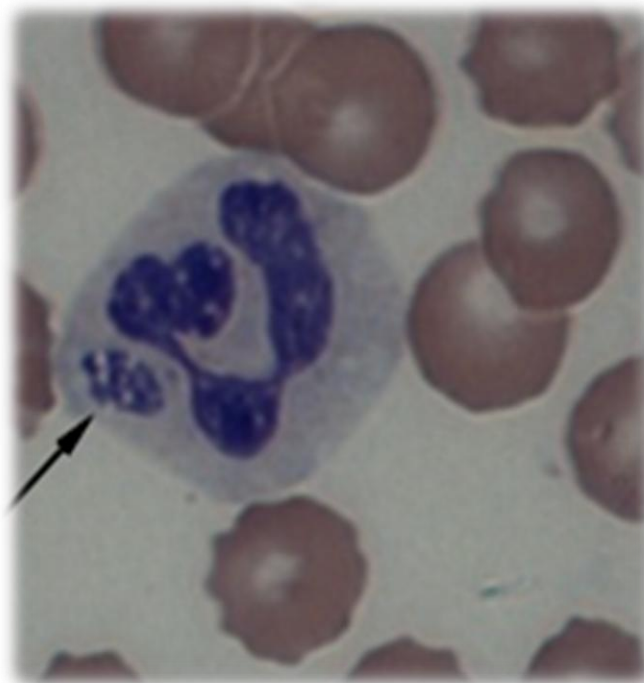
- Nicholson, W., K.E. Allen, J.H. McQuiston, E.B. Breitschwendt y S.E. Little. 2010. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. Special Issue: Zoonosis of people and pets in the USA. 26(4):205-212.
- Noaman, V. y P. Shayan. 2009. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in carrier cattle of Iran – first document report. Iranian Journal of microbiology. 1(2):37-42.
- Ogden, N.H., Z. Woldehiwet y C.A. Hart. 1998. Granulocytic ehrlichiosis: an emerging or rediscovered tick-borne disease?. J. Med. Microbiol. 47:475-482.
- Oteo, J.A. y P. Brouqui. 2006. Ehrlichiosis y Anaplasmosis humana. Enferm Infecc Microbiol Clin. 23 (6): 375-380.
- Pérez-Sánchez, R., P. Fernández-Soto y A. Encinas-Grandes. 2006. Garrapatas y anaplasmosis granulocítica humana en Europa. Revisión de la situación en España. Revista Ibérica de Parasitología. 66(1-4):17-29.
- Poitout, F.M., J.K. Shinozaki, P.J. Stockwell, C.J. Holland y S.K. Shukla. 2005. Genetic Variants of *Anaplasma phagocytophilum* Infecting Dogs in Western Washington State. Journal of Clinical Microbiology. 43(2):796-801.
- Ravnik, U., N. Tozon, K.S. Smrdel y T.A. Zupanc. 2011. Anaplasmosis in dogs: The relation of haematological, biochemical and clinical alterations to antibody titre and PCR confirmed infection. Veterinary Microbiology. 149: 172-176.
- Rejmanek, D., G. Bradburd y J. Foley. 2012. Molecular characterization reveals distinct genospecies of *Anaplasma phagocytophilum* from diverse North American hosts. Journal of Medical Microbiology. 61: 204-212.
- Rikihisa, Y. 1991. The Tribe *Ehrlichieae* and Ehrlichial diseases. Clinical Microbiology Reviews. 4(3):286-308.
- Rikihisa, Y. 2006. New Findings on Members of the Family *Anaplasmataceae* of Veterinary Importance. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1078: 438–445.
- Rikihisa, Y., M. Lin, H. Niu y Z. Cheng. 2009. Type IV Secretion System of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*. Rickettsiology and Rickettsial Diseases- Fifth International Conference. 1166: 106-111.
- Rikihisa, Y., M. Lin y H. Niu. 2010. Type IV secretion in the obligatory intracellular bacterium *Anaplasma phagocytophilum*. Cellular Microbiology. 12(9): 1213-1221.
- Rikihisa, Y. 2010. Molecular events involved in cellular invasion by *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum*. Veterinary Parasitology. 167: 155-166.

- Rikihisa, Y. 2011. Mechanisms of Obligatory Intracellular Infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin, Microbiolo. Rev.* 24(3):469.
- Rodicio M.R. y M.C. Mendoza. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol Clin.* 22(4): 238-245.
- Rojas-Triviño, A., A.R. Hurtado, D.M. Díaz, N.C. Mesa, J.A. Benavides, K.I. Lopez, L. Alvarez y R. Lopez. 2013. Identificación de *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard) Moshkovski mediante PCR anidada. *Veterinaria y Zootecnia.* 7(1):37-48.
- Rufino-Pinheiro, C., P.H. Goncalves, T. Reis, R. Campos, D.C. Figueira, J.A. McCulloch, A.M. Conceicao y E. Costa. 2013. Detection of Ehrlichia canis and Anasplasma platys DNA Using Multiplex PCR. *Vector Borne and Zoonotic Diseases.* 13 (12):846-850.
- Rymaszeska, A. 2005. Identification of *Anaplasma phagocytophilum* on the Basis of a fragment of the 16S rRNA gene. *Folia Biologica (Krakow).* 53: 3-4.
- Rymaszezwska, G. y S. Grenda. 2008. Bacteria of the genus *Anaplasma*-characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. *Veterinarni Medicina.* 53: 573-584.
- Salinas-Meléndrez, J.A., R. Villavicencio-Pedraza, B.V. Tamez-Hernández, J.J. Hernández-Escareño, R. Avalos-Ramírez, J.J. Zarate-Ramos, F.J. Picón-Rubio y V.M. Riojas-Valdéz. 2014. Prevalence of anti-*Anaplasma phagocytophilum* antibodies among dogs from Monterrey, México. *African Journal of Microbiology Research.* 8(8): 825-829.
- Santos, H.A., M.S. Pires, J.A.R. Vilela, T.M. Santos, J. Faccini, C.D. Baldani, S.M.G. Thomé, A. Sanavria y C.L. Massard. 2011. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Brazilian dogs by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 23 (4): 770-774.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning. Laboratory manual.* 2 da edition. Cold spring Harbor laboratory press.
- Scorpio, D.G., J.S. Dumler, N.C. Barat, J.A. Cook, C.E. Barat, B.A. Stillman, K.C. DeBisceglie, M.J. Beall y R. Chandrashekar. 2011. Comparative Strain Analysis of *Anaplasma phagocytophilum* Infection and Clinical Outcomes in a Canine Model of Granulocytic Anaplasmosis. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 11 (3): 223-229.
- Schotthoefer, A.M., J.K. Meece, L.C. Ivacic, P.D. Bertz, K. Zhang, T. weller, T.S. Uphoff y T.R. Fritsche. 2013. Comparision of a real Time PCR Method with

- serology and blood smear analysis for diagnosis of human anaplasmosis importance of infection time course for optimal test utilization. *Journal of Clinical Microbiology*. 51(7): 2147-2153.
- Severo, M., K. Stephens, M. Kotsyfakis y J.H. Pedra. 2012. *Anaplasma phagocytophilum*: deceptively simple or simply deceptive?. *National Institutes of Health*. 7: 719-731.
- Silaghi, C., B. Kohn, A. Chirek, C. Thiel, I. Nolte, G. Liebisch y Kurt Pfister. 2011. Relationship of Molecular and Clinical Findings on *Anaplasma phagocytophilum* Involved in Natural Infections of Dogs. *Journal of Clinical Microbiology*. 49(12): 4413.
- Smrdel, K.J., M. Serdt, D. Duh y T.A. Zupanc. 2010. *Anaplasma phagocytophilum* in ticks in Slovenia. *Parasites & Vectors*. 3:102.
- St. Clair, K. 2012. Ehrlichiosis : Anaplasmosis and Human Ehrlichiosis. *Dis Mon*. 58:346-354.
- Stuen, S., I. Van Der Pol, K. Bergström y L.M. Schouls. 2002. Identification of *Anaplasma phagocytophilum* (Formerly *Ehrlichia phagocytophila*) Variants in Blood from Sheep in Norway. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(9):3192-3197.
- Stuen, S. 2007. *Anaplasma phagocytophilum*- the Most Widespread Tick- Borne Infection in Animals in Europe. *Veterinary research communications*. 31 (1): 79-84.
- Stuen, S., E. G. Granquist, y C. Silaghi. 2013. *Anaplasma phagocytophilum*—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 3(31):1-33.
- Stuen, S., E.G. Granquist y C. Silaghi. 2014. *Anaplasma phagocytophilum* – pathogen with a zoonotic potential. *Parasites & Vectors*. 7 (1): 024.
- Tinoco-Gracia, L., H. Quiroz, M.T. Quintero, T.B. Renteria, A. Barreras, S. Hori, G. Lopez, A.R. Tamayo, V.A. Quezada, M. Moro y J. Vinasco. 2007. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* in Dogs from a Mexico – U.S. Border desert Region: Pilot Study. *Journal of Animal Veterinary Advances*. 6(3): 758-760.
- Thrusfield, M. 1990. *Epidemiología veterinaria*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. Pág. 192-193.
- Tveten, A. K., A. Riborg, y H. T. Vadseth. 2013. DGGE Identification of Microorganisms Associated with *Borrelia burgdorferi Sensu Lato*- or *Anaplasma phagocytophilum*-Infected *Ixodes ricinus* Ticks from Northwest Norway. *International journal of microbiology*. Art ID 805456:8 pages.

- Vichová, B., M. Miterpakova, and A. Iglodyova. 2014. Molecular detection of co-infections with *Anaplasma phagocytophilum* and/or *Babesia canis canis* in Dirofilaria-positive dogs from Slovakia. *Veterinary parasitology*. 203:167-172.
- Wallden, K., A. Rivera-Calzada y G. Waksman. 2010. Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cellular Microbiology*. 12(9): 1203-1212.
- Woldehiwet, Z. 2006. Inmune evasión and inmunosuppression by *Anaplasma phagocytophilum*, the causative agente of tick-borne fever of ruminants and human granulocytic anaplasmosis. *The Veterinary Journal*. 175: 37-44.
- Woldehiwet, Z. 2010. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Veterinary Parasitology*. 167: 108-122.
- Ybañez, A.P., M. Sashika y H. Inokuma. 2013. The Phylogenetic Position of *Anaplasma bovis* and Inferences on the Phylogeny of the Genus *Anaplasma*. *J. Vet.Med. Sci*. 76(2): 307-312.
- Zivkovic, Z., E.F. Blouin, R.Manzano, C. Almazan, V. Naranjo, R.F. Massung, F. Jongejan, K. Kocan y J. de la Fuente. 2009. *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma marginale* Elicit Different Gene Expression Responses in Cultured Tick Cells. *Comparative and Functional Corporation*. Art ID 705034, 9 pages.
- Zhang, L., D. Ni, Q. Li, Y. Yu, X. Yu, K. Wan, D. Li, G. Liang, X. Jiang, H. Jing, J. Run, M. Luan, X. Fu, J. Zhang, W. Yang, Y. Wang, 2008. Nosocomial Transmission of Human Granulocytic Anaplasmosis in China. *Journal American Medical Association*. 300(19): 2263-2270.
- Zhang, L., G. Wang, Q. Liu, C. Che, J. Li, B. Long, H. Yu, Z. Zhang, J. He, Z. Qu, J. Yu, Y. Liu, T. Dong, N. Yao. Y. Wang, X. Cheng, J. Xu, J.S. Dumler, Z. Feng, J. Ren y J. Xu. 2013. Molecular analysis of *Anaplasma phagocytophilum* isolated from patients with febrile diseases of unknown etiology in China. *PLoS one* 8: e57155.

## IX. ANEXOS



**Figura 3.** Neutrófilo teñido con Giemsa-Wright, donde se observan cuerpos de inclusión de *A. phagocytophilum* por microscopia óptica a 100x (Melter *et al.*, 2007)

**Cuadro 4.** Número de perros muestreados por edad.

Edad	No. Perros muestreados	Porcentaje
Menores de 1 año	25	16.34 %
De 1 a 4 años	59	38.56 %
De 5 a 8 años	60	39.22 %
De 9 a 13 años	9	5.88 %
<b>TOTAL</b>	153	100 %



**Cuadro 5.** Razas perros muestreados.

<b>RAZA</b>	<b>CANTIDAD</b>	<b>PORCENTAJE</b>
Poodle	33	21.56 %
Mestizo	22	14.37 %
Chihuahua	21	13.71 %
Schnauzer	13	8.49 %
Pitbull	7	4.57 %
Bulldog inglés, Doberman, Golden Retriever, Pastor alemán, Pastor belga	4 c/u	2.61 %
Husky Labrador Maltés Pastor australiano Pomeranian Shih tsu y Yorkshire terrier	3 c/u	1.96 %
Boxer Cocker spaniel Pug Dogo argentino	2 c/u	1.3 %

**Cuadro 6.** Cantidad de perros muestreados por sexo.

<b>Número de perros muestreados</b>	<b>Sexo</b>	<b>Porcentaje</b>
64	Hembras	41.83 %
89	Machos	58.17 %

**Cuadro 7.** Microorganismos observados por análisis microscópico en las muestras de sangre de perro.

<b>Resultado</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Porcentaje</b>
<i>Babesia</i>	68	44.44 %
<i>Ehrlichia spp.</i>	9	5.89 %
<i>Babesia/ Ehrlichia spp.</i>	2	1.30 %
Sospechosos <i>Anaplasma spp.</i>	33	21.57 %
Negativos	41	26.80 %
<b>TOTAL</b>	<b>153</b>	<b>100 %</b>