

Universidad Autónoma de Sinaloa
Colegio de Ciencias Agropecuarias
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Maestría en Ciencias Agropecuarias



TESIS:

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Ehrlichia canis* EN SANGRE DE PERROS DE CULIACÁN, SINALOA, MÉXICO.”

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

PRESENTA:

BLANCA ESTHELA LÓPEZ GALLEGOS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

CO-DIRECTOR DE TESIS:

DR. MARIO CÉSAR RUBIO ROBLES

ASESORES:

DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

DRA. NOHEMÍ CASTRO DEL CAMPO

MC. CLAUDIA LEONOR BARRAZA TIZOC

CULIACÁN, SINALOA, MÉXICO: A JULIO DE 2020

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **BLANCA ESTHELA LÓPEZ GALLEGOS**,
BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO
APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTORA:



DRA. IDALIA ENRIQUEZ VERDUGO

CO-DIRECTOR:

MARIO CESAR RUBIO ROBLES 

DR. MARIO CÉSAR RUBIO ROBLES

ASESORA:

Soila M. Gaxiola C.
DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

ASESORA:



DRA. NOHEMÍ CASTRO DEL CAMPO

ASESORA:



MC. CLAUDIA LEONOR BARRAZA TIZOC

CULIACÁN, SINALOA, JULIO DEL 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA CULIACÁN
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL FUERTE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL CARRIZO

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 20 de enero del año 2020, la que suscribe Blanca Esthela López Gallegos, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias, con número de cuenta 01093460, de la Unidad Académica Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la UAS, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Idalia Enríquez Verdugo y del Dr. Mario Cesar Rubio Robles y cede los derechos del trabajo titulado “IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Ehrlichia canis* EN SANGRE DE PERROS DE CULIACÁN, SINALOA, MÉXICO”, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Sinaloa, para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales, todo esto en apego al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ATENTAMENTE

Blanca Esthela López Gallegos

DOMICILIO: Alberto Terrones # 2620 Col. Aquiles Serdán. Culiacán, Sinaloa, México.
TELÉFONO: 667-1653997
CORREO ELECTRÓNICO: blancalopez@uas.edu.mx
CURP: LOGB870808MSLPLL01

DEDICATORIA

Con mucho entusiasmo quiero dedicar este proyecto, a cada uno de mis seres queridos, quienes han sido una parte importante para seguir adelante en cada una de las metas que me propongo.

Me llena de felicidad poder dedicarles algo que con mucho esfuerzo se logró al final a pesar de todo.

A mis padres José López y Estela Gallegos, porque a demás de darme la oportunidad de vivir en un mundo lleno de cosas lindas, me han apoyado en lo que han podido para lograr lo que me propongo.

A mis hermanos que son parte de mi día a día y que cuando me han visto cabizbaja me han ayudado a salir adelante.

A la Dra. Idalia Enríquez Verdugo por confiar en mí, apoyarme y ayudarme, aun y cuando yo creí que no podía seguir adelante con este proyecto ella jamás se dio por vencida conmigo y me apoyo en todo lo que pudo.

Son una parte importante en todo lo que he logrado.

AGRADECIMIENTOS

Desde el momento en el que decidí comenzar este proyecto tuve el apoyo de muchas personas, familia, amigos, maestros, etc.

Quiero agradecer a mis padres y hermanos que nunca me han dejado de dar su apoyo con cada una de mis decisiones aun con los problemas que estos conlleven, siempre me ayudaron a Salir adelante.

A la dra. Idalia Enríquez Verdugo porque siempre fue un apoyo no solo académico, también emocional, nunca dejo de preocuparse por mí y aun cuando yo creí ya no podía mas seguir adelante, ella no me soltó de la mano y me siguió incentivando para seguir hasta el final y no rendirme, le estoy inmensamente agradecida.

A la Dra. Nohemí Castro del Campo por apoyarme en cada duda que siempre tuve y siempre estar presente cuando la necesité.

A la Dra. Soila Gaxiola por apoyarme en seguir adelante hasta el término de este proyecto.

A la MC. Claudia Barraza Tizoc porque siempre estuvo presente en mis días de trabajo de laboratorio ayudando con mis dudas y apoyando con su gran conocimiento en el tema para sacar este proyecto.

Al Dr. Mario Cesar Rubio Robles por el apoyo brindado en este y otros proyectos que he tenido junto a él, dando siempre lo mejor para que se logren sacar a delante.

A mis compañeros de generación que me enseñaron que un grupo de personas desconocidas pueden volverse muy unidas cuando se necesita.

Gracias a todos.

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. Historia	¡Error! Marcador no definido.
2.2. <i>Ehrlichia canis</i>	¡Error! Marcador no definido.
2.3. Ehrlichiosis monocítica canina	6
2.3.1 Hallazgos hematológicos	7
2.4. Vector	¡Error! Marcador no definido.
2.5. Ciclo de vida.....	¡Error! Marcador no definido.
2.6. Patogénesis.....	¡Error! Marcador no definido.
2.7. Respuesta inmunológica	¡Error! Marcador no definido.
2.8. Diagnóstico.....	¡Error! Marcador no definido.
2.8.1. Frotis sanguíneo	15
2.8.2. Serología	16
2.8.3. Inmunofluorescencia (IFA:Immunofluorescence Antibody Assay).	16
2.8.4. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)..	17
2.8.5. Cultivo.....	18
2.8.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR:polymerase chain reaction)	18
2.8.7. Secuenciación de Genes.	19
2.9. Antecedentes Directos	¡Error! Marcador no definido.
III. HIPÓTESIS	22
IV. OBJETIVOS	23
V- MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
VII. CONCLUSIONES.....	29
VIII. LITERATURA CITADA.....	30
IX. ANEXOS	37

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Resumen de enfermedades Ehrlichiales y sus vectores	4
2	Reclasificación de géneros de la familia Anaplasmataceae	5
3	Líneas celulares reportadas para el cultivo de agentes rickettsiales	6

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Mórula de <i>Ehrlichia canis</i> observada en un monocito bajo microscopio	11
2	Entrada, replicación (mórula) y salida de cuerpos elementales <i>Ehrlichia canis</i> de una célula infectada	11
3	Amplicón de aproximadamente 380 pb de <i>E. canis</i> en perros, carriles 2-6. Marcador de tamaño de 100 pb situado en carril 1	28

RESUMEN

Identificación Molecular de *Ehrlichia canis* en Sangre de Perros de Culiacán, Sinaloa, México.

BLANCA ESTHELA LÓPEZ GALLEGOS

E. canis es una bacteria perteneciente al orden Rickettsiales (α - proteobacteria) transmitida por la garrapata marrón del perro (*Rhipicephalus sanguineus*), se desarrolla en monocitos y macrófagos causando una infección persistente, es el agente causal de la ehrlichiosis monocítica canina, enfermedad de importancia veterinaria. Los métodos implementados para su diagnóstico son indirectos (serología) o directos (frotis sanguíneos y PCR), el objetivo de este estudio fue identificar molecularmente *Ehrlichia canis* sangre de perros de Culiacán, Sinaloa, México; sin importar edad, sexo, raza o presencia de signología referente a la enfermedad; para lo cual se recolectaron muestras de sangre de 168 perros a las cuales se les extrajo ADN mediante la técnica de fenol-cloroformo, posteriormente se procesaron mediante PCR a fin de amplificar fragmentos del gen 16S RNAr para identificar *E. canis* ;resultando 17 muestras que presentaron bandas de aproximadamente 480 pb compatibles para *Ehrlichia* spp., representando el 10.11% de las 168 muestras procesadas, estas 17 muestras fueron analizadas mediante PCR anidado para el gen específico de *Ehrlichia canis* arrojando un resultado de 5 muestras que presentaron bandas de aproximadamente 380 pb., representando el 2.97% del total de muestras procesadas. Con este estudio se demuestra que *Ehrlichia canis* se encuentra presente en sangre de perros del municipio de Culiacán, Sinaloa, México.

Palabras clave: PCR, perros, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia* spp., 16S rRNA.

ABSTRACT

Molecular identification of *Ehrlichia canis* in Blood of Dogs from Culiacan, Sinaloa, Mexico.

BLANCA ESTHELA LÓPEZ GALLEGOS

E. canis is a bacterium belonging to the order Rickettsiales (α -proteobacteria) transmitted by the dog's brown tick (*Rhipicephalus sanguineus*). It develops in monocytes and macrophages causing a persistent infection, it is the causative agent of canine monocytic ehrlichiosis, a disease of veterinary importance. The methods implemented for diagnosis are indirect (serology) or direct (blood smears and PCR), the objective of this study was to molecularly identify *Ehrlichia canis* in blood of dogs from Culiacan, Sinaloa, Mexico: regardless of age, sex, race or presence of signology referring to the disease; for which blood samples were collected from 168 dogs to which DNA was extracted using the phenol-chloroform technique, subsequently processed by PCR in order to amplify fragments of the 16S rRNA gene to identify *E. canis*; resulting in 17 samples that presented bands of approximately 480 bp. compatible for *Ehrlichia spp.*, representing 10.11% of the 168 samples processed, these 17 samples were analyzed by nested PCR for the specific gene of *Ehrlichia canis* yielding a result of 5 samples that presented bands of approximately 380 bp., representing 2.97% of the total samples processed. This study shows that *Ehrlichia canis* is present in the blood of dogs from the municipality of Culiacán, Sinaloa, Mexico.

Keywords: PCR, dogs, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia spp.*, 16S rRNA

I. INTRODUCCIÓN

En la familia *Rickettsiae* existe un grupo de bacterias intracelulares Gram negativas conocidas como *Ehrlichia* spp. que tomaron importancia en los últimos años al demostrarse su potencial zoonótico, presentan una distribución mundial y necesitan de un mamífero como reservorio y de un artrópodo como vector para mantener su ciclo natural, los principales vectores son las garrapatas pertenecientes al género *Ixodes* spp y *Rhipicephalus* spp ectoparásitos importantes de animales y humanos que causan daño mecánico a sus huéspedes y actúan como vector de transmisión de varios patógenos de importancia veterinaria (Carrillo *et al.*, 2012; Cabezas-Cruz *et al.*, 2019). *Ehrlichia canis* es una bacteria intracelular obligada de la familia *Anaplasmateceae* y del orden *Rickettsial* con especial tropismo por monocitos y macrófagos causante de la enfermedad Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC) transmitida por garrapatas ninfas y adultos del género *Rhipicephalus sanguineus*, es considerada la más común y severa forma de las ehrlichiosis caninas además se demostró en los últimos años como potencial zoonótico causante de la ehrlichiosis humana (Murphy *et al.*, 1998; Aguiar *et al.*, 2007; Nazari *et al.*, 2013; Sosa-Gutiérrez *et al.*, 2016). Las larvas no se consideran un vector de transmisión de la infección (Aguiar *et al.*, 2007). Los métodos de diagnóstico más utilizados en la actualidad son: la inmunofluorescencia indirecta (IFI), Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas y reacción en cadena de la polimerasa conocidas como ELISA y PCR respectivamente por sus siglas en inglés, dentro de estos el PCR es un método altamente sensible y específico, el cual ofrece hasta un 100 % de seguridad en el

diagnóstico (Carrillo *et al.*, 2012). Con esa premisa en México y alrededor del mundo se han realizado estudios para la identificación molecular de *E. canis* en sangre de perros y garrapatas amplificando una parte del gen 16S RNAr de la bacteria con iniciadores como ECC-ECB para *Ehrlichia* spp. Y HE3-ECAN para *E. canis* (Siarkou *et al.*, 2007; Nazari *et al.*, 2013; Pat-Nah *et al.*, 2015; Martínez *et al.*, 2015; Sosa-Gutiérrez *et al.*, 2016; Díaz-Medina *et al.* 2016; Malik *et al.*, 2018), el primer Ap-F1 y Ap-R1 se ha usado para obtener la longitud total de la secuencia 16S rRNA de *E. canis* para comparaciones de análisis de secuencia esperando una amplificación de 1.4 kb (Siarkou *et al.*, 2007), así como también se amplificaron los genes *trp36* (Almazán *et al.*, 2015) y *dsb* (Aguar *et al.*, 2013), y *el gro ESL*. Por las características descritas se considera que *Ehrlichia canis* está presente en sangre de perros de Culiacán, Sinaloa, México. El objetivo de este trabajo fue identificar molecularmente *Ehrlichia canis* en sangre de perros de Culiacán, Sinaloa, México.

II. ANTECEDENTES

2.1. Historia

Ehrlichia spp alguna vez referida como pancitopenia tropical canina fue descrita por primera vez en 1935 en Algeria inicialmente denominada como *Rickettsia canis*, más tarde fue renombrado en 1945 como *E. canis*, en honor al bacteriólogo Alemán Paul Ehrlich (Skotarczak, 2003; Dolz *et al.*, 2013), en 1963 fue reportada por primera vez en Estados Unidos como un patógeno de importancia veterinaria después de un brote en perros militares británicos en Singapur y en perros estadounidenses en Vietnam en 1963 donde murieron 200 perros aproximadamente (Mavromatis *et al.*, 2006), la primera descripción de una ehrlichiosis humana fue en el año de 1953 en Japón y se describió el primer aislado de *E. sennetsu* después renombrado como *Neorickettsia sennetsu*, en 1987 en Estados Unidos se detectó por primera vez la Ehrlichiosis monocítica humana causada (EMH) por *Ehrlichia chaffeensis*, en un inicio se describió como una cepa variante de *E. canis* sin embargo estudios posteriores revelaron su verdadera etiología, al ser aislada de un recluta de la Armada de Estados Unidos en Fort Chaffee, Arkansas (donde adquirió su nombre), mostrando una diferencia (1.8%) de la secuencia codificada al gen 16S RNAr, años más tarde se descubrió que también era capaz de infectar naturalmente a perros y coyotes en Estados Unidos (Skotarezak, 2003; Oteo y Brouqui, 2005; Dolz *et al.*, 2013). En 1971 fue descubierta *E. ewingii* agente etiológico de la ehrlichiosis granulocítica canina (EGC) o ehrlichiosis ewingii humana, causante de enfermedad en perros de Estados Unidos en 1971, pero fue hasta 1985 que se le consideró como una especie distinta, ya que inicialmente se pensó que era una cepa de *E. canis* menos virulenta, en 1999 se encontró de forma accidental en humanos de Estados Unidos, que presentaban síntomas de ehrlichiosis (Dolz *et al.*, 2013), en 1999 se reportó el primer caso de ehrlichiosis en México mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta en un hombre de 41 años de edad mostrando reacción positiva contra *E. chaffeensis*, en el cuadro 1 se presenta resumen de enfermedades Ehrlichiales y sus vectores (Gongora-Biachi *et al.*, 1999). En 2001 se llevó a cabo una reclasificación con base en el análisis filogenéticos de la secuencia de genes

16S RNAr y *gro ESL*, como resultado de esta reclasificación, en la familia Anaplasmataceae se incluyó el género *Ehrlichia*, *Wolbachia*, *Anaplasma* y *Neorickettsia*, y muchos organismos fueron renombrados, por ejemplo, *Ehrlichia phagocytophilum* y *Ehlichia platys* cambiaron a las especies *Anaplasma phagocytophilum* y *Anaplasma platys*, respectivamente, *Ehrlichia risticii* a *Neorickettsia risticii* y *Cowdria ruminantium* paso a ser *Ehrlichia ruminantium* (Cuadro 2) (Dumbler *et al.*, 2001; Allison y Little, 2013).

Cuadro 1.- Resumen de enfermedades Ehrlichiales y sus vectores (Allison y Little, 2013).

Espece	Nombre Común de la Enfermedad	Hospedero Natural	Células más Comúnmente Infectadas	Vector Primario	Distribución
<i>E. canis</i>	Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC)	Perros y otros miembros de la familia Canidae, Gatos y Humanos	Monocitos y Linfocitos	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> , <i>Dermacentor variabilis</i>	Alrededor del mundo, principalmente en climas tropicales y subtropicales
<i>E. chaffeensis</i>	Ehrlichiosis Monocítica Humana (EMH)	Humanos, Venados, Caballos, Roedores.	Monocitos y Macrófagos	<i>Amblyomma americanum</i> , <i>Dermacentor variabilis</i>	E.U., Europa, África, Sur y Centro América, Corea.
<i>E. ewingii</i>	Ehrlichiosis granulocítica canina (EGC), Ehrlichiosis granulocítica Humana (GH)	Perros y Humanos.	Principalmente Neutrófilos y Eosinófilos	<i>Amblyomma americanum</i> , <i>Otobius megnini</i>	E.U., África, Corea
<i>E. muris</i>	No asociado actualmente a enfermedad	Humanos y Roedores	Células Mononucleares	<i>Haemaphysalis</i> spp.	Japón
<i>E. ruminantium</i>	enfermedad de agua en el corazón	Rumiantes	Células Endoteliales	<i>Amblyomma</i> spp.	África, El caribe.

Cuadro 2.- Reclasificación de géneros de la familia Anaplasmataceae (Dumbler *et al.*, 2001).

Taxonomía	Clasificación
Orden	Rickettsiales
Familia	Anaplasmataceae
Género	<i>Anaplasma</i>
Especies	<i>A. marginale</i>
	<i>A. bovis</i>
	<i>A. ovis</i>
	<i>A. phagocytophilum</i>
	<i>A. platys</i>

2.2. Ehrlichia canis

Taxonómicamente *E. canis* pertenece al orden Rickettsiales (α - proteobacteria), es una bacteria de importancia veterinaria, transmitida por la garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus*, que reside como una microcolonia dentro de una vacuola intracelular revestida con una membrana, principalmente entre monocitos y macrófagos de hospederos mamíferos, este agente no crece en los medios de cultivos habituales y precisan para su crecimiento líneas celulares (Cuadro 3) (células promielocíticas HL-60 y precursores mielomonocíticos), se pueden poner de manifiesto en las células donde infectan, en una especie de agregados citoplasmáticos denominados mórulas (Figura 1), observadas mediante las tinciones de Wright y Giemsa (Oteo y Brouqui, 2005; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005; Mavromatis *et al.*, 2006). La secuencia de genoma completo de *E. canis* consiste en un cromosoma circular simple de 1,315,030 pb, se predice que codifica 925 proteínas, 40 especies de ARN estable, 17 supuestos pseudogenes y una proporción sustancial

de secuencia no codificante (27%), características interesantes del genoma incluyen un gran conjunto de proteínas con hélices transmembranal y/o secuencias señal y un sesgo único de serina-treonina se asocia con el potencial para la glicosilación O, es prominente en las proteínas asociadas con las interacciones patógeno-huésped, *E. canis* es el principal agente etiológico de la ehrlichiosis monocítica canina, tiene un ciclo de vida complejo involucra garrapatas, y es mantenido en la naturaleza por la infección persistente de los caninos salvajes y domésticos (Mavromatis *et al.*, 2006). Los primeros reportes de *E. canis* como potencial agente zoonótico datan de 1986, año en el que fue descrito el primer caso de infección humana en Estados Unidos (Maeda *et al.*, 1987), seguido por un reporte realizado en Venezuela en 2006 (Pérez *et al.*, 2006), Perú en 2008 y Lima metropolitana en 2013 (Barrios *et al.*, 2013). La identificación molecular ha sido basada en la identificación de el gen *16S ARNr* o el gen *trp36* en diversos estudios alrededor del mundo (Almazán *et al.*, 2015).

Organismo	Línea celular	Descripción
<i>E. canis</i>	DH28	Histiocito canino
	HMEC-1	Endotelial Humano
<i>E. chaffeensis</i>	DH28	Histiocito canino
	HMEC-1	Endotelial Humano
	Vero	Riñón de mono verde

Cuadro 3.- Líneas celulares reportadas para el cultivo de agentes rickettsiales (Alison)

		africano
	BGM	Riñón de mono verde
	L929	africano fibroblastos de ratón
<i>E. ewingii</i>		No reportado
<i>E. muris-</i> como agente	RF/6A	Retina coroidea de mono Rhesus
	ISE6	<i>Ixodes scapularis</i>

y Little, 2013).

2.3. Ehrlichiosis monocítica canina

Conocida como rickettsiosis canina, fiebre hemorrágica canina, enfermedad del perro rastreador, tifus de la garrapata canina y pancitopenia tropical canina, nombres que representan diferentes aspectos de una misma enfermedad (Waner y Harrus, 2000), la ehrlichiosis monocítica canina (EMC) es potencialmente fatal transmitida por garrapata, causada por el agente rickettsial *E. canis*. La patogénesis de la EMC mantiene un periodo de incubación de 8 a 20 días, seguido de una fase aguda, una subclínica y una crónica: la enfermedad aguda es caracterizada por una fiebre alta, depresión, letargia, anorexia, linfadenomegalia, esplenomegalia y tendencias hemorrágicas, por último, son exhibidos por petequias dérmicas, equimosis y epistaxis, lesiones oftalmológicas son frecuentes e incluyen uveítis interior, coriorenitis, papiledema, hemorragia retinal, presencia de infiltrados perivascuales retinianos. Puede ocurrir ceguera como resultado de hiperviscosidad sanguínea conduce a hemorragia o desprendimiento de retina. Manifestaciones neurológicas como resultado de meningitis o sangrado meníngeal pueden manifestarse en un amplio rango de signos neurológicos. Durante la fase subclínica, no hay signos clínicos evidentes por razones aún no claras, ciertos perros progresan a la fase crónica de la EMC. Durante la fase crónica, signos similares a los vistos en la fase aguda pueden ocurrir, pero con una severidad mayor. Membranas de mucosas

pálidas, debilidad, sangrados y significativa pérdida de peso son hallazgos comunes en esta fase. La mayoría de los casos de EMC son diagnosticados por signos clínicos y usando métodos serológicos tales como prueba de inmunofluorescencia, inmunoensayos de Westerns Blot y prueba de ELISA, así como pruebas moleculares como PCR y cultivo, en la última década la EMC ha sido investigada extensivamente para elucidar la patogenicidad de la enfermedad y obtener un mayor entendimiento de los mecanismos de la misma, esto para ayudar a los médicos en la comprensión de la enfermedad para que proporcionen un tratamiento adecuado y un mejor pronóstico a los pacientes (Harrus *et al.*, 1999; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005; Harrus y Warner, 2011; Nambooppha *et al.*, 2018). La enfermedad se caracteriza por una presentación clínica severa de hemorragias, trombocitopenia y algunos casos falla en la medula ósea, la enfermedad está distribuida mundialmente, pero la prevalencia es más alta en regiones subtropicales y tropicales donde el parásito y vector están presentes, México es considerado una región endémica para *E. canis*, causante de Ehrlichiosis monocítica canina (Díaz-Medina *et al.*, 2016).

2.3.1 Hallazgos hematológicos. La trombocitopenia es considerada la más común y consistente anomalía hematológica de perros natural o experimentalmente infectados con *E. canis*. y en EMC es atribuida a diversos mecanismos en los diferentes estados de la enfermedad. El mecanismo involucrado en la patogénesis de la trombocitopenia en la fase aguda de la enfermedad incluyen aumento en el consumo de plaquetas debido a cambios inflamatorios en el endotelio de los vasos sanguíneos aumentando el secuestro esplénico de plaquetas, o lesión que resulta en una vida de las plaquetas significativamente disminuida de una media de 9 a 4 días, presentada de 2 a 4 días después de la infección. Durante la fase subclínica, una leve trombocitopenia puede estar presente en la ausencia de hallazgos clínicos, en perros infectados experimentalmente, el conteo plaquetario se reduce tan bajo como 140 000/ μ L, leucocitos y eritrocitos, aunque estos cambios pueden ser relativamente leves y dificultan notarse en un entorno clínico, en la fase crónica la trombocitopenia es usualmente severa acompañada por una anemia y leucopenia, una pancitopenia

marcada debido a la hipoplasia de médula ósea que es un sello distintivo de la forma crónica severa (Harrus *et al.*, 1999; Harrus y Warner, 2011).

2.4. Vector

Las garrapatas son los arácnidos de mayor importancia económica y en salud pública, son ectoparásitos hematófagos obligados y algunos necesitan de uno a tres hospederos vertebrados para completar su ciclo de vida, mientras otras pueden parasitar varios hospederos al ser atraídas por el CO₂ y el calor corporal que emanan. Existen alrededor de 900 especies de garrapatas a nivel mundial clasificadas dentro del orden Ixoda, la cual se divide en tres familias: *Ixodidae*, *Agarosidae* y *Nuttalliellidae*. Son importantes tanto en la salud animal como humana debido a que pueden actuar en el mantenimiento y transmisión de muchos microorganismos patógenos como bacterias, helmintos, protozoos y virus que afectan animales domésticos y al humano (Estrada-Peña *et al.*, 2013; Rubio *et al.*, 2015). Aunque los patógenos transmitidos por las garrapatas se han mantenido estables en ciclos naturales involucrando garrapatas y animales (domésticos y/o salvajes), los humanos pueden servir como hospederos accidentales, en pocos años la distribución y abundancia de muchas especies de garrapatas han ido creciendo en caninos alrededor del mundo, resulta en un incremento de la prevalencia de enfermedades transmitidas por garrapatas en esta especie animal. *Rhipicephalus sanguineus (sensu lato)*, la garrapata marrón del perro es la especie más distribuida de la familia *Ixodidae* (Cabezas-Cruz *et al.*, 2019). En México se han registrado 100 especies de garrapatas de las familias *Ixodidae* (Castillo-Martínez *et al.*, 2016). Las cuales actúan como vectores biológicos de la *Ehrlichiosis*, siendo *R. sanguineus* el vector principal de *E. canis*, donde su transmisión en las garrapatas se da por vía transtadial pero no ocurre por vía transovárica (Estrada-Peña *et al.*, 2013; Cicuttin *et al.*, 2017), en otros estudios se logró experimentalmente la transmisión de la bacteria por *Dermacentor variabilis* (Dolz *et al.*, 2013), y en un estudio realizado por Sosa-Gutiérrez *et al.* (2016), encontraron garrapatas *D. variabilis* y *Haemaphysalis leporis-palustris* infectadas por *E. canis* presentándose como vectores potenciales de

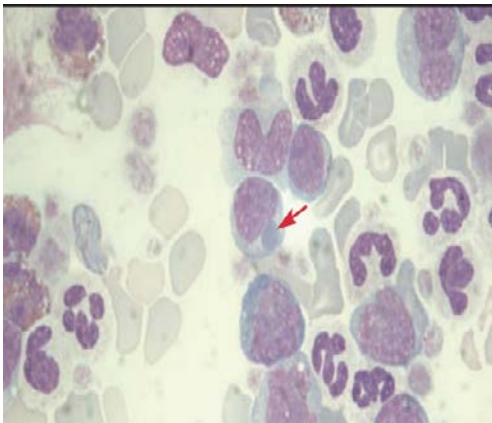
la bacteria en estas garrapatas respectivamente. En Sinaloa, México se describió la presencia de *R. sanguineus* en caninos (Rubio *et al.*, 2015).

2.5. Ciclo de vida

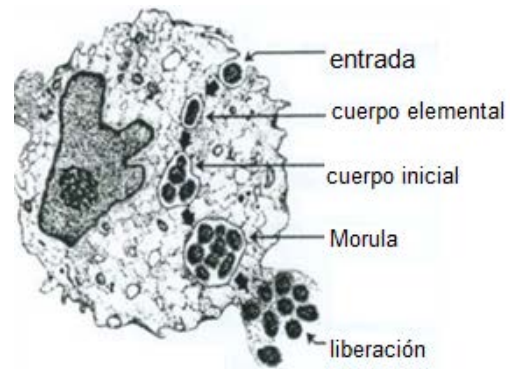
E. canis tiene un ciclo de vida complejo, involucra garrapatas y se mantiene en la naturaleza debido a la infección persistente de especies silvestres y domésticas (Mavromatis *et al.*, 2006), es transmitida por ninfas y adultas de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, transestadialmente cuando el patógeno es adquirido por una fase inmadura y transmitido por una fase de desarrollo posterior; e intraestadialmente, cuando en el mismo estadio de la garrapata adquiere y transmite el patógeno, las larvas no son importantes para la transmisión pues la transmisión transovárica en garrapatas no ha sido demostrada; en perros *E. canis* se desarrolla en monocitos y macrófagos causando una infección persistente y puede durar toda la vida, mientras en garrapatas la infección es localizada en intestino medio y glándulas salivales (Aguiar *et al.*, 2007; Fourie *et al.*, 2013; Almazán *et al.*, 2016). Diversos estudios comprobaron que la garrapata adulta puede sobrevivir desde 155 hasta 568 días sin alimentarse y que posee capacidad de transmitir el agente hasta 155 días post infección (Fourie *et al.*, 2013; Dolz *et al.*, 2013). La transmisión a los perros ocurre durante la alimentación de la garrapata, las bacterias ingresan a las células sanguíneas por fagocitosis, y se alojan en vacuolas, dentro de la célula huésped, las bacterias se desarrollan dentro de la vacuola rodeada de membrana plasmática celular, donde crean un nicho para la supervivencia y la reproducción. Los cuerpos elementales se transforman en unas formas intermedia IM1 y subsecuentemente pasa al cuerpo reticular o CR (0,4-0,6 μm de ancho por 0,7-1,9 μm de largo). La forma CR se multiplica por fisión binaria, incrementando en número y forman inclusiones citoplasmáticas inmaduras de 1,0 a 2,5 μm de diámetro, denominadas cuerpos iniciales; después se transforman en unas formas intermedias IM2 hasta formar las mórulas (vacuola con 20 a 40 cuerpos elementales), las cuales pueden observarse en el microscopio de luz óptico como inclusiones intracitoplasmáticas que son detectadas mediante diversas tinciones como

Romanoswki (generalmente la coloración rápida de Diff-Quik o Hemacolor), Wright y Giemsa, las mórulas pueden ser redondas o alargadas y miden aproximadamente de 4 a 6 μm de diámetro o también pueden ser ovaladas y son las formas características utilizadas para el diagnóstico microscópico, después de unos pocos días, los cuerpos elementales se liberan de la vacuola y quedan libres fuera de la célula para iniciar un nuevo ciclo infeccioso (Figura 2) (Dolz *et al.*, 2013; Sosa-Gutiérrez *et al.*, 2016). *E. canis* se replica dentro del vector, del intestino se pasa a las glándulas salivales transmitiéndola a un nuevo hospedador canino cuando la garrapata se alimenta nuevamente. Diversos estudios comprobaron que la garrapata adulta puede sobrevivir desde 155 hasta 568 días sin alimentarse y que posee capacidad de transmitir el agente hasta 155 días post infección (Fourie *et al.*, 2013; Dolz *et al.*, 2013). Los patógenos de la familia Anaplasmataceae poseen una gran variedad de proteínas de superficie que incluyen adhesinas e invasinas, las cuales participan en la adhesión y entrada a las células hospedadoras. El tiempo de transmisión no se ha establecido, se cree que ocurre entre las primeras 3-24 h

después de la fijación de la garrapata (Alison y



Little,



2013; Fourie *et al.*, 2013).

Figura 1.- Mórula de *Ehrlichia canis* observada en un monocito bajo microscopio (Straube, 2010).

Figura 2.- entrada, replicación (mórula) y salida de cuerpos elementales *Ehrlichia canis* de una célula infectada (McDade, 1990).

2.6. Patogénesis

La patogénesis de la EMC involucra efectos directos del patógeno y mecanismos secundarios indirectos de la respuesta inmune, la infección del perro ocurre cuando las garrapatas infectadas ingieren sangre y sus secreciones salivales contaminan el sitio donde se alimenta. La saliva de la garrapata contiene una variedad de moléculas anticoagulantes, antiinflamatorias e inmunoreguladoras que facilitan la adquisición y transmisión del patógeno (Gutiérrez *et al.*, 2016). Las larvas de *R. sanguineus* se infectan de manera transestadial al alimentarse de un perro rickettsémico, lo que permite se produzca la transmisión a otro perro cuando la garrapata se alimenta de nuevo como ninfa o adulto, en su etapa adulta también son capaces de transmitir *E. canis* de manera intraestadial, una ruta de transmisión importante en situaciones de brote, es causado por la movilidad que mantienen las garrapatas machos al moverse fácilmente entre los perros al momento de alimentarse y aparearse (Little, 2010). La bacteria entra y se multiplica en intestino medio y glándulas salivales, y estos transmiten el agente mientras se alimentan del perro (Aguiar *et al.*, 2007). En *E. chaffeensis* se ha observado que la invasina EtpE participa en la adhesión y entrada a las células de mamíferos. Esta proteína de membrana se une al glicosilfosfatidilinositol (GPI) unido a proteínas dentro de las vacuolas en la superficie celular del monocito. Se ha observado que después de la internalización *E. chaffeensis* queda contenida en vacuolas que se convierten en los endosomas tempranos expresando las proteínas Rab5A y el antígeno 1 endosomal temprano (EEA1), se acumula transferrina y el receptor de la transferrina (RTr), el cual durante el desarrollo del endosoma temprano contribuye a adquirir hierro de la célula hospedadora. En etapas más tardías desaparece EEA1, aparece Rab7, se

mantiene Rab5A, los RTr y faltan las proteínas lisosomales, indicando que las inclusiones se encuentran en las etapas finales del endosoma. Se ha demostrado en las células de la línea celular continua DH82 infectadas con *E. chaffeensis* que el endosoma tardío se caracteriza por poseer la proteína Rab7 y la vacuola está acidificada a pH 5,2. Esta acidificación puede ser necesaria para la supervivencia y replicación. Por lo tanto, *E. chaffeensis* es capaz de cambiar su membrana vacuolar para un desarrollo eficiente. Este proceso tiene como objetivo escapar de la fusión con los lisosomas (Gutiérrez *et al.*, 2016).

2.7. Respuesta inmunológica

La bacteria intracelular obligatoria como lo es *E. canis* ha desarrollado varios mecanismos que aseguran la evasión de la respuesta inmune del huésped, estos mecanismos abarcan adaptaciones para la supervivencia en diferentes compartimientos celulares. Los procesos de adhesión, internalización, proliferación, exocitosis y propagación intercelular de *Ehrlichia* spp con la participación de diferentes vías de señalización culminan con la adquisición de nutrientes, evasión lisosomal e inhibición de la apoptosis de la célula huésped, *E. canis* se replica en vacuolas rodeadas de membranas de la célula hospedera aisladas y protegidas del sistema inmune, los lisosomas y las especies reactivas del oxígeno (Gutiérrez *et al.*, 2016). Esto se considera que funciona como un mecanismo protector evadiendo el anticuerpo, que no puede entrar en la célula huésped. Se conoce poco sobre los mecanismos inmunes protectores de *E. canis*, sin embargo, se han estudiado otras *Ehrlichiae* estrechamente relacionadas como *E. risticii*, "*E. sennetsu* y "*C. ruminantium*, las *Ehrlichiae* son altamente específicas del hospedero, las respuestas inmunológicas entre estas "Ehrlichiae monocitófilas" parecen similares. El mecanismo primario, pero no exclusivo de inmunidad a las bacterias intracelulares obligadas es la respuesta inmune mediada por células y especialmente la respuesta de hipersensibilidad retardada. La muerte de las bacterias intracelulares por monocitos implica mecanismos dependientes de oxígeno e independientes. Se ha demostrado para *E. risticii* y *E. sennetsu*, que la supervivencia y la multiplicación en

la célula infectada se basa en su capacidad para inhibir la fusión del fagosoma-lisosoma *In Vitro*. El tratamiento de las células infectadas con doxiciclina, un antibiótico que inhibe la síntesis de proteínas procariotas, restablece la fusión del fagosoma-lisosoma probablemente al inhibir una proteína secretada por la bacteria y dificulta la fusión. Parece que la inmunidad inducida por células T y la secreción de INF- γ son los mecanismos predominantes para la recuperación e inmunidad a infecciones ehrlichiales, de hecho, esto es generalmente cierto para la mayoría de las bacterias intracelulares, sin embargo, las diferencias mecánicas entre diversas *Ehrlichiae* se han elucidado. La generación de óxido nítrico acompañado de la limitación del acceso al hierro es el mecanismo por el cual INF- γ inhibe *E. risticii* (Waner *et al.*, 2001). Los monocitos/macrófagos y neutrófilos expresan en su membrana receptores de reconocimiento de patrones como los receptores tipo Toll y en su citoplasma se encuentra el receptor dominio de oligomerización unido a nucleótido (NOD), estos receptores reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como el lipopolisacárido (LPS) y el peptidoglicano. Tales uniones provocan una respuesta por parte de la inmunidad innata de la célula, con la consecuente eliminación del patógeno, los hemocitos de las garrapatas también reconocen estos PAMPs y se activa la inmunidad innata de los vectores para eliminar los microorganismos. Estudios realizados con *E. chaffeensis* y *A. phagocytophilum* han demostrado a diferencia de *Rickettsia* spp y de la mayoría de las bacterias Gram negativas, les faltan los genes que codifican el LPS y el peptidoglicano de la pared celular, por lo tanto, estas bacterias deben incorporar el colesterol derivado de las membranas de las células huésped para garantizar la integridad de su membrana. La ventaja de no poseer LPS y peptidoglicano es que se inhibe la unión de estos ligandos a los receptores, por lo cual los leucocitos hospederos como los hemocitos de las garrapatas no se activan para eliminar al microorganismo. La pérdida de estos genes en *E. chaffeensis* y *A. phagocytophilum* facilita su adaptación a las células leucocíticas y las de la garrapata como vector (Gutiérrez *et al.*, 2016).

2.8. Diagnóstico

La infección con la *E. canis* generalmente se reconoce fácilmente por la presencia de piroplasmas en los frotis sanguíneos en sangre periférica, pero la mórula Ehrlichial suele ser difícil de detectar al afectar células mononucleares y debido al bajo número de bacterias, la sensibilidad aumenta durante la fase aguda de la enfermedad (2-3 semanas post infección), si no hay signos agudos, se considera la anorexia y la debilidad generalizada, junto con cambios hematológicos característicos pero inespecíficos, son sugestivos de ehrlichiosis (Allsopp y Allsopp, 2001; Allison y Little, 2013). Diferentes técnicas de diagnóstico incluyen métodos indirectos (serología) o directos (frotis sanguíneos y PCR) para diagnosticar la EMC (Cicuttin *et al.*, 2016). Las técnicas más utilizadas en la actualidad son: la inmunofluorescencia indirecta (IFI), ELISA y PCR, donde el ELISA y el frotis directo son los más comunes, sin embargo, el PCR al ser un método altamente sensible y específico ofrece hasta un 100 % de seguridad en el diagnóstico, por lo cual se considera el método más confiable (Carrillo *et al.*, 2012; Nazari *et al.*, 2013).

2.8.1. Frotis sanguíneo. *E. canis* no se tiñe con la tinción de Gram, aunque se puede poner de manifiesto en las células infectadas, una especie de agregados citoplasmáticos denominados “mórulas”, mediante las tinciones de Wright y Giemsa donde son observadas al examinar frotis sanguíneos por microscopía óptica en monocitos o granulocitos (Oteo y Brouqui, 2005; Beall *et al.*, 2012). Sin embargo, la evaluación de frotis sanguíneos por medio del microscopio es inespecífico y suficientemente sensible, debido a las bajas cantidades circulantes de bacterias detectadas en sangre (Allsopp y Allsopp, 2001; Romero *et al.*, 2011), en un estudio realizado por Romero *et al.* (2013) obtuvieron un 70.1% de sensibilidad y una especificidad del 51% para la prueba de frotis sanguíneo. En ocasiones, es posible encontrar inclusiones de material nuclear fagocitado que no está relacionadas con *Ehrlichia* y causan confusión en el diagnóstico (Cicuttin *et al.*, 2016). Por último, esta técnica no permite la diferenciación entre las diferentes especies de *Ehrlichia*, al tener una morfología idéntica y poseer tropismo por las mismas células (Dolz *et al.*, 2013). Así bien la búsqueda de la mórula es difícil, al consumir tiempo y ser exitosa

solamente en un 4% de los casos, sin embargo, este porcentaje se puede optimizar por la examinación de múltiples frotis de capa leucocitaria (Harrus y Waner, 2011).

2.8.2. Serología. Muchos métodos serológicos han sido desarrollados para el diagnóstico de EMC y se consideran valiosas herramientas de detección y/o diagnóstico (Oteo y Brouqui, 2005). Estas pruebas reflejan la cantidad de anticuerpos presentes en el suero y por lo tanto indica la exposición, pero no la severidad de la enfermedad y la duración de la infección. Además, los anticuerpos están ausentes durante las primeras dos semanas de inicio. Adicionalmente, anticuerpos contra muchos organismos Ehrlichiales suelen presentar una reacción cruzada con *E. canis* complicando el diagnóstico serológico, falsos negativos también ocurren comúnmente en las pruebas serológicas debido a la etapa temprana de la enfermedad y falta de anticuerpos los cuales pueden tener un mayor impacto en el diagnóstico final. Por otra parte, los resultados serológicos no discriminan entre las infecciones pasadas y actuales y una posible reacción cruzada con otra especie de *Ehrlichia* spp hace imposible un diagnóstico definitivo (Allsopp y Allsopp, 2001; Nazari *et al.*, 2013; Cicuttin *et al.*, 2016).

2.8.3. Inmunofluorescencia (IFA: Immunofluorescence Antibody Assay). La IFA es una técnica de laboratorio tradicional donde se utiliza tintes fluorescentes y se identifica la presencia de anticuerpos unidos a antígenos específicos. El IFA es muy útil en la detección de la respuesta serológica de un paciente expuesto a ciertos agentes infecciosos. Las dos clases de IFA son inmunofluorescencia directa e indirecta. La IFA directa usa un solo anticuerpo ligado a fluoróforo para la detección directa de antígeno. La IFA indirecta usa un anticuerpo primario el cual reconoce el antígeno, luego un anticuerpo ligado a un fluoróforo secundario y reconoce el anticuerpo primario unido. La preparación de antígeno usada en IFA puede ser células infectadas, una línea celular nativa, una sección de tejido o proteínas antigénicas recombinantes (Imugen, 2018). La prueba de inmunofluorescencia indirecta "IFA" es el método más utilizado para diagnosticar la infección por *E. canis* y se considera el "estándar de oro", sin embargo, solo se puede realizar en

laboratorios especializados, la lectura de los resultados es subjetiva, y no distingue consistentemente entre infecciones por *E. canis* y *E. chaffeensis* (Belanger *et al.*, 2002).

2.8.4. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). Se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan activada tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción (antígeno-anticuerpo) queda inmobilizada y será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico donde actúa la enzima y produce un cambio en el color que se observa a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro. Existen diferentes tipos de ELISAs: los de anticuerpos marcados, ELISA directo, indirecto, sándwich (Doble "DAS", Heterólogo "HADAS") y los de antígeno marcado, competitivo (Cultek, 2018). Las pruebas de ELISA, han llegado a ser populares y ser el punto de atención a comparación de las demás pruebas para detectar los anticuerpos de *E. canis*, los resultados obtenidos de estos kits son cualitativos y semicuantitativos; sin embargo, se pueden obtener rápidamente en el entorno clínico, los kits tienen la ventaja de un bajo costo relativo y proporcionan evidencia de la exposición a *E. canis*, que luego se asienta con un diagnóstico precoz con un mínimo de equipo y personal (Harrus *et al.*, 2007). En un estudio para calcular la seroprevalencia de *E. canis* en la ciudad de Yucatán (México) se trabajó con la técnica indirecta de ELISA, en el cual se indica que la prueba posee un 71% de sensibilidad y un 100% de especificidad (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005). En las pruebas comerciales de ELISA de punto (SNAP 4Dx) para diagnóstico de *E. canis* en la clínica detecta anticuerpos contra péptidos derivados de las principales proteínas inmunodominantes p30 y p30-1 de *E. canis*, en los ensayos de rendimiento, la sensibilidad y especificidad de la prueba SNAP 4Dx para anticuerpos contra la bacteria fueron de 97.8% y 92.3%, respectivamente (Stillman *et al.*, 2014). Se debe considerar que esta prueba solo detecta anticuerpos, lo que indica que el animal

estuvo en contacto con la enfermedad, más no que en el momento la presente (Chandrashekar *et al.*, 2010).

2.8.5. Cultivo. El cultivo celular se precisa como la forma de propagar y mantener fuera del organismo, en condiciones *In Vitro*, células de origen animal o vegetal; pueden formar monocapa o mantenerse en suspensión manteniendo sus funciones. Las líneas celulares son aquellas células diferenciadas genéticamente y morfológicamente de las estirpes de las que se derivaron, se mantienen en cultivos y pueden crecer de manera indefinida. La línea DH82 se deriva de un perro (*Canis lupus familiaris*) de raza labrador dorado (Golden retriever) de 10 años de edad con histiocitosis maligna y es utilizada para la multiplicación de *E. canis* y en su interacción con eritrocitos infectados con *Anaplasma marginale* (Machuca *et al.*, 2016). El aislamiento de *E. canis* mediante el cultivo celular, sigue siendo la prueba de oro para confirmar el diagnóstico; sin embargo, implica un proceso de incubación de varias semanas, requiere de laboratorios de seguridad grado 3 y personal especializado, es una técnica muy laboriosa y poco sensible (Allsopp y Allsopp, 2001; Dolz *et al.*, 2013). *E. canis* no crecen en los medios de cultivo habituales, y precisan para su crecimiento líneas celulares (células promielocíticas HL-60 y precursores mielomonocíticos) (Oteo y Brouqui, 2005).

2.8.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR: *polymerase chain reaction*). Es un método sensible para la detección de la ehrlichiosis monocítica canina en perros, de hecho, está diseñado para apuntar al organismo en sí mismo, lo cual hace a la PCR una técnica invaluable capaz de detectar rastros de patógeno incluso antes del inicio de los signos clínicos. Por lo tanto, las ventajas de la detección molecular de *E. canis* incluye diagnóstico antes del desarrollo de anticuerpos en tempranas etapas de la enfermedad e identificando nuevas especies y también especies estrechamente relacionadas de *Ehrlichia* usando oligonucleotidos específicos de especie y secuenciación (Nazari *et al.*, 2013). La técnica de PCR convencional está basada en la amplificación de regiones del gen 16S RNAr de *Ehrlichia*, también se emplea una técnica de PCR basada en la amplificación del gen *dsb* (gen Thio-Disulfido

Oxidoreductasa), el producto de las reacciones puede utilizarse para fines de secuenciación (Dolz *et al.*, 2013). Es por esto que el PCR se propone como un método altamente sensible y específico, que ofrece hasta un 100% de seguridad en el diagnóstico de esta enfermedad, por detectar y amplificar el ADN de *Ehrlichia* spp, tempranamente, de 4-10 días posinoculación, en pacientes infectados experimentalmente (Oteo y Brouqui, 2005).

2.8.7. Secuenciación de Genes. A pesar de la distribución mundial de *E. canis* y su importancia veterinaria, hay información limitada disponible sobre la diversidad genética y la filogenia de cepas de *E. canis* de áreas geográficamente distintas. Hasta la fecha, la mayoría de los estudios de epidemiología molecular de *E. canis* se han centrado en el gen *16S RNAr*, mientras que se sabe menos sobre los otros genes (Hsieh *et al.*, 2010). PCR y secuenciación son métodos sensibles para la detección y caracterización de ADN de *E. canis*. Pueden producirse resultados falsos positivos con temperaturas de recocido relativamente bajas, cuando hay contaminantes presentes o cuando ocurre una amplificación no específica, un resultado de PCR negativo indica que no se detectó el ADN de la bacteria, pero no prueba necesariamente que no haya ADN presente en la muestra (resultado falso negativo). La detección del ADN de *E. canis* puede lograrse tempranamente (4-10 días después de la inoculación), varios ensayos se basan en diferentes genes diana (por ejemplo, *16S RNAr*, *p28*, *p30*, *dsb*, *VirB9*), sin embargo, el *16S RNAr* y el *p30* basado en PCR son los más comúnmente utilizados. El ensayo de PCR anidada basado en *p30* demostró más sensible que el ensayo de PCR anidada basada en *16S RNAr*. El hecho de que *E. canis* contenga copias múltiples del gen *p30*, pero sólo una copia del gen *16S RNAr*, aumenta las posibilidades de detección cuando se elige *p30* (Harrus y Warner, 2011). A pesar de la distribución mundial de *E. canis*, la secuencia de gen *16S RNAr* son 99.4-100% idénticas entre aislamientos de Sur América, Norte América, Asia, Europa, África, y Medio Este. La cercana similitud entre los genes de *E. canis* *16S RNAr* provee poca información respecto a la diversidad general de este organismo y sugiere un alto nivel de conservación. La estrecha similitud entre genes de *E. canis* *16S RNAr* proporciona poca información

sobre la diversidad general de este organismo y sugiere un alto nivel de conservación, de forma similar, se ha encontrado que las proteínas inmunorreactivas que incluyen la familia *OMP-1*, *dsb*, *TRP19* y *TRP140* se conservan en cepas geográficamente dispersas. Sin embargo, se han informado diferencias en el gen *TRP36*, donde indican un cierto grado de diversidad de *E. canis* en la naturaleza, y los estudios han sugerido a *TRP36* para genotipificar cepas de *E. canis* basado en diferencias en el número o secuencias de repetición en tándem (Aguiar *et al.*, 2013). En México se han llevado a cabo estudios moleculares basados en diferentes genes como *TRP36* (Almazán *et al.*, 2015) y 16S RNAr (PAT-NAH *et al.*, 2015; Sosa-Gutiérrez *et al.*, 2016; Díaz-Medina *et al.*, 2016). Sosa-Gutiérrez *et al.* (2016), realizó un análisis filogenético mostrando que las secuencias 16S RNAr de *E. canis* aisladas de perros del estado de Sinaloa con signología clínica y garrapatas forman el tercer grupo que diverge de las secuencias de Sudamérica y EUA.

2.9. Antecedentes Directos

México es considerado una región endémica para la ehrlichiosis canina causada por *E. canis*, previos estudios epidemiológicos en México indicaron la seroprevalencia nacional de *E. canis* en perros de 33.1% (Núñez, 2003); en Yucatán, México, Rodríguez-vivas *et al.* (2005), encontró 44.1%, mientras en perros aparentemente sanos el 8.7% fue reportado en el mismo estado por Jiménez-Coello *et al.* (2009), también en Yucatán, México, Path-Nha *et al.* (2015), realizaron un diagnóstico molecular en perros y garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*, tomando un total de 50 perros colectando de 4 a 8 garrapatas machos y adultos, utilizaron los oligonucleótidos para la amplificación del gen específico de *E. canis* ECA y HE3, resultando un 45% positivos de sangre (18/50) y el 28.5% de las garrapatas (37/200). Sosa-Gutiérrez *et al.* (2016) realizaron un estudio en garrapatas y perros con manifestaciones clínicas sugestivas a *E. canis*, el estudio se basó en el diagnóstico mediante la técnica molecular PCR la bacteria amplificó una parte del gen 16S RNAr encontrando 25/139 (18%) perros positivos y 29/139 (20.86%) de garrapatas positivas, de los productos positivos llevó a cabo la secuenciación de 6 muestras (3

perro y 3 garrapata) para *E. canis*, muestras que amplificaron al gen 16S RNAr mostrando una homología de 99.8% a la secuencia de *E. canis* cepa Jake, *E. canis* VHE, *E. canis* VDE, y *E. canis* cepa Brazil-COI; al noroeste del país fue reportado un 74.5% (Sosa-Gutiérrez *et al.*, 2013). En el resto del mundo se publican trabajos similares como Murphy *et al.* (1998), que realizaron un estudio mediante las técnicas de PCR y una prueba de inmunofluorescencia de anticuerpos (FIAX) detectando la presencia de *E. canis* en perros y garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* en Oklahoma, teniendo como resultado de 65 perros muestreados (3.1%) positivos mediante PCR, uno resultó positivo a PCR anidado con los primer HE3 y EE52 y 6 (9.2%) resultaron seropositivos, a los positivos se les recolectaron las garrapatas y se les realizó en grupos la prueba de PCR utilizando los primer ECC y ECB (para *Ehrlichia* spp), dos grupos de estos fueron positivos. En otro estudio Aguiar *et al.* (2013), determinaron la prevalencia de *E. canis* en perros y garrapatas de Brasil mediante la técnica de PCR en este trabajo se tomaron muestras de sangre de 314 perros, y 4 poblaciones de garrapatas (con 54 grupos de garrapatas cada uno) de diferentes áreas de Brasil, para la amplificación usaron los primer *dsb-330* y *dsb-728* resultando un total de 98 perros y 20 grupos de garrapatas positivas. Brandao *et al.* (2019) en Brasil detectaron a *E. canis* por PCR anidado en 109 (39.4%) de las 276 muestras de perros. En Pakistán Malik *et al.* (2018), realizaron un estudio en un total de 151 muestras de sangre de canino para encontrar algún tipo de factor asociado a *E. canis*, tomando en cuenta sitio de la toma de muestra, edad, sexo, raza, temperatura corporal, vacunaciones, estado de la membrana mucosa, estado de hidratación, presencia de hematuria e infestación de garrapatas, el análisis fue llevado a cabo mediante la técnica de PCR con la utilización de los oligonucleótidos ECA-HE3, obteniendo como resultado una amplificación de 42 muestras (28%) de una parte del gen 16S RNAr de *E. canis* .

III. HIPÓTESIS

Ehrlichia canis está presente en sangre de perros de Culiacán, Sinaloa, México.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general: Identificar molecularmente *Ehrlichia canis* en sangre de perros de Culiacán, Sinaloa, México.

Objetivos específicos:

1. Identificar *Ehrlichia* spp con oligonucleótidos ECC y ECB por PCR.
2. Identificar *Ehrlichia canis* con los oligonucleótidos ECAN5 y HE3 por PCR anidado.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se consideró un estudio observacional, transversal por conveniencia con base a lo descrito por Manterola y Otzen (2014), obteniéndose sangre de 168 perros de la ciudad de Culiacán, Sinaloa, México; las muestras se procesaron en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa (FMVZ-UAS), ubicado en la ciudad de Culiacán, Sinaloa, México, localizada entre los paralelos 24° 2' 4.92" y 25° 16' 33.6" latitud norte y los meridianos 107° 49' 22.8" y 106° 52' 15.6" longitud oeste; altitud entre 2,100 m., con rango de temperatura de 18-26°C y rango de precipitación de 400-1100 mm., con clima seco muy cálido y cálido (37.40%), semiseco muy cálido y cálido (31.96%), cálido subhúmedo con lluvias en verano de humedad media (29.11%), cálido subhúmedo con lluvias en verano de menor humedad (1.49%), y semicálido subhúmedo con lluvias en verano de menor humedad (0.04%), (INEGI, 2019).

5.1. Toma de Muestras

La colección de muestras se realizó durante el año 2017, con énfasis en los meses de mayor prevalencia del vector (marzo-septiembre) de Clínicas veterinarias, laboratorio de parasitología FMVZ-UAS y mascotas de casas, considerando perros de cualquier raza, sexo y edad con signos clínicos sugestivos a Ehrlichiosis, y/o con presencia de garrapatas, rechazando muestras hemolisadas, conservadas inconvenientemente, sin identificación o con datos incompletos y menores de 3ml. Se obtuvieron 168 muestras de sangre completa por punción de la vena cefálica, de la extremidad anterior o de la vena safena de la extremidad posterior y/o de la yugular de los perros, colectando de cada uno 3 ml de sangre en tubos con anticoagulante (EDTA), cada tubo se rotuló con el nombre y/o número de cada animal muestreado. Las muestras se colocaron en un contenedor a 4°C y se transportaron al Laboratorio de Parasitología de la FMVZ-UAS, donde se mantuvieron refrigeradas a 4°C, hasta su procesamiento.

5.2. Extracción de ADN

De cada muestra se obtuvo el ADN mediante la técnica fenol-cloroformo, colocando 300 µl de sangre completa de perro en tubos eppendorf de 1.5 mL, se agregó amortiguador de lisis (TE: tris 100 mM y EDTA 10 mM), dodecilsulfato de sodio (SDS) al 20%, se incubó a 37°C con calor seco y a 56°C con calor húmedo por una hora respectivamente, posteriormente se agregó fenol (1:1), se centrifugó por 2 min a 12000 RPM, se obtuvo el sobrenadante y se añadió cloroformo (1:1), nuevamente se centrifugó por 2 min a 12000 RPM, se obtuvo un sobrenadante y se añadió etanol absoluto (1000 µl), se refrigeró por 20 min a -80°C. Después se centrifugó por 20 min a 12000 RPM y se decantó; a cada pastilla obtenida se agregó 50 µl de agua inyectable estéril. El ADN obtenido se observó en un gel de agarosa al 1% teñido con Gelred® (Biotium inc. Hayward, CA 94545 USA), sometido a una diferencia de potencial por medio de una cámara de electroforesis a 80 volts, 250 mA durante 30 min observado con luz ultravioleta (Huang *et al.*, 2010; Sambrook *et al.*, 1989).

5.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez obtenido el ADN de cada muestra, y con el fin de detectar el género *Ehrlichia*, se procedió a la amplificación del fragmento de 480 pb del gen 16S RNAr de *Ehrlichia* spp., mediante PCR usando los oligonucleótidos “ECC”: 5´ AGA ACG AAC GCT GGC GGC AAG CC 3´ y “ECB”: 5´ CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC 3´ (Rojas-Triviño *et al.*, 2013), empleando una mezcla de reacción a 25 µl (12.5 µl PCR Master Mix, 2 µl de cada oligonucleótido 8.5 µl de ADN) llevada a cabo en un termociclador (T100™ Thermo cycler, Bio Rad Laboratories) bajo las siguientes condiciones de reacción: desnaturalización a 94°C por 1 min, seguida por 30 ciclos de alineación a 55°C por 2 min y la extensión a 72°C por 2 min. Para la detección de la especie, se tomaron las muestras que resultaron positivas al género *Ehrlichia* spp y procedió a la amplificación del fragmento de aproximadamente 380 pb del gen 16S RNAr de *Ehrlichia canis*, mediante PCR anidado, los oligonucleótidos utilizados fueron ECAN5 (5'-CAA TTA TTT ATA GCC TCT GGC TAT AGG A 3') y HE3 (5'-TAT AGG TAC CGT CAT TAT CTT CCC TAT 3'), (Rojas-treviño *et al.*, 2013) con una

mezcla de reacción a 25 µl (12.5 µl PCR Master Mix, 2 µl de cada oligonucleótido y 8.5 µl de ADN llevada a cabo en el termociclador en dos fases, la primera consistió en 3 ciclos donde la desnaturalización fue a 94°C por 1 min, la alineación a 55°C por 2 min y la extensión a 72°C por 1.5 min, y la segunda fase en 37 ciclos donde la desnaturalización fue a 94°C por 1 min, la alineación a 55°C por 2 min y la extensión a 72°C por 2 min, basados en trabajos previos (Murphy *et al.*, 1998; Pat-Nah *et al.*, 2015; y Díaz-Medina *et al.*, 2016). Los productos obtenidos de ambas reacciones fueron procesados por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™ (Biotium inc. Hayward, CA 94545 USA.), para observar el tamaño del fragmento amplificado a 480-pb y 380-pb aproximadamente para *Ehrlichia* spp y *E. canis* respectivamente en cada corrida electroforética se incluyeron 10 µL del producto de PCR de cada muestra, los correspondientes controles positivos y un marcador de tamaño de 1kb. Los geles fueron observados en un transiluminador de luz ultravioleta (UV) a 340 nm, para identificar las bandas de ADN compatibles en tamaño con el fragmento de los genes en estudio (Murphy *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2010; Rojas-Triviño *et al.*, 2013).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 168 muestras de sangre de perro colectadas, se obtuvo ADN integro de cada una de ellas, mismos que se utilizaron en una primer etapa para la amplificación de *Ehrlichia* spp mediante PCR, observándose 17 muestras que presentaron bandas de aproximadamente 480 pb. (Figura 3), representando el 10.11% de las 168 muestras procesadas; este resultado tiene gran similitud con Carrillo *et al.*, (2012) en un estudio sobre la implementación del PCR para el diagnóstico de *Ehrlichia* spp., en muestras de sangre de perros sospechosos provenientes de consultorios veterinarios de la ciudad de Medellín, donde tomaron 90 muestras, 33 de animales sospechosos de ehrlichiosis por signología, y 57 de animales sanos como probables negativos, utilizaron los primers EEC y ECB y lograron amplificar la banda de 500 pb correspondientes al gen 16S ARNr de *Ehrlichia* spp., en 11 muestras de los animales sospechosos representando el 12.22 % del total de las 90 muestras obtenidas, confirmando la presencia de la bacteria en los animales; así mismo Sosa *et al.*, (2016) confirmo la presencia de *Ehrlichia* spp en 27.52 % (41/139) de perros con manifestaciones sugestivas e infestados por garrapatas, muestreados en perreras municipales de ciudades del norte, centro y sur de Sinaloa con diferencia en amplificación de bandas de 400 pb.

En la segunda etapa; las 17 muestras que amplificaron para *Ehrlichia* spp se procesaron por PCR anidado para amplificar una parte del gen 16S RNAr de *E. canis* observándose 5 muestras con una banda de alrededor de aproximadamente 380 pb (Figura 3) representando el 2.97 % del total de las 168 muestras procesadas, y el 29.41% de las muestras positivas a género *Ehrlichia* spp., resultado muy similar a otros trabajos respecto al tamaño de las bandas amplificadas, como el descrito por PAT-NAH *et al.*, (2015), en estudio realizado en Mérida Yucatán, donde colectaron sangre de 50 perros que procesaron por PCR anidado, de las cuales 18 (36%) amplificaron fragmentos de 379 pb del gen 16S rRNA de *E. canis*; semejante también a lo descrito por Sosa-Gutiérrez *et al.* (2016) con una ligera variante al obtener 25 (17.98%) muestras positivas de *E. canis* de 139 perros muestreados mostrando una amplificación de banda de 389 pb.; concuerda también con lo descrito

por Brandao *et al.* (2019) en Brasil donde obtuvieron sangre de 276 perros, y usaron los iniciadores ECC y ECB para género y HE y ECA para especie logrando amplificación de bandas de 389 pb para *E. canis* por PCR anidado en 109 (39.4%) de las 276 muestras procesadas. Así mismo tiene similitud con el estudio realizado en Pakistán por Malik *et al.* (2018), con un total de 151 muestras de sangre de canino para encontrar algún tipo de factor asociado a *E. canis*, tomando en cuenta sitio de la toma de muestra, edad, sexo, raza, temperatura corporal, vacunaciones, estado de la membrana mucosa, estado de hidratación, presencia de hematuria e infestación de garrapatas, el análisis fue llevado a cabo mediante la técnica de PCR con la utilización de los oligonucleótidos ECA-HE3, obteniendo como resultado una amplificación de 42 muestras (28%) de una parte del gen 16S RNAr de *E. canis* de un tamaño de 400pb.

Respecto a la prevalencia en la detección molecular de *E. canis* el porcentaje de 2.97 de este trabajo, se asemeja con lo reportado por Nazari *et al.* (2013), que obtuvieron una prevalencia del 2% en perros de clínicas veterinarias y de refugios de Malasia. Este resultado difiere con otros estudios similares en sangre de perros mediante PCR con segmento del gen 16S RNAr como los descritos por Path-Nha *et al.* (2015), en Yucatán, México, con 50 perros, donde utilizaron los oligonucleótidos para la amplificación del gen específico de *E. canis* ECA y HE3, resultando un 45% positivos (18/50). Sosa-Gutiérrez *et al.* (2016) en Sinaloa, México encontraron 25/139 (18%) perros positivos de los productos positivos llevó a cabo la secuenciación de 3 muestras para *E. canis*, muestras que amplificaron al gen 16S RNAr mostrando una homología de 99.8% a la secuencia de *E. canis* cepa Jake, *E. canis* VHE, *E. canis* VDE, y *E. canis* cepa Brazil-COI; y al noroeste del país fue reportado un 74.5% (Sosa-Gutiérrez *et al.*, 2013). Esta baja prevalencia molecular en un país tropical, según Nazari *et al.* (2013) se debe a que la infección se encontraba en etapa subclínica o crónica o que las garrapatas de la zona no estaban lo suficientemente infectadas).

Por otra parte de acuerdo con Martínez *et al.* (2015), las diferencias encontradas entre las muestras positivas a género y negativas a las especies de *E. canis*, probablemente se deban a que los iniciadores usados en la PCR de género

(ECC/ECB) amplifican, además, a otras especies, lo que podría indicar infección por otras especies de *Ehrlichia* (*E. ewingii* u otras), otras especies de la familia Anaplasmataceae (*A. platys*, *A. phagocytophilum*) e incluso por *Rickettsia rickettsii*.

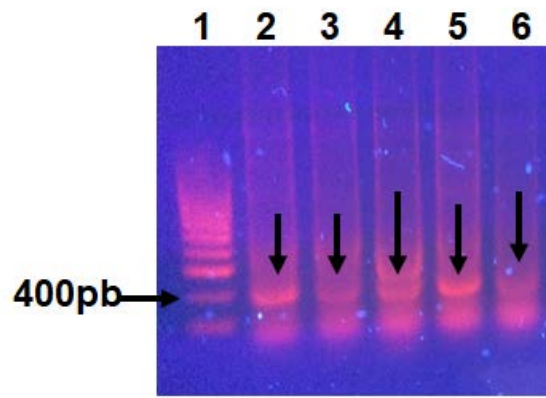


Figura 3. Amplicón de aproximadamente 380 pb de *E. canis* en perros, carriles 2-6. Marcador de tamaño de 100 pb situado en el carril 1.

VII. CONCLUSIONES

Se identificó molecularmente a *Ehrlichia canis* en sangre de perros de Culiacán, Sinaloa, México; mediante PCR anidado, representando un riesgo de infección entre perros, situación favorecida por las condiciones medioambientales de la ciudad que propician la presencia del principal vector, la garrapata *R. sanguineus*, con lo que se incrementa el potencial zoonótico por la estrecha relación de los humanos y los perros; su identificación fortalece la información de este indicador epidemiológico y puede incidir en el control del vector, así como de la infección en perros y con ello reducir el riesgo de transmisión de esta bacteria entre perros y humanos

VIII. LITERATURA CITADA

- Aguiar D. M., Cavalcante G. T., Pinter A., Gennari S. M., Camargo L. M., y Labruna M. B. 2007. Prevalence of *E. canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. *J Med Entomol*, 44(1):126-132. doi:10.1603/0022-2585(2007)44[126:poecra]2.0.co;2
- Aguiar D.M, Zhang X., Melo A.L.T., Pacheco T.A., Meneses A.M.C., Zanutto M.S., Horta M.C., Santarém V.A., Camargo L.M.A., McBride J.M., Labruna M.B. 2013. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in Brazil. *Veterinary Microbiology* 164: 315-321. doi:10.1016/j.vetmic.2013.02.015
- Allison R.W, Little S.E. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. *Vet Clin Pathol*. 2013 Jun; 42(2):128-44. doi:10.1111/vcp.12040
- Allsopp M.T.E.P. y Allsopp B.A., 2001. Novel *Ehrlichia* Genotype Detected in Dogs in South Africa, *Journal of Clinical microbiology*, p 4204-4207. doi:10.1128/jcm.39.11.4204-4207.2001
- Almazan C, González-alvarez V.H., Fernandez de Mera I.G., Cabezas-Cruz A., Rodríguez-Martinez R., de la Fuente J. 2015. Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. *Ticks and Tick-borne Diseases* ;7(2):276-83.
- Oteo A., J., y Brouqui, P. 2005. *Ehrlichiosis y anaplasmosis humana*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(6), 375–380. doi:10.1157/13076178
- Barrios A. L., Lí, E. O., Suárez A. F., Manchego S. A., Hoyos S. L. 2013. Evidencia hematológica y serológica de *Ehrlichia canis* en propietarios de caninos domésticos con antecedentes de Ehrlichiosis en Lima Metropolitana. *Rev. Inv. Vet. Peru*, 24 (1): 64-71.
- Beall M. J., Alleman A. R., Breitschwerdt E. B., Cohn L. A., Couto C. G., Dryden M. W., Yabsley M. J. 2012. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in dogs in North America. *Parasit Vectors*, 5: 29. doi:10.1186/1756-3305-5-29
- Belanger, M., Sorenson, H. L., France, M. K., Bowie, M. V., Barbet, A. F., Breitschwerdt, E. B., & Alleman, A. R. 2002. Comparison of Serological Detection Methods for Diagnosis of *Ehrlichia canis* Infections in Dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9), 3506–3508. doi:10.1128/jcm.40.9.3506-3508.2002

- Brandao, Verucia Maria Dias, Barrozo, Pedro Henrique Marques, Sousa, Luciane Oeiras, Santos, Rafaelle Cunha dos, Schwanke, Katiane, Sampaio Junior, Francisco Dantas, Prado, Welton Seabra, Amaral, Alessandra Scofield, & Cavalcante, Gustavo Góes. 2019. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs from municipality of Belém, State of Pará, Brazil. *Ciência Rural*, 49(12), e20190414. Epub November 04, 2019. <https://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20190414>.
- Cabezas-Cruz, A., Allain, E., Ahmad, A. S., Saeed, M. A., Rashid, I., Ashraf, K., ... Moutailler, S. 2019. Low genetic diversity of *Ehrlichia canis* associated with high co-infection rates in *Rhipicephalus sanguineus* (s.l.). *Parasites & Vectors*, 12(1). doi:10.1186/s13071-018-3194-9
- Carrillo B.L.M., Cardona, S.B., Cardona D.R., Pérez J.J.E., Galeano R.D., Loaiza E.E.T., Giraldo E.C.A. 2012. Implementación de un método basado en PCR, para el diagnóstico de *Ehrlichia* spp., en caninos de Medellín (Colombia). *Ces. Med. Vet. Zootec.* 7(2):38-46. ISSN 1900-9607. Recuperado el 21 de Mayo de 2019, desde http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1900-96072012000200005&lng=en&tlng=.
- Castillo-Martinez A., Cueto-Medina S.M, Hernández-Rodríguez s., Valdés-Perezgasga M.T., Ortega-Morales A.I. 2016. GARRAPATAS PERIDOMÉSTICS (ACARI: IXODIDAE, ARGASIDA) DE MATAMOROS, COAHUILA, MÉXICO. *Entomología Mexicana*. 2:47-51. ISSN 2448-475X. Recuperado el 21 de Mayo de 2019, desde https://www.researchgate.net/publication/305778274_GARRAPATAS_ACARI_IXODIDAE_ARGASIDAE_DE_LA_COMARCA_LAGUNERA_EN_DURANGO_MEXICO_Ticks_Acari_Ixodidae_Argasidae_in_Lagunera_Region_in_Durango_State_Mexico
- Chandrashekar, R., Mainville, C. A., Beall, M. J., O'Connor, T., Eberts, M. D., Alleman, A. R., Breitschwerdt, E. B. (2010). Performance of a commercially available in-clinic ELISA for the detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 71(12), 1443–1450. doi:10.2460/ajvr.71.12.1443
- Cicuttin, G.L., De Salvo, M.N., y Gury Dohmen, F.E. 2016. Molecular characterization of *Ehrlichia canis* infecting dogs, Buenos Aires. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(5), 954–957. doi:10.1016/j.ttbdis.2016.04.017
- Cicuttin GL, De Salvo MN, Silva DA, Brito M, Nava S. 2017. *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato del linaje templado (Acari: Ixodidae), provincia de Buenos Aires,

- Argentina. Revista FAVE. 16:93-96. doi: <https://doi.org/10.14409/favecv.v16i2.6910>
- Cultek,2018.www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf , Fundamentos y Tipos de ELISAs. , ingresado el día 12 de marzo de 2018.
- Diaz-Medina, O.C. 2016. Estudio molecular de *Ehrlichia canis* en perros de México: prevalencia de infección y posibles factores asociados. Ecosistemas y recur. agropecuarios [online]. 2016, vol.3 (8):251-257. ISSN 2007-901X.
- Dolz G., Ábrego L., Romero L. E., Campos-Calderón L., Bouza-Mora, L., Jiménez-Rocha Ana E. 2013. Ehrlichiosis y anaplasmosis en Costa Rica (Ehrlichiosis and anaplasmosis in Costa Rica). IV Congreso latinoamericano de enfermedades rickettsiales. suppl.1, pp. 34-40. ISSN 0001-6012. Recuperado el 21 de mayo de 2019 desde http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022013000400008&lng=en.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51(Pt 6):2145-2165. doi:10.1099/00207713-51-6-2145
- Estrada-Peña A, Gray JS, Kahl O, Lane RS, Nijhof AM. 2013. Research on the ecology of ticks and tick-borne pathogens-methodological principles and caveats. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 3:1-12. doi: 10.3389/fcimb.2013.00029.
- Fourie, J. J., Luus, H. G., Stanneck, D., & Jongejan, F. 2013. The efficacy of Advantix® to prevent transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Parasite*. 20:36. doi:10.1051/parasite/2013037
- Gongóra-Biachi, R. A., Zavala-Velázquez, J., Castro-Sansores, C. J., & González-Martínez, P. 1999. First Case of Human Ehrlichiosis in Mexico. *Emerging Infectious Diseases*. 5(3):481–481. doi:10.3201/eid0503.990327
- Gutiérrez C.N., Pérez-Ybarra L., Agrela I.F. 2016. Ehrlichiosis canina. *Saber*, Universidad de Oriente, Venezuela. 28(4):641-665. ISSN: 1315-0162. Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=427751143001>
- Harrus S, Waner T, Neer M. 2007: *Ehrlichia* and *Anaplasma* infections. En: *Infectious diseases of the dog and cat*. 26, Cuarta edición, 227-238, ELSEVIER, Georgia EE. UU. ISBN: 978-1-4160-6130-4.

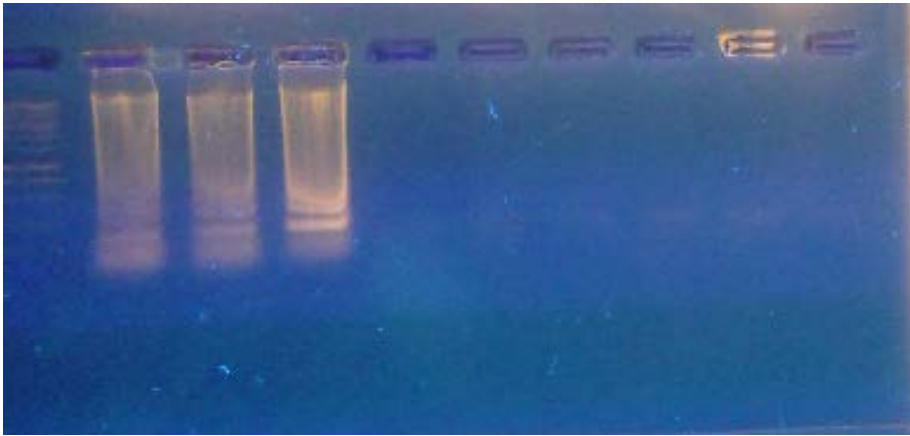
- Harrus S., Waner T., Bark H., Jongejan F., Cornelissen A.W.C.A. 1999. Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis, *Journal of clinical microbiology*, p. 2745–2749. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10449445>.
- Harrus, S., & Waner, T. 2011. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *The Veterinary Journal*. 187(3):292–296. doi:10.1016/j.tvjl.2010.02.001
- Hsieh, Y.-C., Lee, C.-C., Tsang, C.-L., & Chung, Y.-T. 2010. Detection and characterization of four novel genotypes of *Ehrlichia canis* from dogs. *Veterinary Microbiology*, 146(1-2), 70–75. doi:10.1016/j.vetmic.2010.04.013
- Huang, Q., Baum, L., & Fu, W. L. 2010. Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis. *Clinical Laboratory Journal For Clinical Laboratories And Laboratories Related*. 56(3):149. PMID:20476647
- Imugen, 2018, <http://www.imugen.com/test-methods/fluorescent-antibody/> IFA. (Immunofluorescence Antibody Assay), ingresado el 12 de marzo de 2018.
- INEGI. 2019. Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática. Gobierno de México. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos, Sinaloa. <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/>. (Consulta: dic 2019).
- Jiménez-Coello, M., Pérez-Osorio, C., Vado-Solís, I., Rodríguez-Buenfil, J. C., & Ortega-Pacheco, A. 2009. Serological Survey of *Ehrlichia canis* in Stray Dogs from Yucatan, Mexico, Using Two Different Diagnostic Tests. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 9(2):209–212. doi:10.1089/vbz.2008.0039
- Little, S.E. 2010. Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 40(6):1121–1140. doi:10.1016/j.cvsm.2010.07.004
- Machuca F.S., Grajeno C.G., Rodríguez C.S.D., Vega C.A., Murgía. 2016. Propiedades de crecimiento de las líneas celulares DH82 y RF/6A bajo condiciones normales de laboratorio. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*. 7(1):85-104. Recuperado en 21 de mayo de 2019, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242016000100085&lng=es&tlng=es.
- Maeda, K., Markowitz, N., Hawley, R. C., Ristic, M., Cox, D., & McDade, J. E. (1987). *Human Infection with Ehrlichia canis, a Leukocytic Rickettsia*. *New England Journal of Medicine*, 316(14), 853–856. doi:10.1056/nejm198704023161406

- Malik, M. I., Qamar, M., Ain, Q., Hussain, M. F., Dahmani, M., Ayaz, M., Mahmood, A. K., Davoust, B., Shaikh, R. S., Iqbal, F. 2018. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in dogs from three districts in Punjab (Pakistan). *Veterinary medicine and science*. 4(2):126-132. doi:10.1002/vms3.94
- Manterola C., Otzen T., 2014. Estudios observacionales. Los diseños utilizados con mayor frecuencia en investigación clínica. *Int. J. Morphol.* 32 (2):634-345.
- Martínez A, María del Carmen, Arraga-Alvarado, Cruz María, Triana-Alonso, Francisco Javier, Ruiz C, Johanny Alejandra, & Gutiérrez G, Clara Nancy. (2015). Estudio serológico y molecular de *Ehrlichia canis* en perros de una comunidad del estado Aragua, Venezuela. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(4), 648-656. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i4.11220>.
- Mavromatis, K., Doyle, C. K., Lykidis, A., Ivanova, N., Francino, M. P., Chain, P., Kyrpides, N. C. 2006. The Genome of the Obligately Intracellular Bacterium *Ehrlichia canis* Reveals Themes of Complex Membrane Structure and Immune Evasion Strategies. *Journal of Bacteriology*. 188(11):4015-4023. doi:10.1128/jb.01837-05
- McDade J.E., 1990. Ehrlichiosis: A Disease of Animals and Humans. *The Journal of Infectious Diseases*. 161(4):609-617. doi:10.1093/infdis/161.4.609
- Murphy, G. L., Ewing, S., 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(4):325–339. doi:10.1016/s0304-4017(98)00179-4
- Nambooppha, B., Rittipornlertrak, A., Tattiyapong, M., Tangtrongsup, S., Tiwananthagorn, S., Chung, Y.-T., & Sthitmatee, N. 2018. Two different genogroups of *Ehrlichia canis* from dogs in Thailand using immunodominant protein genes. *Infection, Genetics and Evolution*. 63:116–125. doi:10.1016/j.meegid.2018.05.027
- Nazari, M., Lim, S. Y., Watanabe, M., Sharma, R. S. K., Cheng, N. A. B. Y., & Watanabe, M. 2013. Molecular Detection of *Ehrlichia canis* in Dogs in Malaysia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 7(1):e1982. doi:10.1371/journal.pntd.0001982
- Núñez Ochoa, L. 2003. Estudio de la seroprevalencia de *Ehrlichia canis* en México. *Revista AMMVEPE* vol. 14 (3): 83-85.
- Pat-Nah, H., Rodriguez-Vivas, R. I., Bolio-Gonzalez, M. E., Villegas-Perez, S. L., & Reyes-Novelo, E. 2015. Molecular Diagnosis of *Ehrlichia canis* in Dogs and

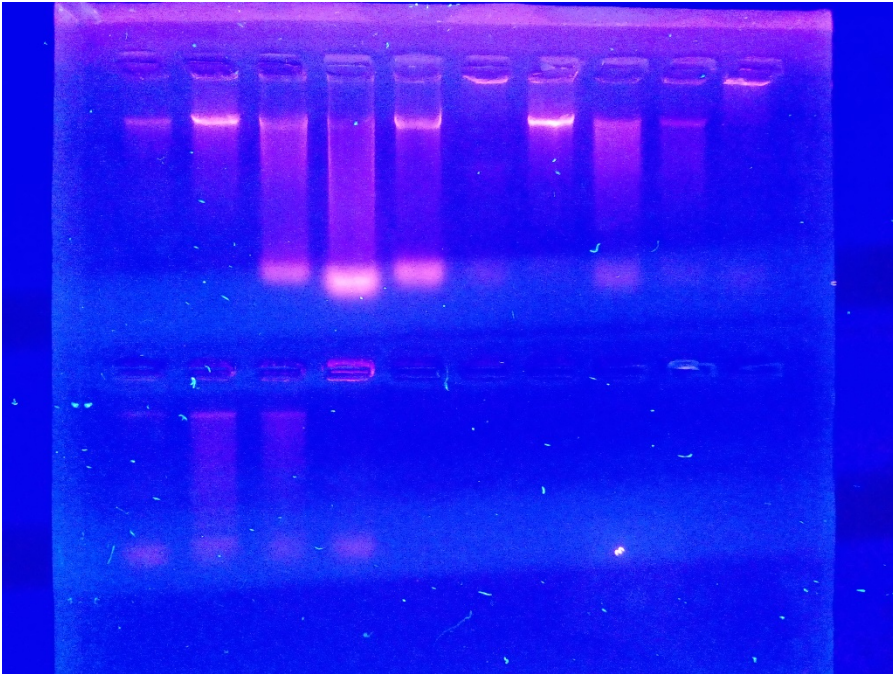
- Ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Yucatan, Mexico. Journal of Medical Entomology. 52(1):101–104. doi:10.1093/jme/tju010
- Perez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q., & Rikihisa, Y. 2006. Human Infection with *Ehrlichia Canis* Accompanied by Clinical Signs in Venezuela. Annals of the New York Academy of Sciences. 1078(1):110–117. doi:10.1196/annals.1374.016
- Rodríguez-Vivas, R. I., Albornoz, R. E. F., & Bolio, G. M. E. 2005. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. Vet Parasit. 127(1):75–79. doi:10.1016/j.vetpar.2004.08.02
- Rojas-Triviño A., Rueda-Hurtado A., Diaz Molano D.M., Mesa-Cobo N.C., Benavides-Montaño J.A., Imbachi-López K., Álvarez-Rios L., López-Bermudez R. 2013. Identificación de *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard) Moshokovski mediante PCR anidada. Veterinaria y Zootecnia. 7: 1
- Romero LE, Dolz G, Romero JJ, Meneses A, Jiménez M, Salazar L. 2013. Evaluación del diagnóstico de *Ehrlichia canis* mediante frotis sanguíneo y técnica molecular en perros de Costa Rica. Ciencias Veterinarias. 28(1):23-36. Recup de <http://www.revistas.una.ac.cr/index.php/veterinaria/article/view/5425>
- Romero, L. E., Meneses, A. I., Salazar, L., Jiménez, M., Romero, J. J., Aguiar, D. M., Dolz, G. 2011. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Costa Rica, Central America. Research in Veterinary Science. 91(1): 95–97. doi:10.1016/j.rvsc.2010.07.021.
- Rubio, R. M. C., Gaxiola, C. S. M., Enríquez, V. I., Cota, G. S. C., Castro, C. N. 2015. *Rhipicephalus sanguineus* en caninos en Sinaloa, México. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 16(3),1-10
- Sambrook J., Fritsch E.F. Y Maniatis T. 1989. Molecular cloning. Laboratory manual. 2da. edition. Cold spring Harbor laboratory press.
- Siarkou, V. I., Mylonakis, M. E., Bourtzi-Hatzopoulou, E., & Koutinas, A. F. 2007. Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of *Ehrlichia canis* strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis. Veterinary Microbiology. 125(3-4):304–312. doi:10.1016/j.vetmic.2007.05.021
- Skotarczak B. 2003. CANINE EHRLICHIOSIS. Ann. Agric Environ Med, 10 (2): 137-141. PMID:14677903
- Sosa-Gutiérrez C.G., Quintero-Martínez M.T., Vargas-Sandoval M., Gordillo-Pérez, G., 2016 First phylogenetic analysis of *Ehrlichia canis* in dogs and ticks from Mexico. Preliminary study. Revista MVZ Córdoba, vol. 21, núm. 3

- Sosa-Gutierrez, C. G., Quintero Martinez, M. T., Gaxiola Camacho, S. M., Cota Guajardo, S., Esteve-Gassent, M. D., & Gordillo-Pérez, M.-G. 2013. Frequency and Clinical Epidemiology of Canine Monocytic Ehrlichiosis in Dogs Infested with Ticks from Sinaloa, Mexico. *Journal of Veterinary Medicine*. 1–3. doi:10.1155/2013/797019
- Stillman, B. A., Monn, M., Liu, J., Thatcher, B., Foster, P., Andrews, B., ... Chandrashekar, R. 2014. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Ehrlichia ewingii* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 245(1): 80–86. doi:10.2460/javma.245.1.80
- Straube J. 2010. Canine Ehrlichiosis – from Acute Infection to Chronic Disease. Institute for Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Germany. Disponible en línea en: <http://www.cvbd.org/en/home/cvbd-digest-articles/> (Acceso: 18.03.2018).
- Waner T. y Harrus S. 2000. Ehrlichiosis monocítica canina. En: Carmichael, L, ed. *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA.
- Waner, T., Harrus, S., Jongejan, F., Bark, H., Keysary, A., Cornelissen, A. W. C. 2001. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Veterinary Parasitology*. 95(1):1–15. doi:10.1016/s0304-4017(00)00407-6

IX. ANEXOS



PCR *Ehrlichia* spp.



ADN