

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y
ARTES DE CHIAPAS**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

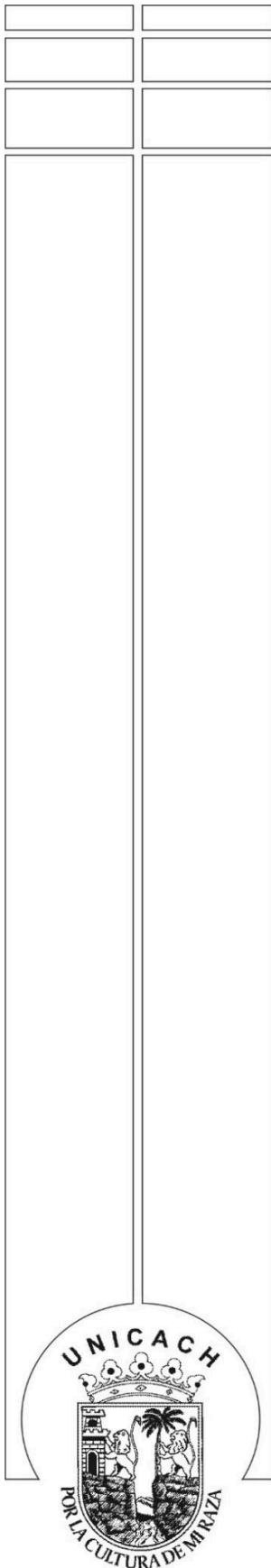
T E S I S

Diagnóstico de *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii* y
Anaplasma platys, mediante PCR en perros de
Tuxtla Gutiérrez

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

CARLOS DANIEL GONZÁLEZ GONZÁLEZ



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Fecha: Diciembre de 2023



**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES
DE CHIAPAS**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

T E S I S

Diagnóstico de *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii* y
Anaplasma platys, mediante PCR en perros de
Tuxtla Gutiérrez

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

CARLOS DANIEL GONZÁLEZ GONZÁLEZ

Director

DR. JAVIER GUTIÉRREZ JIMÉNEZ
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNICACH

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Fecha: Diciembre de 2023





UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS
SECRETARÍA GENERAL
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN ESCOLAR
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas;
Fecha: 4 de diciembre de 2023

C. Carlos Daniel González González

Pasante del Programa Educativo de: Licenciatura en Biología

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:
Diagnóstico de *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii* y *Anaplasma platys*, mediante PCR en perros
de Tuxtla Gutiérrez

En la modalidad de: Tesis Profesional

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

Revisores

Dra. María Adelina Schlie Guzmán

Dr. José Antonio De Fuentes Vicente

Dr. Javier Gutiérrez Jiménez

Firmas:

Ccp. Expediente

Agradecimientos

Al **Dr. Javier Gutierrez Jimenez** por su paciencia y compromiso en la dirección de esta tesis, así como por la confianza depositada en mí; agradezco también sus enseñanzas y asesorías durante cada etapa de este proyecto, puesto que ese aprendizaje me cambió la vida.

Al **MVZ Joe Miceli Hernández** por su confianza al abrirnos las puertas de su hospital veterinario y facilitarnos las muestras de los pacientes incluidos en este estudio, así como las sugerencias, comentarios y observaciones efectuados durante la realización de esta investigación.

Al **Biol. Dipl. José Rodolfo Ruíz Samayoa** por haberme instruido en todo lo que hoy sé sobre el diagnóstico clínico veterinario, a su vez, agradezco por sus comentarios muy acertados que ayudaron a resolver algunas dudas del presente estudio. Por último y no menos importante, agradezco por la amistad brindada durante esta etapa de mi vida, mis mejores deseos para usted y su familia.

Al **Dr. Jorge Vidal** y al **Dr. Babak Alibayov** por su cooperación en la elaboración de las secuencias genéticas obtenidas en este trabajo.

A los **Médicos Veterinarios Zootecnistas del Hospital Veterinario Pet's** quienes se encargaron de la toma de muestras y la historia clínica de los pacientes caninos de la presente investigación.

A la administración del **Hospital Veterinario Pet's, Plan de Ayala** por recibirme y facilitarme las instalaciones y servicios para el desarrollo de este estudio.

A la **Dra. María Adelina Schlie Guzmán** por confiarnos la entrada al Laboratorio de Biología Molecular y Genética ya que allí se llevó a cabo todo el proceso de experimentación para obtener los resultados esperados.

Al **Dr. José Antonio De Fuentes Vicente** por aceptar ser parte del comité revisor para el presente trabajo realizado.

A la **Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas**, mi alma mater, y al **Instituto de Ciencias Biológicas** por brindarme la oportunidad de estudiar la complejidad y belleza de la vida.

A la **Dirección de Investigación y Posgrado UNICACH**, por el apoyo económico para la compra de reactivos necesarios en esta investigación.

A todos mis profesores que lograron dejar un aprendizaje significativo en mi trayectoria académica. A mis compañeros de laboratorio, especialmente a **Fátima Juárez de la Cruz** e **Iliana Vicente Serrano**, gracias por ofrecerme su amistad y hacer más agradable mi estancia en el laboratorio.

A **Quenri Domínguez Gutiérrez** siempre fuiste parte de mi equipo en cada salida de campo y en trabajos escolares, gracias por tu amistad.

A la familia **González y Narcía** por haberme acogido como un miembro más de su familia, así como todo el apoyo que he recibido de cada uno de ustedes.

A la familia **Rodríguez y González** por estar al pendiente de mí en diversas situaciones, y por siempre abrir las puertas de su casa para nosotros.

A mi hermana **Alejandra González** por apoyarme con detalles del hogar cuando no tenía el tiempo para realizar esas actividades, también por preocuparte por mí y por ayudarme en momentos difíciles.

A **Leonela Ojeda Cruz** por tu comprensión, amabilidad y cariño sincero, gracias por estar conmigo en los momentos buenos y no tan buenos.

A todas aquellas personas que de manera directa o indirecta estuvieron presentes a lo largo de esta bonita travesía, MUCHAS GRACIAS.

Dedicatoria

A mis padres:

Carlos Armín González Lara y Virginia Marilyn González Cano, ustedes fueron las primeras personas que creyeron en mí, me enseñaron a que nunca debo rendirme y que la vida siempre nos recompensa cuando las cosas se hacen bien. Incluso con carencias, siempre buscaron la manera de que no me faltara nada, y en las veces en que tomé decisiones equivocadas, ustedes me ayudaron a aprender de mis errores. Sin su ayuda, este trabajo no hubiera sido posible de realizar, espero que se sientan igual de orgullosos como yo me siento por haber llegado tan lejos. Por todo su apoyo desde siempre, estaré eternamente agradecido con ustedes.

“Siempre parece imposible... hasta que se hace”

Nelson Mandela

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN	12
II.- MARCO TEÓRICO	15
2.1. HEMOPARÁSITOS	15
2.1.1. Género <i>Ehrlichia</i>	15
2.1.1.1. <i>Ehrlichia canis</i>	17
2.1.1.2. <i>Ehrlichia ewingii</i>	18
2.1.2. Género <i>Anaplasma</i>	19
2.1.2.1. <i>Anaplasma platys</i>	19
2.2. ENFERMEDADES CAUSADAS POR HEMOPARÁSITOS	21
2.2.1. Ehrlichiosis monocítica canina (CME)	21
2.2.2. Ehrlichiosis monocítica humana (HME)	24
2.2.3. Ehrlichiosis granulocítica canina (CGE)	25
2.2.4. Ehrlichiosis <i>Ewingii</i> humana (HEE)	26
2.2.5. Trombocitopenia cíclica infecciosa canina (ICCT)	26
2.3. VECTORES	28
2.3.1. Garrapatas	28
2.3.1. Género <i>Rhipicephalus</i>	30
2.3.2. Género <i>Dermacentor</i>	31
2.3.3. Género <i>Amblyomma</i>	32
2.3.4. Género <i>Ixodes</i>	33
2.4. RESERVORIO	34
2.4.1. <i>Canis lupus familiaris</i>	34
III.- ANTECEDENTES	36
IV.- OBJETIVOS	40
4.1. OBJETIVO GENERAL	40
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	40
4.3. HIPÓTESIS	40
V.- ZONA DE ESTUDIO	41
5.1. FISIOGRAFÍA	42
5.2. GEOLOGÍA	42
5.3. CLIMA	42
5.4. HIDROGRAFÍA	43
5.5. FLORA	43

5.6. FAUNA	44
VI.- MÉTODOS	45
6.1. ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES	45
6.2 TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE	45
6.3. EVALUACIÓN HEMATOLÓGICA	46
6.4. EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL	46
6.5. DIAGNÓSTICO CON PCR ANIDADA	46
6.6 SECUENCIACIÓN	49
6.7 ANÁLISIS DE DATOS	49
VII.- RESULTADOS	50
7.1 DATOS DEMOGRÁFICOS	50
7.2 EVALUACIÓN HEMATOLÓGICA	53
7.3 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E INMUNOLÓGICO DE EHRlichiosis/ANAPLASMOSIS	56
7.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE <i>EHRlichiosis/ANAPLASMOSIS</i> EN PERROS DE CHIAPAS, MÉXICO	59
7.4.1. Extracción y purificación de ADN	59
7.4.2. PCR anidada para <i>E. canis</i> , <i>E. ewingii</i> y <i>A. platys</i>	62
7.5 SECUENCIACIÓN DE LOS AMPLICONES OBTENIDOS	64
VIII.- DISCUSIÓN	67
IX.- CONCLUSIONES	72
X.- PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES	73
XI.- REFERENCIAS	74
XII.- ANEXOS	85

ÍNDICE DE CUADROS

<u>Cuadro 1. Taxonomía de <i>E. canis</i>.....</u>	<u>17</u>
<u>Cuadro 2. Taxonomia de <i>E. ewingii</i>.....</u>	<u>19</u>
<u>Cuadro 3. Taxonomia de <i>A. platys</i>.....</u>	<u>21</u>
<u>Cuadro 4. Razas de los perros agrupados en controles y casos en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.....</u>	<u>50</u>
<u>Cuadro 5. Región de procedencia en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, de los controles y casos.....</u>	<u>51</u>
<u>Cuadro 6. Sexo, edad y peso de controles y casos.....</u>	<u>52</u>
<u>Cuadro 7. Evaluación hematológica en perros de Chiapas, México.....</u>	<u>54</u>
<u>Cuadro 8. Signos del grupo clínico.....</u>	<u>57</u>
<u>Cuadro 9. Diagnóstico inmunológico de ehrlichiosis/anaplasmosis en perros de Chiapas, México.....</u>	<u>58</u>
<u>Cuadro 10. Tiempo de evolución y resultado de los pacientes.....</u>	<u>59</u>
<u>Cuadro 11. Muestras de ADN obtenidas de sangre de perros de Chiapas, México y absorbancia a 260/280 nm.....</u>	<u>60</u>
<u>Cuadro 12. Diagnóstico molecular de ehrlichiosis/anaplasmosis en perros de Chiapas, México.....</u>	<u>64</u>
<u>Cuadro 13. Secuencias de amplicones obtenidos por PCR en perros de Chiapas, México.....</u>	<u>65</u>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Jacinto, 2011).....	31
Figura 2. Fotografía de <i>Dermacentor marginatus</i> (Santarelli, 2020).....	32
Figura 3. Fotografía de un integrante del género <i>Amblyomma</i> (Farriols, 2017)....	33
Figura 4. Fotografía de <i>Ixodes scapularis</i> (Clarkin, 2015).....	34
Figura 5. Fotografía de <i>Canis lupus familiaris</i> raza pastor alemán (Sgroi, 2012)...	35
Figura 6. Ubicación del Hospital Veterinario Pet's.....	41
Figura 7. Ubicación del municipio de Tuxtla Gutiérrez.....	42
Figura 8. A, Eritrocitos hipocrómicos. B, Eritrocitos normocrómicos.....	53
Figura 9. A, Neutrófilos en banda (desviación a la izquierda). B, Neutrófilos segmentados.....	54
Figura 10. Prueba rápida para detección de anticuerpos para <i>E. canis</i> y <i>Anaplasma</i> spp. Ag: antígeno; Ac: anticuerpo.....	57
Figura 11. Bandas de ADN purificado a partir de muestras de sangre de perros de Chiapas, México.....	60
Figura 12. Diagnóstico molecular de ehrlichiosis y anaplasmosis en perros de Chiapas, México.....	63

RESUMEN

Los microorganismos *E. canis*, *E. ewingii* y *A. platys* son bacterias patógenas Gram-negativas que tienen una amplia distribución a nivel mundial, puesto que se han encontrado en África, Europa y América. Su principal vector de transmisión son las garrapatas de la familia Ixodidae, las cuales parasitan principalmente a los perros domésticos y silvestres. Estos hemoparásitos ocasionan enfermedades como la ehrlichiosis monocítica canina (*E. canis*), la ehrlichiosis granulocítica canina (*E. ewingii*) y la trombocitopenia cíclica infecciosa canina (*A. platys*). Los signos más comunes son trombocitopenia, leucopenia, anemia leve variable, pérdida de peso y fiebre, sin embargo, los cuadros clínicos pueden ser muy variados, pudiéndose confundir entre estas mismas u otras enfermedades, por lo que puede provocar un diagnóstico erróneo, ya que es complicado diagnosticar a los pacientes sólo con los datos del historial de contagio con garrapatas y los signos clínicos presentados. En este contexto, se realizó el presente trabajo de investigación, el cual consistió en analizar muestras de sangre provenientes de perros domésticos del Hospital Veterinario Pet's (ubicado en una zona urbana de Tuxtla Gutiérrez), para diagnosticar la presencia de *E. canis*, *E. ewingii* y *A. platys*. Se confirmó la presencia de estos microorganismos patógenos, reportándose dos casos de *E. canis*, un caso de *E. ewingii* y un caso de *A. platys*. Además, este estudio marca un hito al constituir el primer reporte de la presencia de *E. ewingii* y *A. platys* en el Estado de Chiapas, así como informar el primer caso de coinfección entre *E. canis* y *E. ewingii*.

Palabras clave: *E. canis*, *E. ewingii*, *A. platys*, Ehrlichiosis, Anaplasmosis, Caninos, Zoonosis, PCR, Chiapas.

I.- INTRODUCCIÓN

Los hemoparásitos son organismos microscópicos que viven y se reproducen a nivel de vasos sanguíneos, por fuera o dentro de glóbulos rojos o blancos (Domínguez-Alvarez, 2011). Un ejemplo de estos parásitos son las especies *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii* y *Anaplasma platys*, las cuales presentan tropismo por células sanguíneas (monocitos, granulocitos o plaquetas) (Tamí & Tamí-Maury, 2004). Taxonómicamente se reconoce a *E. canis* y *E. ewingii* como bacterias Gram-negativas del orden Rickettsiales, pertenecientes a la familia Anaplasmataceae. Mientras que *A. platys* es del género *Anaplasma*, orden Rickettsiales y familia Anaplasmataceae.

Estos microorganismos infecciosos tienen una amplia distribución a nivel mundial y pueden ser transmitidos a los animales domésticos por vectores mecánicos y biológicos (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2000). Se consideran a las garrapatas de la familia Ixodidae como los principales vectores de transmisión de estos parásitos (Benavides-Montaña & Ramírez, 2003). La presencia de estos hemoparásitos en los animales domésticos produce ciertas enfermedades que pueden variar dependiendo del agente infeccioso del que se trate, por ejemplo, la ehrlichiosis monocítica canina (CME) es causada por *E. canis*, la ehrlichiosis granulocítica canina (CGE) por *E. ewingii* y la trombocitopenia cíclica infecciosa canina (ICCT) por *A. platys*.

Estas enfermedades se caracterizan por presentar tres fases: aguda, subaguda y crónica. De acuerdo a estas fases, los cuadros clínicos serán diferentes para cada caso, sin embargo, los síntomas más comunes son trombocitopenia, leucopenia, anemia leve variable, pérdida de peso, anorexia, letargia, hipertermia, linfadenomegalia, exudado óculo-nasal seroso o purulento, hemorragias, petequias y disnea (Guerrero-Puentes, 2016). En algunas ocasiones pueden presentarse casos de coinfección entre *E. canis* con *E. ewingii* o *E. canis*

con *A. platys*, en cualquiera de estas situaciones, la coinfección provoca que los síntomas sean más graves, pudiendo incluso causar la muerte del enfermo.

El sector más afectado por este tipo de enfermedades son los perros, sin embargo, también pueden infectar otros mamíferos como équidos y venados (Benavides-Montaña & Ramírez, 2003), aunque recientemente se ha considerado a la CME y CGE como enfermedades zoonóticas, ya que se reportaron casos de infección en seres humanos en varios países de América, resaltando también la presencia de México dentro de esta lista (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2020; Buller *et al.*, 1999; Dolz *et al.*, 2013; Tamí & Tamí-Maury, 2004). Esto último es de principal atención puesto que es evidente que el incremento de la urbanización puede aumentar también el riesgo de contagio zoonótico (Lorenzo Monterrubio *et al.*, 2017).

Anteriormente para el diagnóstico de la ehrlichiosis y anaplasmosis canina los médicos veterinarios solían basarse en síntomas físicos, sin embargo, actualmente este criterio puede ser ambiguo, ya que los síntomas presentados pueden ser similares con otras enfermedades y además, de esta manera no permite identificar específicamente al agente causal, por lo que el tratamiento puede no ser el más adecuado para la correcta recuperación del paciente. Posteriormente se empezó a utilizar la técnica de la visualización de las mórulas en frotis sanguíneo, sin embargo, esto debía ser realizado por una persona altamente capacitada, además de que se invertía demasiado tiempo, ya que visualizar las mórulas puede ser algo difícil y no siempre pueden detectarse.

Otro diagnóstico empleado es la detección de anticuerpos mediante técnicas de IF o análisis de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), el problema de estos métodos es que no permiten identificar específicamente de qué especie se trata, además, se ha reportado reactividad cruzada entre *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii*, así como con *A. phagocytophilum*, pudiendo generar falsos positivos (Franco-Zetina *et al.*, 2019).

Por otra parte, se han desarrollado métodos género-específicos y especie-específicos mediante PCR, permitiendo optimizar el diagnóstico en fases agudas de la enfermedad. Tal es el caso de la PCR anidada del gen 16S ARNr, la cual ha sido utilizada para incrementar la especificidad hacia la detección de ADN de *E. canis* mostrando buenos resultados (Franco-Zetina *et al.*, 2019). Por esta razón cada vez más, la PCR se está convirtiendo en una importante herramienta clínica de diagnóstico para diferenciar la especie infecciosa y para determinar si el tratamiento ha eliminado de manera eficaz la infección (Ettinger & Feldaman, 2007).

Actualmente en el Estado de Chiapas no se han realizado estudios sobre la seroprevalencia de estas bacterias en los perros, por lo que los únicos datos se encuentran en un trabajo publicado por Núñez-Ochoa, (2003), en el que se estudió la seroprevalencia de *E. canis* en México. Para ello se evaluaron 2,395 perros en todo el país, de los cuales 1,523 presentaron o tuvieron garrapatas, de estos, 793 resultaron positivos a *E. canis*. Esta investigación mostró que la región norte y el sureste son consideradas zonas enzoóticas de alta importancia. Así mismo, cabe destacar que el Estado de Chiapas ocupó el octavo lugar a nivel nacional con una prevalencia del 41.7%. Si consideramos el crecimiento urbano en la actualidad, es posible que esta cifra se haya incrementado tanto en Chiapas como a nivel nacional. Esto se vuelve preocupante sabiendo que *E. canis* y *E. ewingii* son capaces de infectar a los seres humanos.

Debido a los problemas para diagnosticar a estas bacterias en los perros, así como la actual emergencia zoonótica de las mismas, la propuesta de este trabajo es diagnosticar eficazmente la presencia de *E. canis*, *E. ewingii* y *A. platys* en perros de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez Chiapas, mediante la técnica de PCR anidada, con el fin de proporcionar una valiosa herramienta para los médicos veterinarios.

II.- MARCO TEÓRICO

2.1. HEMOPARÁSITOS

2.1.1. Género *Ehrlichia*

El género *Ehrlichia* está compuesto por seis especies que pertenecen a la clase alfa-proteobacteria: *E. chaffeensis*, *E. canis*, *E. ewingii*, *E. muris*, *E. minasensis* y *E. ruminantium*, (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2020). Estas bacterias son Gram-negativas y tienen forma de cocos o pleomórficos, se encuentran clasificadas en el orden de las Rickettsiales, pertenecientes a la familia Anaplasmataceae. Se caracterizan por ser intracelulares obligadas ya que utilizan células sanguíneas como monocitos, granulocitos o plaquetas para adentrarse en la vacuola citoplasmática, de esta manera, se mantienen en la naturaleza por la infección persistente de huéspedes mamíferos (Cruz *et al.*, 2012).

Las especies de *Ehrlichia* han perdido todos los genes de biosíntesis de lipopolisacáridos (LPS) y algunos otros para la síntesis de peptidoglicano, evitando de esta manera que se lleve a cabo una respuesta inmune efectiva para su eliminación (Franco-Zetina *et al.*, 2019). Sin embargo, la pared celular de la *Ehrlichia* es rica en colesterol, que se deriva de la célula huésped y parece ser importante para la supervivencia de la *Ehrlichia* y su entrada en las células de los mamíferos (Ismail *et al.*, 2010). El no contar con peptidoglicano les supone una gran ventaja para este grupo de bacterias, ya que de este modo obtienen una mayor flexibilidad y plasticidad, lo que facilita la circulación en los leucocitos infectados y demás células infectadas.

Se pueden encontrar dos formas bacterianas de *Ehrlichia*: células de centro denso (DC) y células reticuladas (RC). Los DC son las formas maduras infectantes extracelulares, las cuales miden de 0,4 a 0,6 μm de diámetro (Gutiérrez *et al.*, 2016). La diferencia entre estas células es de gran importancia para el ciclo de

desarrollo de la bacteria. Cuando tienen la forma de DC logran adentrarse a la célula por medio de la endocitosis, y una vez estando en el endosoma, se transforman en formas intermedias para luego madurar y ser RC. Siendo RC, se multiplican por fisión binaria y esto suele durar alrededor de 48 h, lo que dará paso a nuevas formas intermedias. Finalmente, ocurre una maduración nuevamente a DC, pasadas 72 h, para después ocurrir una lisis de la célula hospedera y acaecer su liberación (Franco-Zetina *et al.*, 2019).

En palabras de Tamí y Tamí-Maury (2004), llegan a multiplicarse por fisión binaria en el interior de la vacuola, y forman una microcolonia, que es visible al microscopio óptico y que por su aspecto se denomina “mórula”. Estas mórulas se aprecian cuando la célula RC se transforma en unas formas intermedias (IM2), hasta que se llegan a formar las mórulas (vacuola con 20 a 40 cuerpos elementales) (Gutiérrez *et al.*, 2016). Las mórulas pueden ser redondeadas 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 (Gutiérrez *et al.*, 2016).

El vector de estas bacterias corresponde a diversas especies de garrapatas duras de los géneros *Amblyomma*, *Ixodes* y *Rhipicephalus* (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2020), cuando las garrapatas muerden, pueden llegar a contaminar con su saliva (en caso de ser portadoras de alguna de estas especies). Cuando *Ehrlichia* ingresa en el cuerpo del hospedero, se desplaza mediante el torrente circulatorio utilizando a los leucocitos o las plaquetas. Este microorganismo está relacionado con ehrlichiosis en varias especies animales como perros, equinos, rumiantes, felinos y humanos (Oliveira *et al.*, 2009). Ejerce su acción patógena en el propio sistema sanguíneo, en el vascular, el sistema nervioso central, pulmones, riñones, aparato digestivo, hígado y piel, entre otros (Tamí & Tamí-Maury, 2004).

2.1.1.1. *Ehrlichia canis*

En 1935, Donatien y Lestoquard del Instituto Pasteur de Argelia visualizaron en monocitos de perros febriles y con anemia, organismos semejantes a *Rickettsias*, por lo que fueron clasificados como *Rickettsia canis* (Gutiérrez *et al.*, 2016). Sin embargo, diez años más tarde, en 1945 Moshovski reclasificó a estos microorganismos como *Ehrlichia canis* en honor a Paul Ehrlich. *E. canis* tiene una distribución amplia alrededor del mundo, por lo que es considerada cosmopolita. Sus principales vectores son las garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* y *Dermacentor variabilis*, (Barrantes-González *et al.*, 2016). Se le considera la causante de la ehrlichiosis monocítica canina (CME) y la ehrlichiosis monocítica humana (HME). Esta bacteria se encuentra en las mórulas del citoplasma de los linfocitos, monocitos y macrófagos (Mylonakis *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Taxonomía de *E. canis*.

Taxonomía	
Dominio	Bacteria
Reino	Eubacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Alpha Proteobacteria
Orden	Rickettsiales
Familia	<i>Anaplasmataceae</i>
Género	<i>Ehrlichia</i>

Especie	<i>Ehrlichia canis</i> (Donatien and Lestoquard 1935) Moshkovski 1945
----------------	---

2.1.1.2. *Ehrlichia ewingii*

Anteriormente se pensaba que esta especie era una nueva cepa de *E. canis*, ya que Ewing *et al.*, (1971) la observaron en granulocitos de un perro que presentaba una forma leve de ehrlichiosis. Sin embargo, Anderson *et al.*, (1992), después de análisis genéticos concluyeron que era otra especie a la que nombraron *Ehrlichia ewingii*, en honor a Sidney Ewing por su trabajo pionero con este agente (Gutiérrez *et al.*, 2016). *E. ewingii* tiene un tropismo por los leucocitos polimorfonucleares y es responsable de diversos grados de poliartritis en infecciones naturales y experimentales en perros (Goldman *et al.*, 1998).

Al igual que *E. canis*, *E. ewingii* es un patógeno de perros y humanos, siendo el agente causante de la ehrlichiosis granulocítica en ambas especies (Yabsley *et al.*, 2011). Sin embargo, también se ha llegado a encontrar su presencia en ciervos, caballos y roedores (Liddell *et al.*, 2003). Este microorganismo también es transmitido por garrapatas, se reconoce a *Amblyomma americanum* como el principal vector (Ndip *et al.*, 2005). *E. ewingii* se ha encontrado sólo en neutrófilos y eosinófilos, a diferencia de *E. canis* y *E. chaffeensis*, que se encuentran principalmente en los monocitos circulantes (Rikihisa *et al.*, 1994).

Por otra parte, Ismail *et al.*, (2010) mencionan que todas las especies de *Ehrlichia* patógenas para el ser humano pueden ser cultivadas *in vitro*, excepto *E. ewingii*, y tampoco se dispone de una prueba serológica (Rikihisa *et al.*, 1992).

Cuadro 2. Taxonomía de *E. ewingii*.

Taxonomía	
Dominio	Bacteria
Reino	Eubacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Alpha Proteobacteria
Orden	Rickettsiales
Familia	<i>Anaplasmataceae</i>
Género	<i>Ehrlichia</i>
Especie	<i>Ehrlichia ewingii</i>

2.1.2. Género *Anaplasma*

Taxonómicamente pertenece al orden rickettsiales, y se caracteriza por ser Gram-negativa, pleomórficas y de crecimiento intracelular obligado. El género *Anaplasma* está ahora constituido por *A. phagocytophilum* (anteriormente *E. equi*, *E. phagoyitophila* o erliquia granulocítica humana), *A. bovis* y *A. platys* (Domínguez-Alvarez, 2011).

2.1.2.1. *Anaplasma platys*

Hasta el año del 2001, esta bacteria era conocida como *E. platys*, pero hoy en día se encuentra clasificada como *A. platys*, perteneciendo a el género *Anaplasma*,

orden Rickettsiales y a la familia Anaplasmataceae (Ábrego *et al.*, 2009). *A. platys* es un agente bacteriano Gram-negativo relativamente pequeño (0.4 a 1.5 μm), y su morfología tiende a ser variable, ya que se puede encontrar como cocos o cocobacilares hasta formas moldeadas o contorneadas. Al igual que *Ehrlichia*, *Anaplasma* existe intracelularmente en 2 formas ultraestructurales morfológicamente distintas, células de núcleo denso DC (0,4-0,6 μm) y células reticuladas RC (0,4-0,6 μm por 0,7-1,9 μm) (Ismail *et al.*, 2010).

Este microorganismo presenta un metabolismo anaeróbico y se reproduce por fisión binaria dentro de una vesícula endosómica, y parasita las plaquetas (Uzcategui *et al.*, 2019). Se presenta en forma individual, en pares o grupos llamados mórulas; a su vez, dentro de una vacuola (Ábrego *et al.*, 2009). Se considera que las bacterias del género *Anaplasma* tienen un genoma relativamente pequeño (0.8-1.5 Mb), que han sufrido varios tipos de procesos evolutivos reductores al perder genes redundantes y han desarrollado una dependencia de la célula huésped para las funciones necesarias (Ismail *et al.*, 2010). Esto mismo se puede apreciar en la membrana celular, la cual carece de ciertos componentes importantes como el lipopolisacárido y el peptidoglicano.

Hoy en día se ha reconocido a *A. platys* como el agente causante de la anaplasmosis canina, dicha enfermedad también es llamada trombocitopenia cíclica infecciosa canina. Por otra parte, se sabe que su principal vector al igual que con *Ehrlichia*, son las garrapatas, sin embargo, no está esclarecido si se trata de *R. sanguineus* (Tateishi T *et al.*, 2015), o de otras garrapatas del género *Ixodes*. Oscherov *et al.*, (2011), han reportado la presencia de *A. platys* en varios países de América. Sin embargo, también se han registrado en países de Europa (Huber *et al.*, 2017; Kovačević-Filipović *et al.*, 2018; Sainz *et al.*, 2015), por lo que tiene una amplia distribución alrededor del mundo.

Cuadro 3. Taxonomía de *A. platys*.

Taxonomía	
Dominio	Bacteria
Reino	Eubacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Alpha Proteobacteria
Orden	Rickettsiales
Familia	<i>Anaplasmataceae</i>
Género	<i>Anaplasma</i>
Especie	<i>Anaplasma platys</i>

2.2. ENFERMEDADES CAUSADAS POR HEMOPARÁSITOS

2.2.1. Ehrlichiosis monocítica canina (CME)

La CME es una enfermedad multisistémica grave y a veces fatal (Gutiérrez *et al.*, 2016). Se conoce también como “enfermedad del perro rastreador”, “pancitopenia canina tropical”, “fiebre canina hemorrágica”, y “tifus canina” (Huerto-Medina & Dámaso-Mata, 2015), y como su nombre lo indica, es adquirida por los caninos domésticos y silvestres de distintas regiones del mundo. Se reconoce a *E. canis*

como la causante de esta patología, ya que cuando infecta las células sanguíneas, es posible observar su presencia en ellas.

Cuando *E. canis* es transmitida por la mordedura de la garrapata, suele llevar un proceso de incubación, el cual generalmente tarda entre una a dos semanas. Durante este tiempo la bacteria entra por los vasos sanguíneos y linfáticos; luego, viaja al bazo, hígado y ganglios linfáticos para multiplicarse por fusión binaria y extenderse a otros órganos del cuerpo (Aragón-López *et al.*, 2021; de Castro *et al.*, 2004). Esta enfermedad presenta tres fases: aguda, subaguda y crónica. Hay síntomas que pueden presentarse en cualquiera de estas fases, como por ejemplo: fiebre, postración, esplenomegalia, anemia y trombocitopenia, sin embargo, se pueden presentar más síntomas de acuerdo al cuadro que presente el enfermo.

Aparentemente, esta enfermedad no tiene una relación por la edad o el sexo de los huéspedes, por lo que es capaz de infectar a todas las razas de perros, sin embargo, Nyindo *et al.*, (1980), sugieren que el pastor alemán parece ser el más susceptible, ya que en la fase más grave de la enfermedad muestra una mayor morbilidad y mortalidad, en comparación con otras razas de cánidos.

Según Rojas-Triviño *et al.*, (2013), la fase aguda y subaguda no es muy específica, pero se puede observar algunos síntomas como depresión, anorexia, fiebre y pérdida de peso; también pueden presentarse descargas oculares y nasales, disnea, tos y edema en extremidades. Sin embargo, Rufino *et al.*, (2013), reporta síntomas adicionales para la fase aguda, los cuales son letargo, linfadenomegalia y esplenomegalia. Los hallazgos clínicos en la fase aguda de la ehrlichiosis pueden ser idénticos a la FEMR canina (Ettinger & Feldaman, 2007).

La mayoría de los perros se recuperan de la fase aguda de la enfermedad, pero siguen infectados. Algunos meses o años después de la fase aguda de la enfermedad, algunos perros desarrollan la forma crónica de la enfermedad (Rikihisa *et al.*, 1994). En la fase crónica los síntomas suelen ser disposición a

presentar hemorragias, la aparición de petequias y equimosis en la piel y epistaxis ocasionales (Rufino *et al.*, 2013), así como la pérdida progresiva de peso, mucosas pálidas y leves hemorragias en las mismas. *E. canis* es difícil de eliminar, y cuando los perros están en la fase crónica, pueden servir como reservorios del organismo (Murphy *et al.*, 1998). Los signos clínicos asociados a la fase crónica de la enfermedad pueden clasificarse como moderados a asintomáticos en algunos perros y graves en otros (Ettinger & Feldaman, 2007).

Es importante mencionar que aunque no es muy común, suelen presentarse signos neurológicos y oftalmológicos. En el caso de los síntomas neurológicos, se presentan por inflamación o sangrado dentro del SNC (Sistema Nervioso Central) (Guerrero-Puentes, 2016).

El diagnóstico de esta enfermedad se vuelve una tarea difícil para los médicos veterinarios, ya que hasta la fecha suelen basarse en el examen físico del animal, la historia de contacto con garrapatas y observación de los hemoparásitos en extendido de sangre periférica (Rojas-Triviño *et al.*, 2013). Cabe mencionar que estos criterios pueden llegar a ser ambiguos y no permiten identificar (en la mayoría de los casos) las especies de los patógenos involucrados, esto último se debe a las coinfecciones que pueden establecerse entre *E. canis* y otros microorganismos como *E. ewingii* y *A. platys* (Murphy *et al.*, 1998; Rufino *et al.*, 2013). De modo que, a pesar de que se puede hacer un diagnóstico con técnicas hematológicas, citológicas, serológicas y aislamientos, el diagnóstico definitivo de la infección por *E. canis* requiere técnicas moleculares (Harrus & Waner, 2011).

Actualmente se recomiendan tetraciclina (22 mg/kg tres veces al día durante 21 días) o doxiciclina (5 mg/kg dos veces al día durante 21 días) para el tratamiento de la ehrlichiosis canina. Habitualmente aparece una mejoría clínica en las primeras 24 a 48 horas de iniciado el tratamiento con tetraciclina o doxiciclina en perros con enfermedad en fase aguda o crónica moderada (Ettinger & Feldaman, 2007). Desde el punto de vista clínico, se asume que los perros han

eliminado la infección por *Ehrlichia* si la hiperglobulinemia se resuelve progresivamente después del tratamiento o si el ADN de *Ehrlichia* no puede ser amplificado a partir de muestras de sangre tratadas con EDTA. No existen vacunas disponibles actualmente (Ettinger & Feldaman, 2007).

2.2.2. Ehrlichiosis monocítica humana (HME)

Previamente *E. canis* no era considerada un patógeno que infectara al ser humano, hasta que se aisló una cepa de un hombre en Venezuela que estaba genéticamente y antigénicamente más relacionada con *E. canis* de Oklahoma (Doudier *et al.*, 2010). Actualmente esta enfermedad es considerada de importancia zoonótica. Según Aragón-López *et al.*, (2021), el ser humano es una víctima accidental después de ser mordido por alguna de las dos especies de garrapatas (*R. sanguineus* y *Dermacentor variabilis*), las cuales fungen como vectores de *E. canis* y *E. chaffeensis*, las bacterias causantes de la ehrlichiosis monocítica tanto en humanos como en otros animales.

Los síntomas suelen comenzar aproximadamente 9 días después de la mordedura de garrapata, y la mayoría de los pacientes buscan atención médica dentro de los primeros cuatro días de la enfermedad (Ismail *et al.*, 2010). La ehrlichiosis monocítica humana se caracteriza por fiebre, cefalea, mialgias, anorexia, escalofríos, leucopenia, trombocitopenia, anemia, y una elevación de los niveles de aminotransferasa hepática en suero (Rikihisa *et al.*, 1994). En el peor de los casos, las complicaciones sistémicas pueden conducir a la muerte en el 3% de los casos-pacientes (Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2020).

Anteriormente esta enfermedad no estaba bien documentada, puesto que el diagnóstico en humanos requería de ciertos métodos y técnicas que para años anteriores solía ser complicado de manejar, sin embargo, actualmente con el desarrollo de las tecnologías se ha podido mejorar gradualmente, lo que ha ayudado a los médicos a efectuar mejores evaluaciones sobre las personas que han sido infectadas por *Ehrlichia*. Por ejemplo, recientemente para el diagnóstico

de HME, se utilizan diferentes técnicas entre las que se incluyen las hematológicas, serológicas, aislamiento bacteriano y moleculares (Franco-Zetina *et al.*, 2019).

Por otro lado, algunos autores como Doudier *et al.*, (2010) mencionan que la aparición de la HME podría ser el resultado de un reconocimiento clínico reciente, más que al desarrollo de una nueva enfermedad. Sin embargo, también se consideran factores como el crecimiento y la expansión geográfica de reservorios y vectores, además de que el modo de vida de las personas ha cambiado, de modo que, ahora las personas están expuestas con más frecuencia a actividades al aire libre que las ponen en contacto con las garrapatas (Doudier *et al.*, 2010)

2.2.3. Ehrlichiosis granulocítica canina (CGE)

Esta es una enfermedad que es provocada por *E. ewingii* cuando esta bacteria infecta a los granulocitos. En comparación con la CME, la ehrlichiosis granulocítica canina es más leve, sin embargo, puede provocar poliartritis en perros con infección crónica (Murphy *et al.*, 1998). Una combinación de tendencia a la hemorragia, palidez debida a la anemia, pérdida intensa de peso, debilidad, dolor a la exploración abdominal, uveítis anterior, hemorragias retinianas y signos neurológicos compatibles con meningoencefalitis tipifican a los perros que desarrollan las manifestaciones de la enfermedad durante la infección crónica por *E. ewingii* (Ettinger & Feldaman, 2007).

Otros síntomas provocados por la infección de *E. ewingii* son disfunción neurológica y cojera que afecta a una o más extremidades, rigidez muscular, una marcha afectada, renuencia a levantarse, espalda arqueada e hinchazón y dolor articular. Por otro lado, se han documentado infecciones asintomáticas por *E. ewingii* mediante pruebas de PCR (Ettinger & Feldaman, 2007).

2.2.4. Ehrlichiosis *Ewingii* humana (HEE)

La HGE es una enfermedad multisistémica y presenta síntomas como fiebre, cefalea, fatiga, mialgia, náuseas, artralgia, temblores, tos, confusión y ocasionalmente edema de extremidades, linfadenomegalia y derrame pericárdico (Goldman *et al.*, 1998). Las características del cuadro clínico de esta enfermedad, pueden llegar a ser muy similares con las que presentan los animales domésticos y el ser humano, ya que en ambos casos las infecciones primarias provocan pirexia e inmunosupresión (Ogden *et al.*, 1998). Lo peligroso de esta enfermedad es que al presentar inmunosupresión, el huésped se vuelve susceptible a infecciones secundarias que pueden ser más graves y mortales.

Después de haber sido picado por una garrapata infectada con *E. ewingii*, transcurre un periodo de incubación de 1 a 60 días, antes de la aparición de la pirexia (Ogden *et al.*, 1998). Así mismo, los síntomas que suelen acompañar el cuadro clínico en los seres humanos suelen ser mialgias, cefaleas, náuseas, rigores y artralgias.

Para diagnosticar esta enfermedad, los complementos utilizados incluyen el recuento de glóbulos blancos periféricos y plaquetas, la demostración de mórulas en los neutrófilos y la elevación de la proteína C reactiva (Ogden *et al.*, 1998). También pueden usarse técnicas moleculares como PCR amplificando el gen 16S rRNA (Anderson *et al.*, 1992).

Según Ogden *et al.*, (1998) la tetraciclina o la desoxiciclina son los agentes antimicrobianos de elección para combatir esta enfermedad, y la administración prolongada (hasta de dos semanas) puede ser útil para evitar recaídas.

2.2.5. Trombocitopenia cíclica infecciosa canina (ICCT)

Esta es una enfermedad de tipo infecciosa, siendo *A. platys* el agente bacteriano responsable de causar la infección. La ICCT se caracteriza por una parasitemia cíclica en las plaquetas, seguida de trombocitopenia generalizada y

linfadenomegalia (Rufino *et al.*, 2013), además, puede variar clínicamente de leve a grave. Asociadas a la infección experimental por *A. platys*, se ha notificado anemia normocítica, normocrómica y no regenerativa, leucopenia, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia (Ettinger & Feldaman, 2007).

Además, se mencionan alteraciones sanguíneas diferentes a la trombocitopenia, hematocritos bajos y monocitosis (Ábrego *et al.*, 2009). Cuando la ICCT está en la fase crónica, a los pocos días de haberse presentado la infección, ocurre una disminución en picada del número de plaquetas, así como del agente etiológico, lo que configura parasitemias esporádicas (Harvey *et al.*, 1978; Rufino *et al.*, 2013).

Siguiendo con la fase crónica, el recuento de las plaquetas se acerca a los valores de referencia en alrededor de cuatro días, esto se debe a la naturaleza cíclica de la ICCT, por lo que la mayoría de los perros infectados con esta forma de la enfermedad permanecen asintomáticos, lo que hace que la ICCT sea una enfermedad relativamente benigna (Rufino *et al.*, 2013). *A. plays* provoca bacteriemia cíclica, acompañada de trombocitopenia, en intervalos de aproximadamente 10 a 14 días. En su nadir, la trombocitopenia puede ser grave (20.000 a 50.000 plaquetas/ μ L) y las plaquetas tienen poca capacidad de agregación (Ettinger & Feldaman, 2007).

Esta enfermedad tiene un período de incubación de 8-15 días, y el cuadro clínico puede durar entre 7 y 14 días, los síntomas son inespecíficos, pudiendo observarse pirexia, así como petequias y equimosis (Greene, 1997; Tateishi T *et al.*, 2015). Dumler *et al.*, (2001), también encontraron síntomas como fiebre, decaimiento, pérdida de peso, petequias en las mucosas, lesiones hemorrágicas cutáneas y hemorragias fatales en casos graves. Estos síntomas pueden llegar a complicarse más si existe una coinfección con *E. canis*.

Para realizar la diagnosis sobre la infección de *A. platys* se utilizan algunas técnicas como métodos serológicos y por detección directa en frotis de sangre, sin

embargo, estos métodos no suelen ser los más precisos para identificar específicamente a estos patógenos. En este contexto, se han desarrollado métodos de diagnóstico más precisos, como el diagnóstico molecular (Chang & Pan, 1996; Doyle *et al.*, 2005; López *et al.*, 2012; Rufino *et al.*, 2013).

Según Domínguez-Alvarez (2011), si se tiene una cierta sospecha de que un perro tiene anaplasmosis, se debe administrar tratamiento de forma empírica sin esperar la confirmación microbiológica, ya que esta puede tardar semanas o no producirse. Así mismo, Ettinger & Feldaman (2007), mencionan que el clorhidrato de tetraciclina o doxiciclina provocan una mejoría rápida del estado clínico del enfermo.

2.3. VECTORES

2.3.1. Garrapatas

Las garrapatas son parásitos hematófagos en un gran número de vertebrados terrestres, incluidos reptiles, aves, perros y humanos, que tienen gran importancia desde el punto de vista médico veterinario y de salud pública, ya que son vectores de gran número de enfermedades bacterianas, virales, protozoarias y rickettsiales, que afectan tanto a los animales como al hombre. La infestación por garrapatas clínicamente se manifiesta por la presencia de garrapatas sobre la piel en diferentes partes del cuerpo y por la transmisión de importantes enfermedades causadas por virus, bacterias, protozoarios, rickettsias, etc. La transmisión se realiza por vía terrestre (Domínguez Alvarez, 2011).

Las garrapatas son arácnidos de la subclase de los ácaros, que se encuadran en el superorden parasitiformes. Los parasitiformes incluyen, junto a los Ixodida, a los Mesostigmata y a los Holothyrida. Dentro de los Ixodida se reconocen tres familias: Ixodidae, Argasidae y Nuttalliellidae. Por su parte, la familia Ixodidae cuenta con 12 géneros (*Ixodes*, *Amblyomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Cosmiomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*,

Margaropus, *Nosomma*, *Rhipicentor* y *Rhipicephalus*, incluido el subgénero *Boophilus*) (Márquez-Jiménez *et al.*, 2005), y 683 especies, de las cuales 241 integran el género *Ixodes* (Horak *et al.*, 2002).

El ciclo vital de los ixódidos presenta cuatro estadios (huevo, larva, ninfa y adulto). Se calcula que el tiempo que una garrapata dura pasa sobre el hospedador es de aproximadamente el 10% del tiempo total de su ciclo vital. La mayor parte de las garrapatas son relativamente inmóviles, por lo que permanecen en la vegetación o en los nidos y madrigueras a la espera de un hospedador. El desarrollo del ciclo biológico de una garrapata se encuentra estrechamente relacionado con la presencia efectiva de hospedadores adecuados en su área biológica, así como con la existencia de un microhábitat en el que se den condiciones microclimáticas favorables (Márquez-Jiménez *et al.*, 2005).

Las garrapatas hembras ponen los huevecillos en áreas de vegetación abundante, de preferencia en pasto crecido. Los huevos tardan tiempo en eclosionar dependiendo de la especie y de las condiciones medioambientales. Después de este periodo se libera la larva (con 3 pares de patas), ésta se mueve en el pasto en busca de su primer hospedador y su primera comida. Si en ese momento pasa un probable huésped, la larva por sí misma ataca, se fija y se mueve hacia alguna parte de la piel para alimentarse. Después de esta comida, la larva se deja caer y muda para convertirse en ninfa (con 4 pares de patas) y empieza a buscar su próximo huésped (Domínguez Alvarez, 2011)

Dentro de los estímulos para reconocer al huésped se incluyen dióxido de carbono, olor, vibraciones, interrupción de luz, corrientes de aire, calor y humedad. Una vez alimentada la ninfa se deja caer de nuevo en el hábitat del huésped y muda para convertirse en adulta. La adulta se alimenta por un periodo de tiempo determinado, durante este tiempo se enjurgita aumentando su peso hasta 100 veces, copula y se deja caer al hábitat empezando a ovopositar y con ello cierra el

ciclo de vida. Posteriormente la garrapata adulta hembra muere. El macho se puede alimentar varias veces (Domínguez Alvarez, 2011).

2.3.1. Género *Rhipicephalus*

Está subdividido en grupos de acuerdo con sus características morfológicas, existen evidencias morfológicas y genéticas de que *Rhipicephalus* es parafilético con respecto a *Boophilus* (Vivas *et al.*, 2019). Se reconoce por presentar, en visión dorsal, la base del capítulo de forma hexagonal (Márquez-Jiménez *et al.*, 2005). A nivel mundial existen 84 especies. En México, las especies más importantes son *R. microplus* y *R. sanguineus* sensu lato. A nivel mundial, *R. sanguineus* s.l. (Fig. 1) se encuentra ampliamente distribuida y es vector de varios agentes patógenos como *Coxiella burnetii*, *E. canis*, *E. chaffensis*, *R. conorii* y *R. rickettsii* (Dantas-Torres, 2010; Vivas *et al.*, 2019). *E. canis* se ha diagnosticado en el sureste de México y afecta a una gran cantidad de perros y *R. sanguineus* s.l. es el vector (Vivas *et al.*, 2019).



Fig. 1. *Rhipicephalus sanguineus* (Jacinto, 2011).

2.3.2. Género *Dermacentor*

A nivel mundial, se han reportado 35 especies del género *Dermacentor* (Fig. 2), de las que 23 especies parasitan al humano. En México, se han reportado 11 especies de *Dermacentor*. En Estados Unidos de América, *D. variabilis* es responsable de la transmisión de *E. chaffensis* a los perros, humanos y animales silvestres (Guzmán-Cornejo *et al.*, 2011; Vivas *et al.*, 2019), así como también de *E. canis* (Barrantes-González *et al.*, 2016).



Fig. 2. *Dermacentor marginatus* (Santarelli, 2020).

2.3.3. Género *Amblyomma*

Estas garrapatas parasitan a varias especies de vertebrados como anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Así mismo, muchas de las especies de este género suelen ser de importancia médica, puesto que fungen como vectores de patógenos que ocasionan enfermedades. Por ejemplo, *A. americanum* es vector de *E. chaffeensis*, la cual produce la ehrlichiosis monocítica humana. De igual manera, se reconoce a *A. americanum* como el principal vector de *E. ewingii* (Ndip *et al.*, 2005), la cual es el agente causal de la ehrlichiosis granulocítica canina y humana. En México, Guzmán-Cornejo *et al.*, (2011), reportaron 26 especies de *Amblyomma* parásitas (Fig. 3).



Fig. 3. *Amblyomma* (Farriols, 2017).

2.3.4. Género *Ixodes*

Es el género más grande de la familia Ixodidae con 245 especies a nivel mundial (Fig. 4), en México, se han reportado 26 especies parasitando aves y mamíferos (Vivas *et al.*, 2019). Veracruz tiene la mayor diversidad de *Ixodes* con seis especies, donde *I. boliviensis* presenta la mayor distribución en México y el mayor rango de especies animales parasitados (Vivas *et al.*, 2019). Algunas especies de este género pueden ser vectores para transmitir *A. platys* y otras especies del género *Anaplasma* (Domínguez Álvarez, 2011).



Fig. 4. *Ixodes scapularis* (Clarkin, 2015).

2.4. RESERVORIO

2.4.1. *Canis lupus familiaris*

Durante los últimos años han ido adquiriendo mayor relevancia las enfermedades transmitidas por animales, zoonosis. Sin duda, las mascotas más frecuentes en los hogares y que conviven estrechamente con el ser humano son los perros (Fig. 5), (Luzio *et al.*, 2015). El perro es un reconocido hospedero de parásitos internos y externos que están relacionados a procesos infecciosos de relevancia clínica (Opazo *et al.*, 2019). De igual manera, ectoparásitos, tales como garrapatas, piojos y pulgas, están relacionados con procesos clínicos tanto en mascotas como

en seres humanos, favoreciendo la ocurrencia de infecciones de diversa etiología (Irwin, 2002; Opazo *et al.*, 2019).

Así mismo, algunos de estos parásitos son responsables de importantes infecciones de carácter zoonótico, incluyendo parasitosis bien documentadas como hidatidosis, síndrome de larva migrans cutánea y visceral, y sarna sarcóptica, así como otras infecciones reemergentes como rickettsiosis, criptosporidiasis y giardiasis (Acha & Szyfres, 2003; Opazo *et al.*, 2019). En el caso de la transmisión por *E. canis*, los huéspedes afectados experimentan una recuperación parcial entre 20 y 30 días después de la infección, a la que suele seguir una fase subclínica a crónica grave que se considera un estado de portador durante la cual las garrapatas vectores podrían adquirir y diseminar el patógeno a otros huéspedes (Bremer *et al.*, 2005).



Fig. 5. *Canis lupus familiaris* raza pastor alemán (Sgroi, 2012).

III.- ANTECEDENTES

En Estados Unidos el primer caso de ehrlichiosis canina fue documentado por Ewing, (1963), cuando se estaba estudiando un caso de infección por *Babesia canis*, este hallazgo sugiere que *E. canis* también podría coinfectar a los perros junto con *B. canis*.

Por otra parte, en México el primer caso de ehrlichiosis canina fue documentado por García Aristizabal y Núñez Ochoa, 1996. El paciente era un canino macho Golden Retriever de siete meses de edad, que fue llevado al hospital para Pequeñas Especies de la UNAM por presentar síntomas como depresión, hiporexia y una infestación masiva con garrapatas. Las pruebas de laboratorio mostraron un hemograma con variaciones típicas observadas en casos agudos y la presencia de mórulas y cuerpos elementales en leucocitos.

En Chile se reportó un caso de ehrlichiosis en un canino hembra de 10 años de edad, mestizo siberiano, con antecedentes de infestación frecuente por garrapatas, proveniente de la ciudad de Arica. Los síntomas presentados eran anorexia y sangrado bucal, la sintomatología no mejoró tras una terapia inicial con vitamina B y antimicrobianos (metronidazol y espiramicina), por lo que los dueños solicitaron la eutanasia debido al deterioro progresivo. Previo a la eutanasia se obtuvo una muestra de sangre por sospecha clínica de ehrlichiosis. La muestra se analizó mediante la técnica de touch down PCR, utilizando los cebadores EHR-OUT1 y EHR-OUT2. Para identificar la especie de *Ehrlichia* se secuenció el producto de la primera PCR con el cebador reverso EHR-OUT2 obteniendo un fragmento de 210 pares de bases. Esta secuencia mostró homología de 100% con la cepa de *E. canis* (DQ915970.1), (López et al., 2012).

En un estudio realizado por Núñez-Ochoa (2003), se estudió la seroprevalencia de *E. canis* en México. Para ello se evaluaron 2,395 perros en todo el país, de los cuales 1,523 presentaron o tuvieron garrapatas, de estos, 793

resultaron positivos a *E. canis*. Esta investigación mostró que la región norte y el sureste son consideradas zonas enzoóticas de alta importancia. Así mismo, cabe destacar que el Estado de Chiapas ocupó el octavo lugar a nivel nacional con una prevalencia del 41.7%.

Anteriormente la especie *E. ewingii* había sido considerada como una nueva cepa de *E. canis*, ya que Ewing *et al.*, (1971) la habían encontrado en los granulocitos (principalmente neutrófilos), y produjo una forma leve de ehrlichiosis canina. Sin embargo, Anderson *et al.*, (1992) demostraron mediante análisis de PCR, que esta cepa en realidad era otra especie de *Ehrlichia*, por lo que decidieron nombrarla como *Ehrlichia ewingii*, en honor a Sidney Ewing por su trabajo pionero con este agente (Gutiérrez *et al.*, 2016).

Existe un sólo reporte de *E. ewingii* en Camerún, donde se encontró en 2 perros naturalmente infectados (Ndip *et al.*, 2005).

En la ciudad de Belgrado, Serbia, se realizó un estudio donde se tomaron muestras de sangre de 111 perros, de los cuales 46 eran de refugio, 31 vagabundos y 34 de caza. Para evaluar el estado de los anticuerpos de *E. ewingii* se utilizó un ensayo SNAP. Al finalizar el estudio, los resultados demostraron que había sólo un perro que era seroreactivo con el SNAP para *E. ewingii* (Kovačević Filipović *et al.*, 2018)

En los Estados Unidos, *A. platys* se considera mínimamente patógena y, generalmente, se reconoce como un hallazgo accidental durante los exámenes de frotis sanguíneos (Ettinger & Feldaman, 2007). Esto se debe a que *A. platys* puede coinfectar junto con *E. canis*, como lo demostraron Rufino *et al.*, (2013), quienes reportaron por primera vez la presencia de *E. canis* y *A. platys* infectando a perros en la región amazónica del norte de Brasil.

En un estudio realizado por Tateishi T *et al.*, (2015), se confirmó la presencia de *A. platys* en caninos domésticos, en la zona de Lima Metropolitana, en Perú. Esto se logró mediante la identificación de corpúsculos de inclusión en

plaquetas y a través de la técnica Hemi-Nested PCR en muestras de sangre periférica. Se recolectaron 144 muestras de sangre entre enero y diciembre de 2012. De estas, el 29.2% (42/144) fue positiva (individuos trombocitopénicos con presencia de corpúsculos de inclusión en plaquetas) y el 12.5% (18/144) resultó sospechoso (individuos no trombocitopénicos y presencia de corpúsculos de inclusión en plaquetas) a la identificación hematológica. Asimismo, 1.4% (2/144) resultó positivo a la prueba de Hemi-Nested PCR.

Según Ismail *et al.*, (2010), los primeros casos de ehrlichiosis monocítica humana fueron descritos en 1986, y ahora se han notificado más de 2300 casos a los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en los últimos 19 años. En un estudio realizado en Venezuela se detectó una frecuencia del 13,80% de *Ehrlichia* trombocítica en pacientes que padecen de infección por VIH (Tamí & Tamí-Maury, 2004). Por otra parte, se creía que *E. ewingii* era un patógeno exclusivo de los perros, sin embargo, Buller *et al.*, (1999) registraron 4 casos de humanos que fueron infectados por esta bacteria.

En México las infecciones de *Ehrlichia* en los humanos no está bien estudiada, sin embargo, el primer caso de ehrlichiosis humana se reportó en un paciente masculino de 41 años de edad, proveniente de la Península de Yucatán, las manifestaciones clínicas incluyeron hipertermia frecuente, erupción cutánea, mialgia, dolor de cabeza, anorexia, fatiga y tos (Gongóra-Biachi *et al.*, 1999). Posteriormente, en Oaxaca se reportó un caso de infección por *E. canis* en un estilista veterinario que estuvo en contacto con perros (Beatriz Silva *et al.*, 2014). Un par de años más tarde, Sosa-Gutierrez *et al.*, (2016), reportaron el caso de una mujer proveniente del Estado de México, la cual presentó síntomas como fiebre, trombocitopenia, escalofríos, dolores musculares, pérdida de apetito y dolor de cabeza, la mujer murió tras haber estado hospitalizada durante 10 días.

El caso más reciente fue documentado por Alcántara-Rodríguez *et al.*, (2020), cuando un hombre sin hogar de 35 años de edad que vivía en la Ciudad

de México, fue ingresado al hospital después de un intento de suicidio. El paciente estuvo hospitalizado durante 65 días y registró episodios febriles persistentes y disfunción del sistema de coagulación, por lo que se procedió a realizar una PCR para determinar al agente infeccioso, el cual se trató de *E. chaffeensis*.

IV.- OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Detectar a *Ehrlichia* sp. y *Anaplasma* sp. en perros domésticos mediante un estudio de casos y controles

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

Comparar los datos demográficos y clínicos en los grupos de casos y controles de perros domésticos

Determinar el perfil hematológico de los perros domésticos de casos y controles.

Investigar la presencia de *E. canis*, *E. ewingii* y *A. platys* en perros domésticos.

Determinar la relación entre el cuadro clínico, los datos demográficos y la presencia de *Ehrlichia* sp. y *Anaplasma* sp.

4.3. HIPÓTESIS

Las muestras de sangre recolectadas de los perros domésticos de Tuxtla Gutiérrez darán positivo para *E. canis*, *E. ewingii* y *A. platys*.

V.- ZONA DE ESTUDIO

En este trabajo se reclutaron perros domésticos que acuden al Hospital Veterinario Pet's, ubicado en la colonia Plan de Ayala, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, entre los $16^{\circ}46'07.4''N$ y $93^{\circ}10'40.3''W$ (Fig. 6).

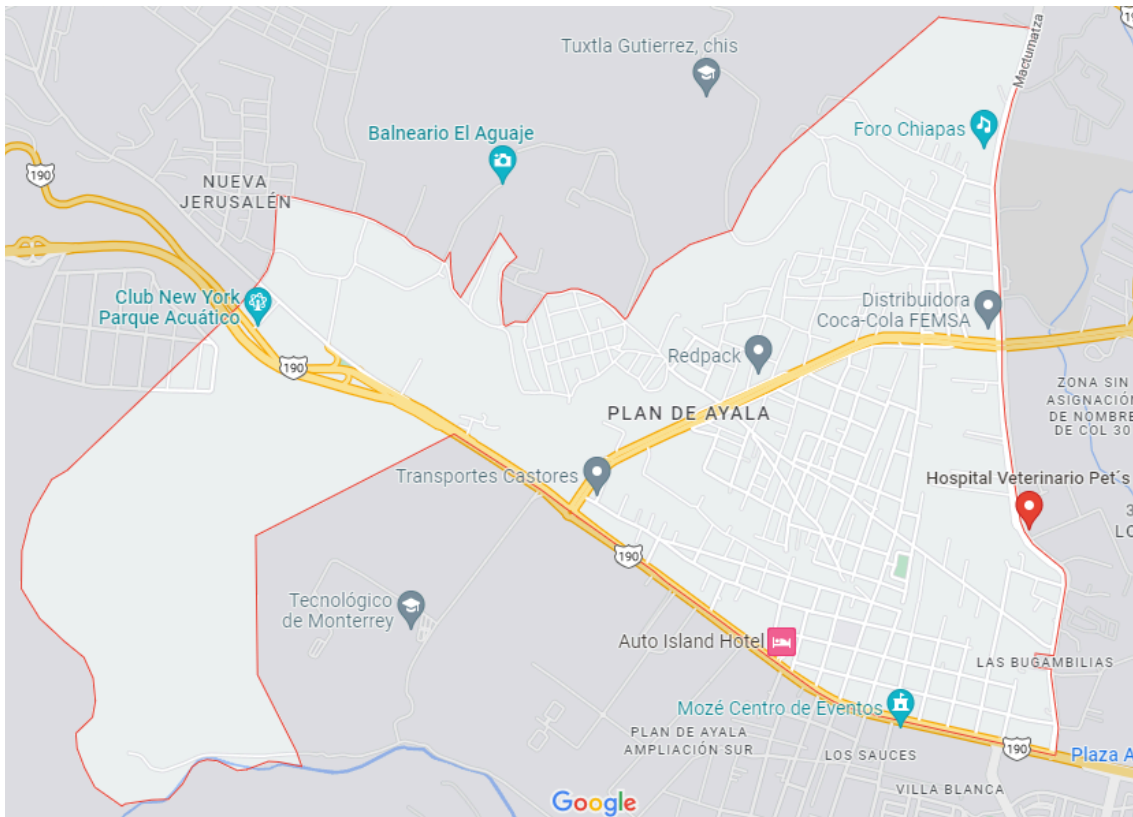


Fig. 6. Ubicación del Hospital Veterinario Pets (INEGI, 2022)

El municipio de Tuxtla Gutiérrez se ubica en la región económica I Metropolitana, limita al norte con los Municipios de San Fernando y Osumacinta, al este con Chiapa de Corzo, al sur con Suchiapa y al oeste con Ocozocoautla de Espinosa y Berriozábal (Ruíz-Arriaga, 2014) (Fig. 7).



Fig. 7. Ubicación de Tuxtla Gutiérrez en el Estado de Chiapas

5.1. FISIOGRAFÍA

La región Metropolitana se ubica en las regiones fisiográficas: Depresión Central, Montañas del Norte y Altos de Chiapas; el relieve del terreno está formado principalmente de sierras, valles y lomeríos. La altura del relieve varía entre los 175 y los 1,763 msnm. Las principales elevaciones ubicadas dentro de la región son: los cerros Tierra Colorada (1,235 m), El Chupadero (1,190 m) y Mactumactzá (1,149 m) (Secretaría de Hacienda, 2012).

5.2. GEOLOGÍA

La superficie de la región Metropolitana presenta siete tipos de roca y se compone de suelos terciarios, predominan tres tipos, caliza (34.46%), limonita-arenisca (29.01%), y lutita-arenisca (16.55%). También de suelos cretácicos: limolita (7.35%) y aluvial (07.22%). Otras composiciones variadas de suelo conforman el 05.40% restante de la superficie de la región (Secretaría de Hacienda, 2012).

5.3. CLIMA

Los climas existentes en el municipio son: Cálido subhúmedo con lluvias en el verano, de menor humedad, que abarca el 99.71% de la superficie municipal.

También se reporta el clima cálido subhúmedo con lluvias en el verano, de mediana humedad, que abarca el 0.29% de la superficie municipal. La temperatura media anual es de 25,4°C. La temporada cálida dura desde mediados de febrero hasta septiembre. El período más caluroso del año es desde abril hasta la segunda semana de mayo donde se alcanzan temperaturas alrededor de los 40°C. La temporada fresca dura desde la segunda semana de noviembre hasta mediados de febrero. El período más frío del año es el mes de diciembre cuando la temperatura puede llegar a descender hasta 8°C. La precipitación pluvial oscila según las áreas municipales y es en promedio 900 mm anuales. La temporada normal de lluvias abarca desde mayo hasta la segunda semana de octubre. Normalmente, los meses más lluviosos son junio y septiembre (naturalista, 2017).

5.4. HIDROGRAFÍA

Las principales corrientes fluviales en las inmediaciones de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez son los ríos Grijalva, El Sabinal, Suchiapa, Yatipak, Terán, San Agustín, San Francisco y Guadalupe. Dentro de la ciudad el río más importante es El Sabinal que nace en el municipio de Berriozábal, fluye por el valle central de Tuxtla, atraviesa la ciudad hacia el oriente y desemboca en el Río Grijalva. Originalmente el Río El Sabinal era alimentado por 7 arroyos, pero debido al crecimiento de la ciudad, la mayoría de estos arroyos se encuentran entubados o han sido cubiertos por la mancha urbana, no obstante en su cabecera recibe importantes aportes de los Ríos San Agustín y San Francisco que se ubican hacia el norte y sur de El Sabinal respectivamente (Ruíz-Arriaga, 2014).

5.5. FLORA

Predomina la selva alta o mediana subcaducifolia y selva baja caducifolia. Dentro de esta región se encuentran diferentes especies de árboles, de maderas preciosas tales como la caoba (*Swietenia macrophylla*) y el cedro (*Cedrela odorata*). Otras especies que se pueden distribuir en el territorio son: palo de rosa (*Tabebuia rosea*), chicozapote (*Manilkara zapota*), aguacatillo (*Persea caerulea*),

guachipilín (*Diphysa americana*), limoncillo (*Cymbopogon citrattus*), otate (*Otatea* spp), roble (*Quercus* spp). (Secretaría de Hacienda, 2012).

5.6. FAUNA

Esta región se caracteriza por encontrarse en la ruta de emigración de aves peregrinas del noroeste al sureste. Podemos encontrar especies nativas como: urraca (*Pica* spp), zanate (*Quiscalus* spp), tortolita (*Columbina* spp), paloma bravía (*Columba livia*), buitre negro americano (*Coragyps atratus*), tlacuache (*Didelphis marsupialis*), zorro gris (*Lycalopex* spp), varias especies de serpientes, conejo cola de algodón, ardilla, diversas especies de ratones silvestres, de murciélagos y dos especies de iguana. En los reptiles destacan el turipache, cuija, agujilla, mazacuata, iguana de roca, lagartija metálica, culebra ranera, bejuquilla nauyaca de río y voladora, sin olvidar el lagarto de río y cocodrilo. Entre las aves se ha descrito el pajuil, chachalaca, colibrí, carpintero, zanate, quetzal, zopilote, gavilancillo, codorniz, golondrina, paloma morada, tortolita, cotorra, tapacaminos, tecolotito, pico de hacha, pico real y la tiríscula (Secretaría de Hacienda, 2012).

VI.- MÉTODOS

6.1. ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES

Se aplicó la técnica de casos incidentes con periodos de exposición o latencia prolongados, para ello se incluyeron a los perros con un aparente cuadro de ehrlichiosis y/o anaplasmosis. Para la selección de controles se recurrió a la técnica de pareamiento, ya que la selección de controles se basa en función de una o varias características comunes a los casos, como el sexo, la edad, el peso, entre otras (Lazcano-Ponce *et al.*, 2001).

6.2 TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE

Criterios de inclusión

Los perros que presentaron un cuadro sugestivo de ehrlichiosis o anaplasmosis, así como perros aparentemente sanos para fungir como controles.

Criterios de exclusión

Se excluyeron a perros que no viven en Chiapas, con diagnóstico previo de ehrlichiosis/anaplasmosis y bajo tratamiento de antibióticos.

Para la toma de muestras de sangre, los médicos veterinarios se encargaron de realizar el manejo de los caninos de acuerdo a los protocolos establecidos para evitar el sufrimiento animal. La muestra de sangre constó de 3 mL por cada perro y se tomó de la vena yugular, con agujas desechables y envases Vacutainer con EDTA. Posteriormente se procedió a realizar una evaluación hematológica de la sangre. Una vez elaborada dicha evaluación, las muestras de sangre fueron refrigeradas para sus próximos usos en los ensayos de PCR.

6.3. EVALUACIÓN HEMATOLÓGICA

Los estudios correspondientes a la química clínica e inmunológicos fueron realizados por los biólogos del Hospital Veterinario Pets. Para la citometría hemática se utilizó el método de Impedancia Eléctrica (Equipo VetScan Abaxis HMII), en tanto que el análisis de células sanguíneas se hizo con microscopía, tiñendo las láminas con colorante de Wright, pH 6.4±0.1. Para la prueba de anticuerpos anti-*Ehrlichia* y anti-*Anaplasma*, se utilizó la prueba comercial CANIV-4 ®.

6.4. EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL

Se realizó una extracción y purificación del ADN de cada una de las muestras obtenidas para su posterior amplificación mediante los pares de cebadores para la PCR-1 y PCR-anidada. Para este propósito se utilizó el equipo comercial DNeasy® Blood & Tissue Kit (50), siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN total que se extrajo de las muestras, fue almacenado a -20 °C. Para la visualización, se separó en un gel de agarosa (1% p/v,) el que se tiñó en bromuro de etidio mediante inmersión en una concentración de 20 µg/mL, y buffer TBE (Trizma Base, Ácido Bórico, EDTA), a una concentración final de 0,5 X; para la electroforesis se incluyó un marcador de peso molecular de 1 kb; la electroforesis se realizó a 100 voltios por 35 minutos y las bandas se visualizaron en un transiluminador (Enduro GDS)

6.5. DIAGNÓSTICO CON PCR ANIDADA

Para la detección específica de *E. canis*, *E. ewingii* y *A. platys*, a partir de sangre de los caninos con síntomas de la enfermedad o con antecedentes de contacto con garrapatas, se utilizaron un par de cebadores que amplifican el ADNr 16S: *ECC* y *ECB*. Este par de cebadores fueron utilizados para la primera reacción de PCR, ya que amplifican para el género *Ehrlichia* y adicionalmente para otras

procariotas como *Anaplasma* spp (Dawson *et al.*, 1994). Una vez amplificada esta región del ADN, se utilizó esta misma como plantilla para la segunda PCR (o PCR-anidada) (Rojas-Triviño *et al.*, 2013) en la cual se acoplaron los cebadores de manera independiente para cada reacción: *ECAN5* y *HE3* para *E. canis*, *EE52* y *HE3* para *E. ewingii* y *ApysF* y *ApysR* para *A. platys*.

Para comenzar se tomaron alícuotas de 2 µL de ADN, las cuales se emplearon para la amplificación de un segmento de la región 16S del ARNr que corresponde a las especies de *Ehrlichia* y *Anaplasma* (Dawson *et al.*, 1994); el amplificado resultante, fue sometido nuevamente a amplificación de manera individual (PCR-anidada), con un segundo par de cebadores específicos para cada una de las especies sujetas a estudio: *E. canis*, *E. ewingii* y *A. platys*, respectivamente.

La primera reacción de PCR, se hizo en un volumen total de 25 µL, conteniendo 12 µL de GoTaq® Green Master Mix, 9 µL de agua libre de nucleasas, 2 µL los cebadores *ECC* (5' AGA ACG AAC GCT GGC GGC AAG CC 3') y *ECB* (5' CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC 3') (Dawson *et al.*, 1994), en una dilución de 10 µM y 2 µL del ADN extraído y purificado.

La reacción de PCR-anidada, se llevó a cabo bajo las mismas condiciones de la primera PCR. Para esta PCR, el amplificado de la primera se diluyó en proporción 1:30 en agua libre de nucleasas y posteriormente, se tomaron 2 µL de esta dilución como plantilla para ser amplificada con el segundo par de cebadores específicos de cada especie, siendo *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') para *E. canis* (Rojas-Triviño *et al.*, 2013), *EE52* (5' CGAACAATTCCTAAATAGTCTCTGAC 3') y *HE3* para *E. ewingii* (Murphy *et al.*, 1998) y *ApysF* (5' GTCGAACGGATTTTTGTCGT 3') y *ApysR* (5' TAGATCACCGCCTTGGTAGG 3') para *A. platys* (Rufino *et al.*, 2013).

El perfil térmico para la amplificación con el primer par de cebadores, se hizo en 35 ciclos con una desnaturalización inicial a 94°C/1 min y desnaturalización por ciclo a 94°C/30 segundos; la hibridación de los cebadores *ECC* y *ECB* se realizó a 68°C/2 min con una extensión a 72°C/2 min y una extensión final a la misma temperatura por un tiempo de 5 minutos. El perfil térmico para los cebadores *ECAN5* y *HE3*, consistió de 37 ciclos con una desnaturalización inicial a 94°C/1 min y desnaturalización por ciclo a la misma temperatura por 30 segundos. La hibridación de los cebadores, se ejecutó a 60°C/2 min, con una extensión por ciclo a 72°C/1,5 min y una extensión final a la misma temperatura por 5 minutos (Rojas-Triviño et al., 2013).

Las reacciones con los cebadores específicos de la especie *E. ewingii* se hicieron en dos fases. La primera consistió en 3 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, recocido a 55°C durante 2 minutos y extensión a 72°C durante 1,5 minutos. La segunda se hizo en 37 ciclos de desnaturalización a 92°C durante 1 minuto, recocido a 55°C durante 2 minutos y extensión a 72°C durante 1,5 minutos (Murphy et al., 1998).

Para el caso de *A. platys*, la reacción de amplificación consistió en 10 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 62°C, y 1 min a 72°C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C y 1 minuto a 72°C. Con una extensión de 3 minutos a 94°C y una extensión final de 5 minutos a 72°C (Rufino et al., 2013).

Los productos resultantes de las dos amplificaciones (PCR-1 y PCR-anidada) fueron separados en geles de agarosa 1,5%, buffer TBE 0,5 X (Trizma Base, Ácido Bórico, EDTA 0,5 M), bromuro de etidio (0,5 µg/mL), 100 V/35 minutos y se visualizaron bajo un transiluminador de luz ultravioleta. El tamaño de las bandas se calculó por comparación con un marcador de 100 pb de DNA (Rojas-Triviño et al., 2013).

6.6 SECUENCIACIÓN

Los amplicones obtenidos se enviaron para secuenciación (Eurofins Genomics LLC) y las secuencias se compararon con las disponibles en la base de datos GenBank.

6.7 ANÁLISIS DE DATOS

Los datos de las frecuencias fueron calculadas con el programa IBM SPSS Statistics 25 en su versión para Windows 10. Por otra parte, la comparación de variables como edad y peso, así como los parámetros de la biometría hemática, se lograron mediante la prueba T de Student o U de Mann-Whitney, según fuera el caso, haciendo uso del programa SigmaPlot versión 12.0 para Windows 10.

VII.- RESULTADOS

7.1 DATOS DEMOGRÁFICOS

Para esta investigación se incluyeron a un total de 28 perros (N=28) que acudieron al Hospital Veterinario Pet's, desde septiembre de 2022 hasta enero de 2023. La población se dividió de acuerdo a su condición clínica en controles (perros aparentemente sanos) y casos (perros con cuadros sugestivos a ehrlichiosis/anaplasmosis), registrándose 13 controles y 15 casos.

La raza más común en el grupo de perros controles fue la de Chihuahua (30.8%) y para los casos, la mayoría fueron perros de raza Criolla (46.7%). Los análisis estadísticos indicaron que no existe una asociación significativa entre la raza y ehrlichiosis y anaplasmosis ($p>0.05$) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Razas de los perros agrupados en controles y casos en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

Raza	Población de controles (N=13)	Población de casos (N=15)
Criolla	3 (23.1%)	7 (46.7%)
Husky Siberiano	0 (0.0%)	2 (13.3%)
Pug	0 (0.0%)	2 (13.3%)
Pastor Belga	2 (15.4%)	0 (0.0%)
Maltés	1 (7.7%)	1 (6.7%)
Beagle	0 (0.0%)	1 (6.7%)

Bull Terrier inglés	0 (0.0%)	1 (6.7%)
Bulldog francés	0 (0.0%)	1 (6.7%)
Chihuahua	4 (30.8%)	0 (0.0%)
Pit Bull	1 (7.7%)	0 (0.0%)
Pastor alemán	2 (15.4%)	0 (0.0%)
Total	13 (100%)	15 (100%)
Chi cuadrado	$\chi^2=17.5$	
Valor de P	P=0.13	

La mayoría de perros de ambos grupos (casos y controles) provenía de la zona Este de la ciudad (57.1 y 42.9%, respectivamente). Sin embargo no se encontró una relación significativa entre la zona de procedencia con ehrlichiosis/anaplasmosis (Cuadro 5).

Cuadro 5. Región de procedencia en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, de los controles y casos.

Región	Controles (N=13)	Casos (N=15)
Norte	3 (37.5%)	5 (62.5%)
Centro	0 (0.0%)	2 (100%)

Sur	0 (0.0%)	2 (100%)
Este	8 (57.1%)	6 (42.9%)
Oeste	2 (100%)	0 (0.0%)
Chi cuadrado	X ² =6.6	
Valor de P	P=0.14	

La mediana de la edad de los controles fue de cuatro años, mientras que la de los casos fue de cinco años. La mediana de peso de los controles fue de 15 Kg y 13.5 Kg para los casos (Cuadro 3). Por otra parte, se registró un mayor número de machos para los controles (53.8%), mientras que en los casos fueron más hembras (66.7%) (Cuadro 3). De acuerdo a las pruebas estadísticas, no se encontró una asociación entre la edad, el sexo o el peso con la condición clínica (casos o controles) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Sexo, edad y peso de controles y casos.

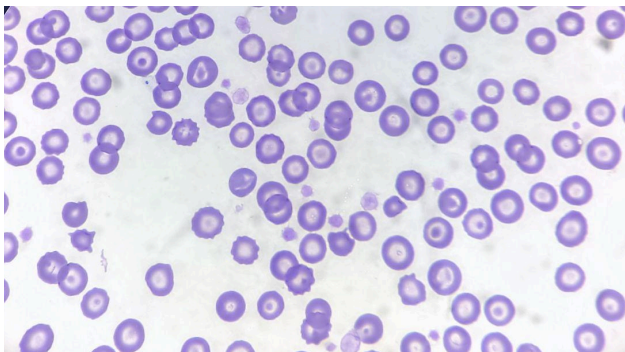
Variables		Controles (N=13)		Casos (N=15)		P
Sexo	Hembra	6 (37.5%)		10 (62.5%)		0.4
	Macho	7 (58.3%)		5 (41.7%)		
		Media (± DE)	Media na	Media (± DE)	Media na	P

Edad (años)	4.5 (4.2)	4.0	5.1 (3.8)	5.0	0.66
Peso (Kg)	16.0 (14.2)	15.0	13.8 (8.2)	13.5	0.90

7.2 EVALUACIÓN HEMATOLÓGICA

Los perros del grupo de los casos presentaron anemia normocítica hipocrómica (Fig. 8A), trombocitopenia y leucocitosis por neutrofilia con desviación a la izquierda (Fig. 9A), en comparación con los controles (Cuadro 7).

A



B

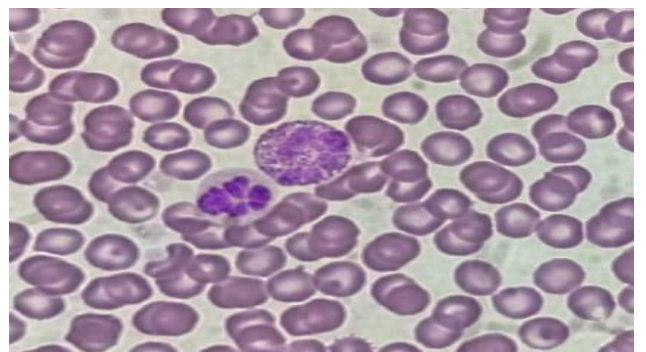


Fig. 8. Eritrocitos hipocrómicos en un perro del grupo de casos. B, Eritrocitos normocrómicos en un perro del grupo de controles.

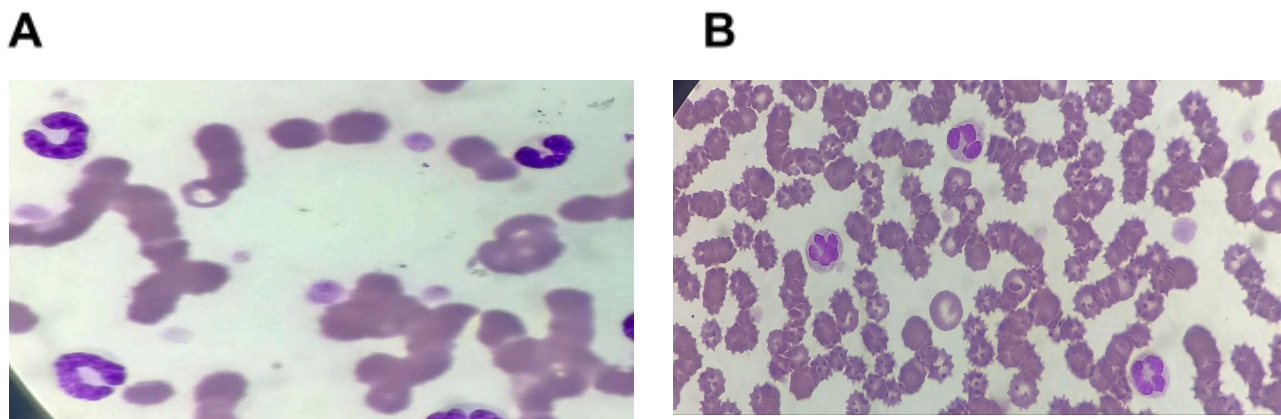


Fig. 9. A, Neutrófilos en banda (desviación a la izquierda) en un perro del grupo de casos. B, Neutrófilos segmentados en un perro del grupo de controles.

Cuadro 7. Evaluación hematológica en perros de Chiapas, México.

Variables		Controles (N=13)		Casos (N=15)		
Parámetros hematológicos	Serie Roja	Media (± DE)	Media na	Media (± DE)	Media na	P
Eritrocitos ($\times 10^{12}/L$)		7.1 (0.8)	7.2	5.1 (2.2)	5.2	0.01*
Hemoglobina (g/dL)		15.4 (2.1)	15.9	10.5 (5.1)	11.1	0.00*

Hematocrito (%)		48.5 (5.9)	50.9	34.6 (15.9)	36.6	0.01*
MCV (fl)		68.3 (2.5)	69.0	66.0 (7.7)	66.0	1.00
MCH (pg)		21.6 (1.1)	21.6	19.8 (2.6)	21.3	0.11
MCHC (g/dL)		31.7 (1.3)	31.7	29.9 (1.8)	30.4	0.00*
RDW (%)		16.2 (0.9)	15.9	17.8 (3.2)	16.4	0.05*
Plaquetas (x10 ⁹ /L)		289.7 (185.7)	231	185.4 (165.2)	185.0	0.03*
MPV (fl)		8.8 (1.37)	No aplica	8.0 (1.6)	No aplica	0.17
Sólidos totales (g/dL)		6.9 (0.7)	7.0	7.6 (1.7)	7.9	0.14
Parámetros hematológicos	Serie Blanca	Media (± DE)	Media na	Media (± DE)	Media na	P
Leucocitos totales (x10 ⁹ /L)		11.9 (3.6)	12.6	24.4 (15.8)	22.0	0.01*
Neutrófilos segmentados (x10 ⁹ /L)		10.0 (4.6)	9.5	18.9 (13.5)	16.7	0.03*

Neutrófilos en banda (x10 ⁹ /L)	1.5 (5.5)	0.0	1.71 (1.72)	1.3	0.01*
Eosinófilos (x10 ⁹ /L)	0.9 (1.0)	0.7	0.5 (1.20)	0.1	0.02*
Monocitos (x10 ⁹ /L)	0.3 (0.2)	0.2	0.9 (0.7)	0.8	0.03*
Linfocitos (x10 ⁹ /L)	3.1 (1.8)	2.5	2.3 (1.7)	1.2	0.08

*P<0.05

7.3 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E INMUNOLÓGICO DE EHRLICHIOSIS/ANAPLASMOSIS

En el grupo de los casos, más de la mitad de los perros presentaron ectoparásitos (pulgas o garrapatas). Los signos más frecuentemente observados fueron: vómito y depresión (ambos con un 46.7%) (Cuadro 8), por lo que se buscó la presencia de anticuerpos frente a *Ehrlichia* y *Anaplasma* mediante la prueba comercial CANIV-4® (Fig.10).

Cuadro 8. Signos del grupo clínico.

		Grupo clínico	
		Controles N%= 13 (100%)	Casos N%=15 (100%)
Presencia de ectoparásitos N (%)		4 (30.8%)	8 (53.3%)
Signos	Anorexia	Ausente	4 (26.7%)
	Depresión	Ausente	7 (46.7%)
	Diarrea	Ausente	4 (26.7%)
	Vómito	Ausente	7 (46.7%)

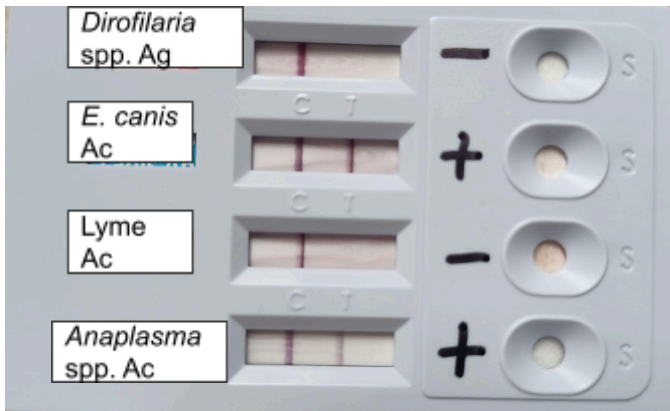


Fig. 10. Prueba rápida para detección de anticuerpos para *E. canis* y *Anaplasma* spp. Ag: antígeno; Ac: anticuerpo.

Dicho test se realizó a 9/15 perros (60%) del grupo de casos, de los cuales la mayoría fueron reactivos (77.78%). El 100% de los casos recibieron tratamiento

con un antibiótico del grupo de las tetraciclinas y un inhibidor de la bomba de protones (Cuadro 9).

Cuadro 9. Diagnóstico inmunológico de ehrlichiosis/anaplasmosis en perros de Chiapas, México.

		Grupo clínico	
		Controles N%= 13 (100%)	Casos N%=15 (100%)
Reactivo a anticuerpos <i>Ehrlichia/Anaplasma</i> N (%)	Anticuerpos anti- <i>Ehrlichia canis</i>	N / R	2 (13.33%)
	Anticuerpos anti- <i>Anaplasma</i>	N / R	2 (13.33%)
	Anticuerpos anti- <i>Ehrlichia/Anaplasma</i>	N / R	3 (20%)
Tratamiento con doxiciclina (10 mg/Kg) y omeprazol (0.5-1.5 mg/Kg) por 30 días.		N / R	15 (100%)

N/R: no realizado.

Se registró el tiempo de evolución reportado por los dueños de los pacientes, el cual comprende desde el inicio de los síntomas hasta el momento en que llegaron a consulta médica. El tiempo de evolución para cada paciente fue variable, siendo un año el mayor tiempo de evolución, en tanto que el más frecuente fue de un día. De los 15 perros del grupo de casos, fallecieron 4, la información sobre el estado de los demás perros del grupo de casos no fue posible recuperarla por motivos ajenos a los médicos (Cuadro 10).

Cuadro 10. Tiempo de evolución y resultado de los pacientes

Paciente (Grupo de casos)	Fecha de consulta médica	Tiempo de evolución (días)	Procedencia	Resultado
ANA-1	24/09/2022	365	Externo	Fallecido
ANA-2	24/09/2022	4	Externo	Fallecido
ANA-3	24/09/2022	1	Interno	Indeterminado
ANA-4	24/09/2022	2	Interno	Fallecido
ANA-5	25/09/2022	14	Interno	Indeterminado
ANA-6	28/09/2022	1	Interno	Indeterminado
ANA-7	28/09/2022	3	Interno	Fallecido
ANA-9	17/10//2022	1	Interno	Indeterminado
ANA-10	15/10//2022	2	Interno	Indeterminado
ANA-11	17/10//2022	1	Interno	Indeterminado
ANA-12	12/10//2022	1	Interno	Indeterminado
ANA-13	22/10//2022	84	Interno	Indeterminado
ANA-14	22/10//2022	1	Interno	Indeterminado
ANA-16	17/11/2022	2	Externo	Indeterminado
ANA-17	14/11/2022	2	Interno	Indeterminado

7.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE EHRlichiosis/ANAPLASMOSIS EN PERROS DE CHIAPAS, MÉXICO

7.4.1. Extracción y purificación de ADN

Para realizar las reacciones de PCR, primeramente se extrajo ADN total a partir de muestras de sangre, mediante el equipo comercial DNeasy® Blood & Tissue Kit

(50). Se utilizó un espectrofotómetro (BioSpectrometer, Eppendorf) para medir la concentración y la absorbancia A260/A280 de los productos resultantes de la purificación. Las concentraciones obtenidas fueron de 5 µg/mL hasta 59.6 µg/mL. En cuanto a la absorbancia, se obtuvieron valores de 0.21 hasta 36.24 (Cuadro 11).

Cuadro 11. Muestras de ADN obtenidas de sangre de perros de Chiapas, México y absorbancia a 260/280 nm.

Identificación de la muestra	Absorbancia a 260/280 nm	Concentración de ADN (µg/mL)
ANA-1	2.01	40.9
ANA-2	1.96	27.2
ANA-3	1.88	32.8
ANA-4	1.95	30.5
ANA-5	1.96	31.3
ANA-6	1.93	26.3
ANA-7	1.14	32.9
ANA-8	0.21	5.0
ANA-9	13.88	42.4
ANA-10	14.36	39.3

ANA-11	1.14	30.6
ANA-12	6.16	37.7
ANA-13	2.52	28.6
ANA-14	4.02	59.6
ANA-15	36.24	39.5
ANA-16	8.24	35.7
ANA-17	1.60	41.5
ANA-18	2.18	8.6
ANA-19	20.49	39.4
ANA-20	10.19	44.3
ANA-21	12.21	43.2
ANA-22	1.83	20.0
ANA-23	0.60	7.4
ANA-24	10.73	52.5
ANA-25	2.02	24.9
ANA-26	3.08	27.5

ANA-27	2.08	36.6
ANA-28	12.90	45.8
Promedio N=28	6.4	33.2
Desviación estándar N=28	7.9	12.5

Posteriormente se realizaron gels de agarosa al 1% para visualizar la presencia de ADN de cada una de las muestras; para calcular el tamaño de utilizó un marcador molecular de 1 kb y en todas las muestras se logró apreciar una banda de ADN superior a 10 kb pares de bases (Fig.11).

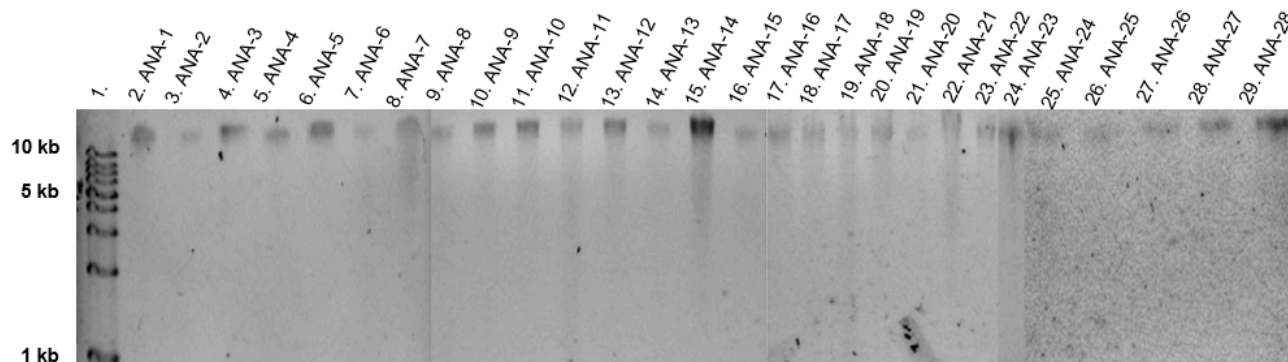


Fig. 11. Electroforesis de bandas de ADN purificado a partir de muestras de sangre de perros en Chiapas, México. Carril: 1 MPM 1 kb; 2-29 muestras de ADN obtenidas de perros domésticos en Chiapas, México.

7.4.2. PCR anidada para *E. canis*, *E. ewingii* y *A. platys*

La reacción de PCR para los géneros *Ehrlichia/Anaplasma* generó un producto de aproximadamente 483 pb en tres muestras del grupo de casos (ANA-3, ANA-4 y ANA-7) (Fig. 11A). A partir de estos, la prueba de PCR específica para *E. canis* amplificó un producto de 388 pb en los pacientes ANA-4 y ANA-7; además, en

esta última muestra también se obtuvo un amplicón de 396 pb en la PCR específica para *E. ewingii*. La PCR específica para *A. platys*, reveló una banda de 212 pb en la muestra ANA-3 (Fig. 12B).

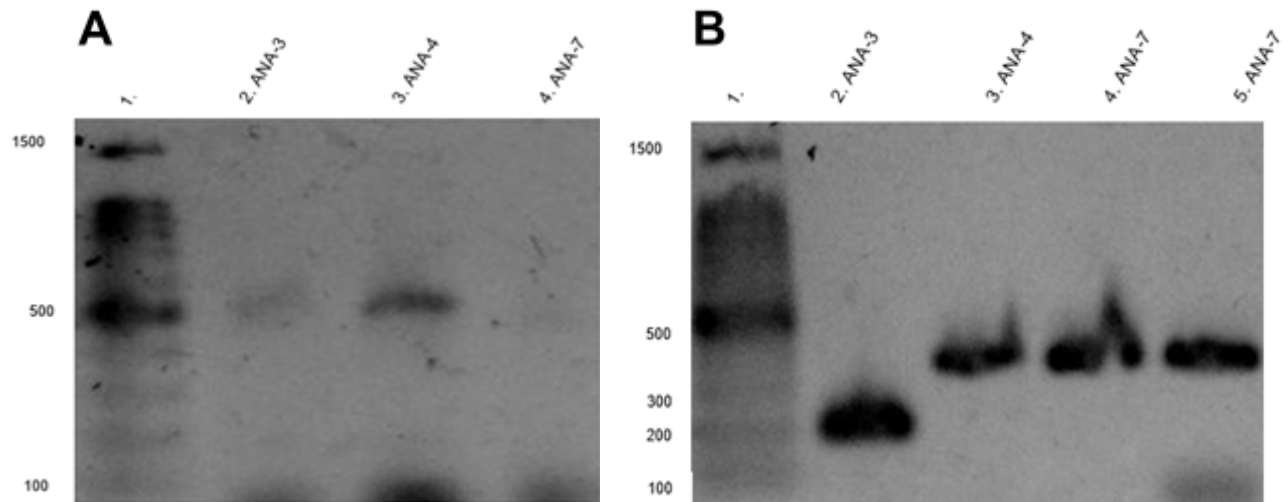


Fig. 12. Diagnóstico molecular de ehrlichiosis y anaplasmosis en perros de Chiapas, México. A, PCR para *Ehrlichia* y *Anaplasma*. Carriles: 1, MPM de 100 pb; 2-4, amplicones de 500 pb en pacientes ANA-3, ANA-4 y ANA-7, respectivamente. B, Detección de *E. canis*, *E. ewingii* y *A. platys* en perros de Chiapas, México. Carriles: 1, ladder de 100 pb; 2, amplicón de *A. platys* en perro ANA-3; 3-4, amplicón de *E. canis* en perros ANA-4 y ANA-7, respectivamente; 5, amplicón de *E. ewingii* en perro ANA-7.

Un 26.6% de las muestras del grupo de casos fueron positivas a la presencia de amplicones de *Ehrlichia/Anaplasma*; sin embargo en el grupo de controles, ninguno de los perros exhibieron productos de amplificación correspondientes a estas dos bacterias (Cuadro 12).

Cuadro 12. Diagnóstico molecular de ehrlichiosis/anaplasmosis en perros de Chiapas, México.

		Grupo clínico	
		Controles N%= 13 (100%)	Casos N%=15 (100%)
PCR positiva N (%)	<i>E. canis</i>	0 (0.0%)	2 (13.33%)
	<i>E. ewingii</i>	0 (0.0%)	1 (6.67%)
	<i>A. platys</i>	0 (0.0%)	1 (6.67%)

7.5 SECUENCIACIÓN DE LOS AMPLICONES OBTENIDOS

Se detectó la presencia de *A. platys* (ApysF y ApysR) en el perro ANA-3 mediante la secuenciación de los amplicones de dicha bacteria, los cuales corresponden a la amplificación de la secuencia del gen 16S rRNA, en tanto que en las muestras ANA-4 y ANA-7 se identificaron segmentos de ADN que corresponden al gen 16S rRNA de *E. canis* (ECAN5 y HE3) (Cuadro 13). Por otra parte, se obtuvieron segmentos de ADN correspondientes al gen 16S rRNA de *E. ewingii* (EE52 y HE3) de la muestra ANA-7, lo que indicaría un proceso de coinfección entre *E. canis* y *E. ewingii*; dichas secuencias mostraron una similitud del 99% entre las secuencias de las muestras y las de referencia publicadas en GenBank.

Cuadro 13. Secuencias de amplicones obtenidos por PCR en perros de Chiapas, México.

ID Paciente	ID Secuencia	Oligonucleótidos	No. de acceso en GenBank
ANA-3	<i>Anaplasma platys</i> clone JGJ1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	ApysF (5'-3')	OR238372.1
ANA-3	<i>Anaplasma platys</i> clone JGJ2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	ApysR (3'-5')	OR238373.1
ANA-4	<i>Ehrlichia canis</i> clone JGJ3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	ECAN5 (5'-3')	OR238374.1
ANA-4	<i>Ehrlichia canis</i> clone JGJ4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	HE3 (3'-5')	OR238375.1
ANA-7	<i>Ehrlichia canis</i> clone JGJ5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	ECAN5 (5'-3')	OR238376.1
ANA-7	<i>Ehrlichia ewingii</i> clone JGJ6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	EE52 (5'-3')	OR238377.2

ANA-7	<i>Ehrlichia ewingii</i> clone JGJ7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	HE3 (3'-5')	OR238378.2
-------	--	-------------	----------------------------

VIII.- DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como objetivo buscar mediante PCR la presencia de fragmentos de ADN de bacterias de la familia Anaplasmataceae, específicamente *E. canis*, *E. ewingii* y *A. platys*, en el que se reclutaron 28 pacientes caninos divididos en grupos de casos y controles. Los datos demográficos recolectados exhibieron que la raza no está asociada con la condición clínica (caso o control), sin embargo, se observó una mayor proporción de raza criolla dentro del grupo de casos, por lo tanto, se puede deducir que los perros en situación de calle son más proclives a infectarse con estas bacterias intracelulares, en comparación con los perros cautivos. Por otra parte, Nyindo *et al.*, (1980), sugieren que la raza de pastor alemán parece ser la más susceptible, ya que en la fase más grave de la enfermedad muestra una mayor morbilidad y mortalidad, en comparación con otras razas de caninos.

De igual manera, condiciones como el sexo, la edad, el peso y la zona de procedencia no se asociaron con condición clínica (caso o control). Algunos autores han llegado a resultados similares en relación a que la ehrlichiosis no tiene predilección por la condición de la edad o el sexo y pone en peligro los sistemas orgánicos del huésped de manera diferente y con distintos grados de severidad (Da Silva *et al.*, 2013; de Castro *et al.*, 2004; Guerrero-Puentes, 2016; Gutiérrez *et al.*, 2016; Munhoz *et al.*, 2012). Sin embargo, Huerto-Medina & Dámaso-Mata, (2015), mencionan que al evaluar la relación entre la edad del canino categorizado por grupos, y el diagnóstico de *E. canis*, se determinó que existe relación significativa entre ambas variables. Por lo tanto, la condición de adulto está relacionada con la presencia de *E. canis*.

En el grupo de casos, más de la mitad presentaron ectoparásitos (Cuadro 5), sin embargo, nuestros resultados mostraron que no hay una diferencia significativa entre los pacientes que presentaron, a diferencia con lo reportado por

Huerto-Medina & Dámaso-Mata, (2015), ya que ellos encontraron que la condición de tener mayor cantidad de garrapatas está relacionada con la presencia de *E. canis*. Es probable que los perros del grupo control que sí tuvieron ectoparásitos pero no fueron positivos al diagnóstico molecular, no estuvieron en contacto durante mucho tiempo con el vector, lo que habría dificultado la transmisión de los hemoparásitos hacia el perro, ya que como mencionan Nelson & Couto, (2020) el vector debe permanecer unido al hospedador al menos durante 24 o 48 horas para transmitir el microorganismo.

Por otra parte, en el grupo de casos los signos más frecuentes fueron: vómito y depresión (ambos con un 46.7%). De manera similar Kidd *et al.*, (2017), también reportaron signos gastrointestinales en pacientes con enfermedad canina transmitida por vectores. El tratamiento que recibieron todos los perros del grupo de casos consistió en administrar dosis de doxiciclina (10 mg/Kg) y omeprazol (0.5-1.5 mg/Kg) durante 30 días (cuadro 6). La doxiciclina es un antibiótico bacteriostático ya que inhibe la síntesis proteica de microorganismos sensibles (de Melo, 2023), habitualmente aparece una mejoría clínica en las primeras 24 a 48 horas de iniciado el tratamiento en perros con enfermedad en fase aguda o crónica moderada, sin embargo, pueden ser necesarios períodos de hasta un año para la recuperación completa, y en casos de infección crónica, las hemorragias y las infecciones coexistentes pueden contribuir a la muerte, a pesar de iniciar el tratamiento con tetraciclinas (Ettinger & Feldaman, 2007).

Los resultados de cada biometría hemática mostraron que la anemia normocítica hipocrómica, trombocitopenia, así como la leucocitosis por neutrofilia con desviación a la izquierda, pueden sugerir un cuadro de ehrlichiosis/anaplasmosis, en comparación a los perros del grupo de controles, resultados similares fueron reportados en los trabajos de Benavides Montaña & Ramírez, (2003); López *et al.*, (2012); Tateishi T *et al.*, (2015). Sin embargo, en la biometría hemática no son exclusivos de enfermedades como ehrlichiosis/anaplasmosis, ya que se pueden presentar anemias por pérdidas de

sangre, parasitismo de gusanos intestinales, deficiencias nutricionales, exposición a sustancias tóxicas, enfermedades de la médula ósea, etc. A su vez, la leucocitosis por neutrofilia con desviación a la izquierda, puede deberse a un proceso inflamatorio y/o infeccioso por otro tipo de microorganismos como los piógenos.

A más de la mitad de los perros del grupo de casos se le realizó una prueba rápida para buscar la presencia de anticuerpos anti-*Ehrlichia* y anti-*Anaplasma*, siendo el 46.66% de los perros reactivos en las pruebas de inmunocromatografía, de los cuales dos presentaron anti-*E. canis* (13.33%), dos anti-*Anaplasma* (13.33%) y tres (20%) presentaron anticuerpos anti-*Ehrlichia/Anaplasma* simultáneamente.

La reacción de PCR para los géneros *Ehrlichia/Anaplasma* generó un producto de aproximadamente 483 pb en tres muestras del grupo de casos (ANA-3, ANA-4 y ANA-7). Este resultado es similar al que presentan Rojas-Triviño et al., (2013). A partir de estos casos, la prueba de PCR específica para *E. canis* amplificó un producto de 388 pb en los pacientes ANA-4 y ANA-7; además, en esta última muestra también se obtuvo un amplicón de 396 pb en la PCR específica para *E. ewingii*. Por otro lado, la PCR específica para *A. platys*, reveló una banda de 212 pb en la muestra ANA-3. Nuestros productos de PCR coinciden con los registrados por Murphy et al., (1998); Rojas-Triviño et al., (2013); Rufino et al., (2013), quienes también amplificaron el gen ADNr 16S de estas especies de hemoparásitos, obteniendo amplicones con la misma cantidad de pares de bases.

Cabe destacar que el paciente positivo a *A. platys*, no fue reactivo mediante la prueba de inmunocromatografía, lo cual indicaría un falso negativo en la prueba rápida, esto puede deberse a una exposición muy pronta con la bacteria, lo cual no permitiría el tiempo suficiente para la seroconversión con la presencia de anticuerpos IgG (Dawson et al., 1996). Así mismo, la técnica de PCR nos permitió identificar un caso de coinfección, ya que el paciente ANA-7 fue positivo tanto a *E.*

canis como a *E. ewingii*, esto coincide con lo documentado por Meinkoth *et al.*, (1998), quienes encontraron un caso de coinfección entre *E. canis* y *E. ewingii* al observar mórulas en monocitos y granulocitos en un canino de Oklahoma, finalmente, corroboraron los hallazgos mediante una PCR anidada para dichas especies de *Ehrlichia*. Estos resultados demuestran la sensibilidad de la técnica de PCR frente a otras técnicas de laboratorio para el diagnóstico de *Ehrlichia* spp y *Anaplasma* spp.

Debido a la ausencia de un control positivo, la secuenciación de los amplicones obtenidos (Cuadro 10), y que señalaron la pertenencia al gen 16S rRNA, confirmó la presencia de *A. platys*, *E. canis* y *E. ewingii*, en los perros domésticos diagnosticados en el grupo de casos, lo que permite considerarlos como controles positivos a estas bacterias. Este mismo gen ha sido utilizado en estudios previos, en donde los autores también encontraron la presencia de ADN perteneciente a *E. canis*, *E. ewingii* y *A. platys* (Díaz-Medina *et al.*, 2016; Murphy *et al.*, 1998; Ojeda-Chi *et al.*, 2019; Rojas-Triviño *et al.*, 2013; Rufino *et al.*, 2013).

En resumen, los resultados del presente estudio confirman la presencia de *E. canis*, *E. ewingii* y *A. platys* en perros domésticos de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. La secuenciación de los amplicones de las pruebas de PCR realizadas revelaron la presencia de material genético específico de dichas bacterias. Este hallazgo es de gran importancia, ya que a nivel nacional y regional, son esporádicos los estudios sobre la Ehrlichiosis/Anaplasmosis canina, mientras que a nivel local existe un sólo estudio similar (Núñez Ochoa, 2003), en el que señala que el Estado de Chiapas ocupó el octavo lugar a nivel nacional con una seroprevalencia de *E. canis* del 41.7%, mientras que en este trabajo, de los 15 perros del grupo de casos, sólo se confirmaron 3 mediante PCR. En este sentido, una de las limitaciones de este estudio fue el tamaño de la muestra, ya que estuvo condicionado por la cantidad limitada de reactivos disponibles. Esto podría haber

afectado la representatividad de la población canina estudiada y la precisión de nuestras estimaciones.

Por otra parte, los hallazgos realizados en esta investigación también son de interés para la salud pública, ya que *E. canis* y *E. ewingii* son considerados patógenos zoonóticos, debido a que también pueden infectar a los seres humanos a través de la mordedura de las garrapatas. Por lo que una detección temprana, así como la identificación de estas infecciones en la población canina, son fundamentales para prevenir la transmisión a los seres humanos.

En última instancia, nuestro estudio destaca la importancia de realizar pruebas de detección como la PCR, debido a su alta sensibilidad, así como promover medidas preventivas, como el control de garrapatas en las poblaciones caninas para mitigar el riesgo de infección por *E. canis*, *E. ewingii* y *A. platys*, así como para proteger la salud pública.

IX.- CONCLUSIONES

- Entre los perros analizados en Chiapas, México, no se encontró una asociación entre la edad, el sexo o el peso con la condición clínica (casos o controles).
- El 77.78% de los casos (N=7/9) exhibieron anticuerpos contra *Ehrlichia/Anaplasma*.
- Los perros del grupo de los casos exhibieron anemia, trombocitopenia, leucocitosis, neutrofilia y desviación a la izquierda.
- Se obtuvieron dos amplicones para *E. canis*, uno para *E. ewingii* y uno para *A. platys*.
- La secuenciación de los amplicones confirmó la presencia de *E. canis*, *E. ewingii* y *A. platys*.
- Se reporta por primera vez la presencia de *A. platys* y *E. ewingii* en perros del estado de Chiapas.
- Se reporta un caso de coinfección entre *E. canis* y *E. ewingii*.

X.- PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES

- Debido a que en la presente investigación se ha demostrado la presencia de *E. canis*, *E. ewingii* y *A. platys* en perros domésticos del Estado de Chiapas, y que a su vez, nuestro Estado cuenta con las condiciones climáticas óptimas para la propagación de las garrapatas, las cuales son el principal vector de estas bacterias, se recomienda que en futuros estudios se considere evaluar la prevalencia de casos reportados para el Estado de Chiapas ya que esto puede ayudar a identificar zonas de alto riesgo y tomar medidas preventivas adecuadas.
- Por otra parte, tanto *E. canis* como *E. ewingii* son agentes zoonóticos, por lo que en futuros estudios se debería considerar evaluar la presencia de estos hemoparásitos en seres humanos, esto con el fin de prevenir al sector salud sobre casos emergentes de ehrlichiosis/anaplasmosis y que la población en general tome las debidas precauciones para preservar su salud y la de sus familiares.

XI.- REFERENCIAS

- Ábrego, L., Dolz, G., Romero, J.J., Bernardo, V., Meneses, A., 2009. Detección molecular de *Anaplasma platys* en perros de Costa Rica. *Cienc. Vet.* 27, 71–80.
- Acha, P.N., Szyfres, B., 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre ya los animales: Volumen III: Parasitosis. Organización Panamericana de la Salud.
- Alcántara-Rodríguez, V.E., Sánchez-Montes, S., Contreras, H., Colunga-Salas, P., Fierro-Flores, L., Avalos, S., Rodríguez-Rangel, F., Becker, I., Walker, D.H., 2020. Human Monocytic Ehrlichiosis, Mexico City, Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* 26, 3016–3019. <https://doi.org/10.3201/eid2612.200520>
- Anderson, B.E., Greene, C.E., Jones, D.C., Dawson, J.E., 1992. *Ehrlichia ewingii* sp. nov., the etiologic agent of canine granulocytic ehrlichiosis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 299–302. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-2-299>
- Aragón-López, C., Luna-Nevárez, P., Ortiz-Encinas, V., Leyva-Corona, J., Cantú-Soto, E., Reyna-Granados, J., 2021. Detección molecular de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* y *Rickettsia rickettsii* en caninos domésticos del municipio de Cajeme, Sonora, México. *Abanico Vet.* 11, 2021–42.
- Barrantes-González, A.V., Jiménez-Rocha, A.E., Romero-Zuñiga, J.J., Dolz, G., 2016. Serology, molecular detection and risk factors of *Ehrlichia canis* infection in dogs in Costa Rica. *Ticks Tick-Borne Dis.* 7, 1245–1251. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.07.006>
- Beatriz Silva, A., Pina Canseco, S., Gabriel de la Torre, M.D.P., Mayoral Silva, A., Mayoral, M.Á., Pérez-Campos Mayoral, L., López Martínez, J., Pérez-Campos, E., 2014. Asymptomatic human infection from contact with dogs: a case of human ehrlichiosis. *Gac. Med. Mex.* 150, 171–174.
- Benavides Montaña, J., Ramírez, G., 2003. Ehrlichiosis canina. *Rev. Colomb.*

Cienc. Pecu. 16, 6.

- Bremer, W.G., Schaefer, J.J., Wagner, E.R., Ewing, S.A., Rikihisa, Y., Needham, G.R., Jittapalapong, S., Moore, D.L., Stich, R.W., 2005. Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet. Parasitol.* 131, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.04.030>
- Buller, R.S., Arens, M., Hmiel, S.P., Paddock, C.D., Sumner, J.W., Rikihisa, Y., Unver, A., Gaudreault-Keener, M., Manian, F.A., Liddell, A.M., Schmulewitz, N., Storch, G.A., 1999. *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. *N. Engl. J. Med.* 341, 148–155. <https://doi.org/10.1056/NEJM199907153410303>
- Chang, W.L., Pan, M.J., 1996. Specific amplification of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimens by two-step PCR. *J. Clin. Microbiol.* 34, 3142–3146.
- Clarkin, O., 2015. *naturalista*. [Imagen en línea]. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/photos/35335096> [Último acceso: 2022].
- Cruz, A.C., Zweygarth, E., Ribeiro, M.F.B., da Silveira, J.A.G., de la Fuente, J., Grubhoffer, L., Valdés, J.J., Passos, L.M.F., 2012. New species of *Ehrlichia* isolated from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* shows an ortholog of the *E. canis* major immunogenic glycoprotein gp36 with a new sequence of tandem repeats. *Parasit. Vectors* 5, 291. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-291>
- Da Silva, A.S., Munhoz, T.D., Faria, J.L.M., Vargas-Hernández, G., Machado, R.Z., Almeida, T.C., Moresco, R.N., Stefani, L.M., Tinucci-Costa, M., 2013. Increase nitric oxide and oxidative stress in dogs experimentally infected by *Ehrlichia canis*: effect on the pathogenesis of the disease. *Vet. Microbiol.* 164, 366–369. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.003>
- Dantas-Torres, F., 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit. Vectors* 3, 26. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-26>
- Dawson, J.E., Biggie, K.L., Warner, C.K., Cookson, K., Jenkins, S., Levine, J.F.,

- Olson, J.G., 1996. Polymerase chain reaction evidence of Ehrlichia chaffeensis, an etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia. Am. J. Vet. Res. 57, 1175–1179.
- Dawson, J.E., Stallknecht, D.E., Howerth, E.W., Warner, C., Biggie, K., Davidson, W.R., Lockhart, J.M., Nettles, V.F., Olson, J.G., Childs, J.E., 1994. Susceptibility of white-tailed deer (Odocoileus virginianus) to infection with Ehrlichia chaffeensis, the etiologic agent of human ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. 32, 2725–2728. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.11.2725-2728.1994>
- de Castro, M.B., Machado, R.Z., de Aquino, L.P.C.T., Alessi, A.C., Costa, M.T., 2004. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. Vet. Parasitol. 119, 73–86. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.012>
- de Melo, G., 2023. Doxiciclina para el tratamiento de enfermedades infecciosas en perros. [WWW Document]. Vanguard. Vet. URL <https://www.vanguardiaveterinaria.com.mx/doxiciclina-para-el-tratamiento-de-enfermedades-infecciosas-en-perros> (accessed 10.16.23).
- Díaz-Medina, O.C., Bolio-González, M.E., Rodríguez-Vivas, R.I., Gutiérrez-Ruíz, E.J., Pérez-Osorio, C., Díaz-Medina, O.C., Bolio-González, M.E., Rodríguez-Vivas, R.I., Gutiérrez-Ruíz, E.J., Pérez-Osorio, C., 2016. Molecular survey of Ehrlichia canis in dogs from Mexico: prevalence of infection and possible associated factors. Ecosistemas Recur. Agropecu. 3, 251–257.
- Dolz, G., Ábrego, L., Romero, L.E., Campos-Calderón, L., Bouza-Mora, L., Jiménez-Rocha, A.E., 2013. Ehrlichiosis y anaplasmosis en Costa Rica. Acta Médica Costarric. 55, 34–40.
- Domínguez Alvarez, G.G., 2011. Prevalencia e identificación de hemoparásitos (Ehrlichia canis, Babesia canis y Anaplasma phagocytophilum) en perros de la ciudad de Cuenca (Tesis de Licenciatura). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.

- Doudier, B., Olano, J., Parola, P., Brouqui, P., 2010. Factors contributing to emergence of Ehrlichia and Anaplasma spp. as human pathogens. *Vet. Parasitol., Ticks and Tick-borne Pathogens* 167, 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.016>
- Doyle, C.K., Labruna, M.B., Breitschwerdt, E.B., Tang, Y.-W., Corstvet, R.E., Hegarty, B.C., Bloch, K.C., Li, P., Walker, D.H., McBride, J.W., 2005. Detection of Medically Important Ehrlichia by Quantitative Multicolor TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction of the dsb Gene. *J. Mol. Diagn. JMD* 7, 504–510.
- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R. 2001, 2001. 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.* 51, 2145–2165. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>
- Ettinger, S., Feldaman, E., 2007. *Tratado de Medicina interna Veterinaria*, 6th ed. Elsevier, Madrid.
- Ewing, S.A., 1963. Observations on leukocytic inclusion bodies from dogs infected with Babesia canis. *J Am Vet Med Assoc* 143, 503-506.
- Ewing, S.A., Roberson, W.R., Buckner, R.G., Hayat, C.S., 1971. A new strain of Ehrlichia canis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 159, 1771–1774.
- Farriols Estrada, F. M., 2017. *naturalista*. [Imagen en línea]. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/photos/7124514> [Último acceso: 2022].
- Franco-Zetina, M., Adame-Gallegos, J., Dzul-Rosado, K., Franco-Zetina, M., Adame-Gallegos, J., Dzul-Rosado, K., 2019. Efectividad de los métodos diagnósticos para la detección de ehrlichiosis monocítica humana y canina. *Rev. Chil. Infectol.* 36, 650–655.

<https://doi.org/10.4067/S0716-10182019000500650>

- García Aristizabal, C., Núñez Ochoa, L., 1996. Pancitopenia tropical en un perro. *Rev. AMMVEPE* 7, 235–236.
- Goldman, E.E., Breitschwerdt, E.B., Grindem, C.B., Hegarty, B.C., Walls, J.J., Dumler, J.S., 1998. Granulocytic ehrlichiosis in dogs from North Carolina and Virginia. *J. Vet. Intern. Med.* 12, 61–70.
- Gongóra-Biachi, R.A., Zavala-Velázquez, J., Castro-Sansores, C.J., González-Martínez, P., 1999. First Case of Human Ehrlichiosis in Mexico. *Emerg. Infect. Dis. J.* 5. <https://doi.org/10.3201/eid0503.990327>
- Greene, RT., 1997. Ehrlichiosis canina: implicaciones clínicas de factores humorales., in: Kirk: *Terapéutica Veterinaria de Pequeños Animales*. McGraw-Hill Interamericana, México, pp. 317–320.
- Guerrero Puentes, C., 2016. Problemática de la ehrlichiosis canina vista desde el aspecto teórico y el aspecto clínico en una clínica veterinaria de Bogotá (Central de Urgencias Veterinarias) (Tesis de Licenciatura). Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Bogotá, Colombia.
- Gutiérrez, C.N., Pérez-Ybarra, L., Agrela, I.F., 2016. Ehrlichiosis Canina. *SABER Rev. Multidiscip. Cons. Investig. Univ. Oriente* 28, 641–665.
- Guzmán-Cornejo, C., Robbins, R., Guglielmone, A., Montiel, G., Pérez, T., 2011. The *Amblyomma* (Acari: Ixodida: Ixodidae) of Mexico: Identification Keys, Distribution and Hosts. *Zootaxa* 16–38.
- Harrus, S., Waner, T., 2011. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *Vet. J. Lond. Engl.* 1997 187, 292–296. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.02.001>
- Harvey, J.W., Simpson, C.F., Gaskin, J.M., 1978. Cyclic thrombocytopenia induced by a Rickettsia-like agent in dogs. *J. Infect. Dis.* 137, 182–188. <https://doi.org/10.1093/infdis/137.2.182>
- Horak, I.G., Camicas, J.-L., Keirans, J.E., 2002. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Exp. Appl.*

- Acarol. 28, 27–54. <https://doi.org/10.1023/a:1025381712339>
- Huber, D., Reil, I., Duvnjak, S., Jurković, D., Lukačević, D., Pilat, M., Beck, A., Mihaljević, Ž., Vojta, L., Polkinghorne, A., Beck, R., 2017. Molecular detection of *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Wolbachia* sp. but not *Ehrlichia canis* in Croatian dogs. *Parasitol. Res.* 116, 3019–3026. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5611-y>
- Huerto-Medina, E., Dámaso-Mata, B., 2015. Factores asociados a la infección por *Ehrlichia canis* en perros infestados con garrapatas en la ciudad de Huánuco, Perú. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* 32, 756–760.
- INEGI, 2022. Google Maps [WWW Document]. Google Maps. URL <https://www.google.com/maps/place/Plan+de+Ayala,+Tuxtla+Guti%C3%A9rez,+Chis./@16.7723821,-93.1940619,14.75z/data=!4m12!1m6!3m5!1s0x85ecd9656579ac8f:0x634c9993c872e926!2sHospital+Veterinario+Pet%C2%B4s!8m2!3d16.7685105!4d-93.1778597!3m4!1s0x85ecdbeaf36b7409:0xed320a4d5c961c2e!8m2!3d16.7726174!4d-93.1905192> (accessed 9.23.22).
- Irwin, P.J., 2002. Companion animal parasitology: a clinical perspective. *Int. J. Parasitol.* 32, 581–593. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00361-7](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00361-7)
- Ismail, N., Bloch, K.C., McBride, J.W., 2010. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clin. Lab. Med.* 30, 261–292. <https://doi.org/10.1016/j.cl.2009.10.004>
- Jacinto, V., 2011. *naturalista*. [Imagen en línea]. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/photos/1995655> [Último acceso: 2022].
- Kidd, L., Qurollo, B., Lappin, M., Richter, K., Hart, J. r., Hill, S., Osmond, C., Breitschwerdt, E. b., 2017. Prevalence of Vector-Borne Pathogens in Southern California Dogs With Clinical and Laboratory Abnormalities Consistent With Immune-Mediated Disease. *J. Vet. Intern. Med.* 31, 1081–1090. <https://doi.org/10.1111/jvim.14735>
- Kovačević Filipović, M.M., Beletić, A.D., Ilić Božović, A.V., Milanović, Z., Tyrrell, P., Buch, J., Breitschwerdt, E.B., Birkenheuer, A.J., Chandrashekar, R., 2018.

- Molecular and Serological Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *Ehrlichia canis*, *E. chaffeenses*, *E. ewingii*, *Borrelia burgdorferi*, *Babesia canis*, *B. gibsoni* and *B. vogeli* among Clinically Healthy Outdoor Dogs in Serbia. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* 14, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.10.001>
- Lazcano-Ponce, E., Salazar-Martínez, E., Hernández-Avila, M., 2001. Estudios epidemiológicos de casos y controles. Fundamento teórico, variantes y aplicaciones. *Salud Pública México* 43, 135–150.
- Liddell, A.M., Stockham, S.L., Scott, M.A., Sumner, J.W., Paddock, C.D., Gaudreault-Keener, M., Arens, M.Q., Storch, G.A., 2003. Predominance of *Ehrlichia ewingii* in Missouri dogs. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4617–4622. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.10.4617-4622.2003>
- López, J., Abarca, K., Mundaca, M.I., Caballero, C., Valiente-Echeverría, F., 2012. Identificación molecular de *Ehrlichia canis* en un canino de la ciudad de Arica, Chile. *Rev. Chil. Infectol.* 29, 527–530. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182012000600008>
- Lorenzo Monterrubio, C., Rioja Paradela, T., Carrillo Reyes, A., Bolaños Citalán, J., Sántiz, E.C., Navarrete Gutiérrez, D., Lorenzo Monterrubio, C., Rioja Paradela, T., Carrillo Reyes, A., Bolaños Citalán, J., Sántiz, E.C., Navarrete Gutiérrez, D., 2017. Enfermedades zoonóticas virales emergentes. Importancia ecológica y su evaluación en el sureste de México. *Soc. Ambiente* 131–146.
- Luzio, Á., Belmar, P., Troncoso, I., Luzio, P., Jara, A., Fernández, Í., 2015. Formas parasitarias de importancia zoonótica, encontradas en heces de perros recolectadas desde plazas y parques públicos de la ciudad de Los Ángeles, Región del Bío Bío, Chile. *Rev. Chil. Infectol.* 32, 403–407.
- Márquez-Jiménez, F.J., Hidalgo-Pontiveros, A., Contreras-Chova, F., Jesús Rodríguez-Liébaná, J., Ángel Muniain-Ezcurra, M., 2005. Las garrapatas (Acarina: Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos

- patógenos en España. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica* 23, 94–102.
<https://doi.org/10.1157/13071613>
- Meinkoth, J.H., Ewing, S.A., Cowell, R.L., Dawson, J.E., Warner, C.K., Mathew, J.S., Bowles, M., Thiessen, A.E., Panciera, R.J., Fox, C., 1998. Morphologic and molecular evidence of a dual species ehrlichial infection in a dog presenting with inflammatory central nervous system disease. *J. Vet. Intern. Med.* 12, 389–393. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1998.tb02140.x>
- Munhoz, T.D., Faria, J.L.M., Vargas-Hérendez, G., Fagliari, J.J., Santana, A.E., Machado, R.Z., Tinucci-Costa, M., 2012. Experimental *Ehrlichia canis* infection changes acute-phase proteins. *Rev. Bras. Parasitol. Vet. Braz. J. Vet. Parasitol. Orgao Of. Col. Bras. Parasitol. Vet.* 21, 206–212.
<https://doi.org/10.1590/s1984-29612012000300006>
- Murphy, G.L., Ewing, S.A., Whitworth, L.C., Fox, J.C., Kocan, A.A., 1998. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Vet. Parasitol.* 79, 325–339.
[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(98\)00179-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00179-4)
- Mylonakis, M.E., Koutinas, A.F., Billinis, C., Leontides, L.S., Kontos, V., Papadopoulos, O., Rallis, T., Fytianou, A., 2003. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Vet. Microbiol.* 91, 197–204.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00298-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00298-5)
- naturalista, 2017. Tuxtla Gutiérrez, MX, CP [WWW Document]. Nat. Mex. URL <https://www.inaturalist.org/places/tuxtla-gutierrez> (accessed 10.24.22).
- Ndip, L.M., Ndip, R.N., Esemu, S.N., Dickmu, V.L., Fokam, E.B., Walker, D.H., McBride, J.W., 2005. Ehrlichial infection in Cameroonian canines by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*. *Vet. Microbiol.* 111, 59–66.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.08.010>
- Nelson, R., Couto, G., 2020. *Medicina interna de pequeños animales*, 6ta edición, 6ta ed. Grupo Asis, Barcelona, España.

- Núñez Ochoa, 2003. Estudio de la seroprevalencia de Ehrlichia canis en México. AMMVEPE 14, 83–85.
- Nyindo, M., Huxsoll, D.L., Ristic, M., Kakoma, I., Brown, J.L., Carson, C.A., Stephenson, E.H., 1980. Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd Dogs and Beagles to experimental infection with Ehrlichia canis. Am. J. Vet. Res. 41, 250–254.
- Ogden, N., Woldehiwet, Z., Hart, C., 1998. Granulocytic ehrlichiosis: an emerging or rediscovered tick-borne disease? J. Med. Microbiol. 47, 475–482.
- Ojeda-Chi, M.M., Rodriguez-Vivas, R.I., Esteve-Gasent, M.D., Pérez de León, A.A., Modarelli, J.J., Villegas-Perez, S.L., 2019. Ehrlichia canis in dogs of Mexico: Prevalence, incidence, co-infection and factors associated. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 67, 101351. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101351>
- Oliveira, L.S., Oliveira, K.A., Mourão, L.C., Pescatore, A.M., Almeida, M.R., Conceição, L.G., Galvão, M. a. M., Mafra, C., 2009. First report of Ehrlichia ewingii detected by molecular investigation in dogs from Brazil. Clin. Microbiol. Infect. 15, 55–56. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02635.x>
- Opazo, A., Barrientos, C., María Sanhueza, A., Urrutia, N., Fernández, I., 2019. Fauna parasitaria en caninos (Canis lupus familiaris) de un sector rural de la región central de Chile. Rev. Investig. Vet. Perú 30, 330–338.
- Oscherov, E., Milano, A., Lobo, B., Anda, P., Escudero, R., 2011. Detection of Anaplasma platys and other pathogens in ectoparasites from urban hosts in Northeast Argentina. Rev Ibero-Latinoam Parasitol 70, 42–48.
- Rikihisa, Y., Ewing, S., Fox, J., 1994. Western immunoblot analysis of Ehrlichia chaffeensis, E. canis, or E. ewingii infections in dogs and humans. J. Clin. Microbiol. 32, 2107–2112.
- Rikihisa, Y., Ewing, S., Fox, J., Siregar, A.G., Pasaribu, F., Malole, M., 1992. Analyses of Ehrlichia canis and a canine granulocytic Ehrlichia infection. J.

- Clin. Microbiol. 30, 143–148.
- Rodríguez-Vivas, R.I., Cob-Galera, L.A., Domínguez-Alpizar, J.L., 2000. Hemoparásitos en bovinos, caninos y equinos diagnosticados en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatan (1984-1999). Rev. Bioméd. 11, 277–282. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v11i4.245>
- Rojas-Triviño, A., Rueda-Hurtado, A., Díaz, D.M., Mesa-Cobo, N.C., Benavides-Montaña, J.A., Imbachi-López, K., Álvarez-Ríos, L., López, R., 2013. Identificación de Ehrlichia canis (Donatien & Lestoquard) Moshkovski mediante PCR anidada. Vet. Zootecnia 7, 12.
- Rufino, C., Moraes, P., Reis, T., Campos, R., Aguiar, D., McCulloch, J., Meneses, A., Gonçalves, E., 2013. Detection of Ehrlichia canis and Anaplasma platys DNA Using Multiplex PCR. Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N 13. <https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1303>
- Ruíz-Arriaga, D., 2014. Actualización del mapa geológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Sainz, Á., Roura, X., Miró, G., Estrada-Peña, A., Kohn, B., Harrus, S., Solano-Gallego, L., 2015. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. Parasit. Vectors 8, 75. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0649-0>
- Santarelli, E., 2020. *naturalista*. [Imagen en línea]. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/photos/100706815> [Último acceso: 2022].
- Secretaría de Hacienda, 2012. Programa Regional de Desarrollo. Gobierno de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez.
- Sgroi, D., 2012. *Wikipedia commons*. [Imagen en línea]. Disponible en: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cane_da_pastore_tedesco_adulto.jpg [Último acceso: 2022].
- Sosa-Gutierrez, C.G., Solorzano-Santos, F., Walker, D., Torres, J., Serrano, C.A.,

- Gordillo-Perez, G., 2016. Fatal Monocytic Ehrlichiosis in Woman, Mexico, 2013. *Emerg. Infect. Dis. J.* <https://doi.org/10.3201/eid2205.151217>
- Tamí, I. del C. de, Tamí-Maury, I.M., 2004. Identificación morfológica de Ehrlichia sp. en las plaquetas de pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana, en Venezuela. *Rev. Panam. Salud Pública* 16, 345–349.
- Tateishi T, V., Lí E, O., Hoyos S, L., Rivera G, H., Manchego S, A., Barrios A, L., More B, J., 2015. Identificación hematológica y molecular de Anaplasma platys en caninos domésticos de Lima Metropolitana con signos clínicos compatibles con anaplasmosis. *Rev. Investig. Vet. Perú* 26, 111–118. <https://doi.org/10.15381/rivep.v26i1.10920>
- Uzcategui, J., Forlano, M., Mujica, F., Orellana, N., 2019. Participación de Rhipicephalus sanguineus en la transmisión de Anaplasma platys en caninos. *Rev. Investig. Vet. Perú* 30, 1216–1225. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30.i3.15076>
- Vivas, R.I.R., Chi, M.O., González, M.B., Aguilar, J.A.R., 2019. Las garrapatas como vectores de enfermedades zoonóticas en México. *Bioagrociencias* 12.
- Yabsley, M.J., Adams, D.S., O'Connor, T.P., Chandrashekar, R., Little, S.E., 2011. Experimental primary and secondary infections of domestic dogs with Ehrlichia ewingii. *Vet. Microbiol.* 150, 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.02.006>

XII.- ANEXOS

Anexo 1. Constancia de participación en el Foro de Programas de Posgrado e Investigación “La Generación y Aplicación del Conocimiento”, 2023-05-25



Anexo 2. Certificado de participación en el Congreso Veterinario de León
2023-09-05



Anexo 3. Constancia de participación en el programa de radio Divulga UNICACH:
Ciencia, Arte y Humanidades 2023-09-19



La Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas
A través de la
Dirección de Investigación y Posgrado

Otorga

Constancia

al

Biól. Carlos Daniel González González

Por su participación en el Programa de radio
Divulga UNICACH: Ciencia, Arte y Humanidades.
Tema: Proyectos "Diagnóstico de ehrlichiosis y anaplasmosis en perros de
Chiapas, México: reporte del primer caso por Anaplasma platys"
Instituto de Ciencias Biológicas
Transmitido por Radio UNICACH a través del 102.5 FM.
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; a 19 de Septiembre de 2023.




Dra. Carolina Orantes García
Directora de Investigación y Posgrado


Mtra. Guadalupe Moreno Corzo
Coordinadora de Radio UNICACH



unicachfm
Radio universitaria UNICACH 102.5 FM

Anexo 4. Carta de consentimiento informado



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Este documento sirve para que la persona a cargo del cuidado de su mascota, autorice la extracción de sangre, muestra que será utilizada ÚNICAMENTE con fines académicos, para que sea analizada y los resultados sean parte del trabajo de investigación titulado “Diagnóstico de *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii* y *Anaplasma platys*, mediante PCR en perros de una zona urbana de Tuxtla Gutiérrez”.

La venopunción es la técnica por la cual se perfora una vena por vía transcutánea con una aguja o catéter; el objetivo de este procedimiento es la extracción de sangre para su posterior análisis.

El protocolo de recolección de muestra de sangre se tomará de una vena localizada en alguna de las extremidades o en la vena yugular, atendiendo las medidas de asepsia.

El beneficio obtenido de la participación, será contar con un diagnóstico sobre la presencia de hemoparásitos, así como conocer datos de peso y talla, lo cual NO IMPLICA PAGO ALGUNO POR LA PARTICIPACIÓN.

En algunas ocasiones se pueden producir algunos riesgos con este procedimiento como son:

- Un ligero sangrado, será necesario esperar a que cese.
- Aparición de un ligero hematoma (acumulación de sangre debajo de la piel), lo que comúnmente se denomina “morado”, el mismo que se resolverá sin tratamiento al cabo de algunos días.
- Riesgo leve de infección.
- En casos difíciles de extracción de sangre serán necesarias otras punciones adicionales.
- La cantidad total de sangre que se extraiga estará a criterio del médico veterinario responsable de la flebotomía.



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

CERTIFICADO DE CONSENTIMIENTO

Yo, _____,
RESPONSABLE DE LA MASCOTA DE NOMBRE _____, DE SEXO
_____, EDAD _____, CON DOMICILIO EN: _____,

manifiesto que se me ha solicitado dar mi consentimiento para que se le realice una extracción de sangre a mi mascota. Reconozco que me han INFORMADO de manera precisa y clara sobre los riesgos y beneficios de someter a mi mascota a la toma de muestra de sangre. Por lo anterior declaro que he comprendido el procedimiento, me han sido aclaradas todas mis dudas y estoy satisfecho con la información recibida.

Doy mi consentimiento, por mi libre voluntad, sin haber estado sujeto a ningún tipo de presión, por lo que AUTORIZO a la persona encargada, para que efectúe la toma de la muestra de sangre.

FIRMA DEL ENCARGADO DE LA MASCOTA: _____

FIRMA DEL FLEBOTOMISTA: _____

Anexo 5. Base de datos

Base de Datos Tesis Daniel González.xlsx