

## Detección molecular de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma phagocytophilum* y alteraciones hematológicas de perros infectados

Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* and hematological changes of infected dogs

Octavio Merino-Charrez <sup>ID</sup>, Valeria Badillo-Moreno <sup>ID</sup>, Jorge Loredo-Osti <sup>ID</sup>, Hugo Barrios-García <sup>ID</sup>, Verónica Carvajal-de-la-Fuente\* <sup>ID</sup>

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia "Dr. Norberto Treviño Zapata". Universidad Autónoma de Tamaulipas, km 5, Carretera Victoria-Mante, Ciudad Victoria, Tamaulipas, CP 87000, México. \*Autor para correspondencia: Verónica Carvajal-de-la-Fuente. Carretera Victoria-Mante km 5. CP. 87000, Ciudad Victoria, Tamaulipas, México. [omerino@docentes.uat.edu.mx](mailto:omerino@docentes.uat.edu.mx), [valeria.badillo@live.com](mailto:valeria.badillo@live.com), [jlored@docentes.uat.edu.mx](mailto:jlored@docentes.uat.edu.mx), [hbarrios@docentes.uat.edu.mx](mailto:hbarrios@docentes.uat.edu.mx), [vcarvajal@docentes.uat.edu.mx](mailto:vcarvajal@docentes.uat.edu.mx)

### RESUMEN

Las ehrlichiosis y anaplasmosis canina son enfermedades transmitidas por garrapatas, provocadas por bacterias del género *Ehrlichia* y *Anaplasma*. Debido a sus múltiples manifestaciones clínicas, su diagnóstico es un reto para el veterinario. La distribución de estos hemoparásitos incluye áreas donde su principal vector, *Rhipicephalus sanguineus* está presente. Este estudio fue diseñado para determinar la presencia *Ehrlichia canis* y *Anaplasma phagocytophilum*, así como los factores asociados y hallazgos hematológicos comunes en perros de la zona centro de Tamaulipas. Se evaluaron, a través de PCR, 384 muestras de sangre provenientes de animales de diferentes clínicas veterinarias y un refugio. El análisis de datos se realizó con la prueba Chi cuadrada con un nivel de significancia de 0.05. Los resultados muestran que, del total de muestras 103 (26.8%) resultaron positivas a *E. canis*, mientras que para *A. phagocytophilum* no se detectó ningún caso. No se observó asociación significativa con relación al sexo, raza, ni lugar de procedencia ( $p>0.05$ ), a diferencia de la edad, donde se encontró mayor prevalencia de *E. canis* para adultos (15-84 meses) ( $p<0.05$ ). En relación con el hematocrito, conteo de plaquetas, proteínas plasmáticas totales, conteo y diferencial leucocitario, no existió diferencias significativas ( $p>0.05$ ).

**Palabras claves:** *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, PCR, valores hematológicos.

### ABSTRACT

Ehrlichiosis and anaplasmosis are tick-borne diseases caused by bacteria of the genera *Ehrlichia* and *Anaplasma*. Since clinical manifestations are varied and nonspecific, the diagnosis in clinical practice, remains a challenge for veterinarians. Furthermore, the distribution of these infections includes areas where its tick vector, *Rhipicephalus sanguineus* is present. This study was designed to evaluate the prevalence and factors associated with the presence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs from the central area of Tamaulipas. PCR screened 384 canine blood samples obtained from different veterinary clinics and a shelter. The data were analyzed using the Chi-square test ( $P$  level  $<0.05$  for statistical significance). The results showed that 103 (26.8%) out of 384 samples were positive for *E. canis*, while *A. phagocytophilum* was not detected. Statistical analysis did not show relationship between *E. canis* and variables like gender, breed, and origin ( $P>0.05$ ). Nonetheless, there was a statistically significant difference between infected adult dogs (15-84 months) compared to other age groups evaluated ( $p<0.05$ ). Regarding hematocrit, platelets count, plasma protein, total and differential white blood cells counts, none of these parameters were significantly different ( $P>0.05$ ).

**Keywords:** *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, PCR, hematological findings.

## INTRODUCCIÓN

La ehrlichiosis y anaplasmosis son enfermedades de gran importancia tanto para la salud veterinaria como pública, ya que son responsables de enfermedades como la Ehrlichiosis Monocítica y Anaplasmosis Granulocítica Humana (Vieira *et al.*, 2013; Farhan 2015; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2019). Son provocadas por bacterias intracelulares obligadas Gram negativas conocidas como *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma* spp. respectivamente (Harrus y Waner 2011; Stuen *et al.*, 2013). A nivel mundial, los casos se han incrementado considerablemente en los últimos años principalmente en zonas tropicales y subtropicales donde proliferan las garrapatas vectoras (*Rhipicephalus sanguineus* e *Ixodes* spp) (Beugnet y Chalvet-Monfray 2013; Irwin 2014; Little *et al.*, 2014; Battilani *et al.*, 2017). Debido a la cercanía cada vez mayor de las personas con sus mascotas, la probabilidad de picaduras por estos ectoparásitos aumenta considerablemente propiciando a que estas infecciones se están convirtiendo en zoonosis reemergentes (Bhadesiya y Modi 2015; Ismail y McBride 2017).

En México, la Ehrlichiosis canina se reportó por primera vez en 1996, desde entonces el número de casos se ha incrementado considerablemente (Maggi y Krämer 2019); no obstante, el diagnóstico, en muchas ocasiones se basa en signos clínicos sin realizar pruebas de laboratorio que corroboren directa o indirectamente su presencia. El diagnóstico definitivo se centra en técnicas microscópicas; sin embargo, estos métodos tienen baja sensibilidad y especificidad en pacientes con una baja bacteremia, lo cual evita establecer la terapéutica adecuada (Harrus y Waner 2011; Allison y Little 2013). En respuesta a esto, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) surge como una importante herramienta de apoyo a los métodos de diagnóstico convencionales (Almazan *et al.*, 2016; Cetinkaya *et al.*, 2016; de la Fuente *et al.*, 2017).

El estado de Tamaulipas por su ubicación geográfica cuenta con características idóneas que favorecen el desarrollo de garrapatas vectoras de estas enfermedades (Tinoco-Gracia *et al.*, 2009); sin embargo, se desconoce la verdadera magnitud de este problema. Por lo tanto, el principal objetivo de esta investigación fue determinar la presencia de *E. canis* y *A. phagocytophilum*, a través de PCR, en perros naturalmente infectados en la zona centro de Tamaulipas; así como evaluar algunos factores asociados a la presencia de estas enfermedades.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Área de estudio

El presente trabajo se realizó con muestras sanguíneas de perros remitidas (durante el periodo marzo de 2020 a marzo de 2021) al Laboratorio de Parasitología y Análisis Clínicos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia “Dr. Norberto Treviño Zapata”, perteneciente a la Universidad Autónoma de Tamaulipas. Asimismo, con muestras provenientes de varias clínicas veterinaria particulares de la capital de Tamaulipas y algunos municipios aledaños.

### **Población de estudio**

Se utilizó un muestreo no probabilístico, en el cual se analizaron las muestras de pacientes que se remitieron con los siguientes criterios de inclusión: 1) ser del estado de Tamaulipas (zona centro), 2) presentar signos clínicos relacionados con hemoparásitos (fiebre, diarrea, uveítis, petequias, epistaxis, trastornos osteoarticulares, respiratorios, reproductivos y neurológicos), 3) presentar o haber estado en contacto con garrapatas y 4) tener el consentimiento del propietario de la mascota. El tamaño de muestra fue de 384 animales, que es el tamaño de muestra mínima que se obtiene de la fórmula de (n) para proporciones de poblaciones infinitas, ya que no existe un padrón de población canina en la zona a evaluar (Wayne y Chad 2013). Todos los perros fueron manejados de acuerdo con las normas oficiales de bienestar animal establecido por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Tamaulipas.

### **Colección de muestras**

Se obtuvo un mínimo de 3 ml de sangre por punción venosa (vena cefálica), los cuales fueron transferidos rápidamente a un tubo (BD Vacutainer®) con anticoagulante EDTA K<sub>2</sub> (ácido etilendiaminotetraacético potásico). Las muestras se mantuvieron en refrigeración (8°C) por no más de 24 horas antes de ser procesada para su evaluación hematológica. Se guardó una alícuota de sangre en viales de 1.5 ml y se almacenó a -20 °C para su posterior extracción de ADN y prueba de PCR. En todos los casos se registró la edad, sexo, raza y estación del año en que se tomó la muestra de los individuos estudiados.

### **Análisis hematológico**

La determinación de los parámetros hematológicos se realizó de forma inmediata, sin que pasaran más de 4 horas de haber obtenido la sangre para evitar alteraciones morfológicas de las células. Las muestras fueron analizadas en un equipo automatizado (Auto Hematology Analyzer, MINDRAY, BC-2800 Vet; Shenzhen, China). Para la determinación de las proteínas plasmáticas se utilizó el método del microhematocrito, utilizando tubos capilares sin heparina; los cuales se llenaron con  $\frac{3}{4}$  partes con sangre, se sellaron y centrifugados (centrífuga KHT-410E Kendal Import S.A.C Gemmy Taiwan) a 11,500 rpm durante 5 min. El plasma obtenido fue colocado en un refractómetro (American Optical) y se obtuvo el total de proteínas. Se realizó el conteo de diferencial leucocitario de manera manual. El primero consistió en valorar y contar en un frotis sanguíneo (teñido con Diff-Quik™) 100 células nucleadas y así obtener el recuento porcentual de los diferentes leucocitos: neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos. Para determinar si existía la presencia de anemia se tomó en cuenta el valor del hematocrito, el cual fue categorizado en 2 grupos, con y sin presencia de anemia. El conteo de plaquetas y proteínas totales fueron divididos en 2 grupos, animales con y sin trombocitopenia y con y sin presencia de hiperproteinemia respectivamente. El total de

leucocitos, así como sus distintas poblaciones fueron agrupadas como conteos normales, altos y disminuidos.

### **Identificación de hemoparásitos por microscopía**

Para la búsqueda de hemoparásitos por microscopía se elaboraron frotis sanguíneos, los cuales fueron fijados con metanol durante 5 minutos y teñidos con solución Giemsa al 10% durante 15 min. Posteriormente se evaluaron al microscopio con el objetivo de inmersión (100x) múltiples áreas aleatorias de la monocapa y cola del frotis; aquí se buscó la presencia de mórulas (agregados citoplasmáticos de color basofílico) o cualquier otro cuerpo de inclusión compatible con hemoparásitos (Dulmer *et al.*, 2001).

## **ANÁLISIS MOLECULAR**

### **Obtención de ácidos nucleicos**

De las alícuotas de sangre con EDTA almacenadas se realizaron extracciones de ADN mediante el kit comercial de extracción y purificación de ADN (Wizard® Genomic DNA Purification-Promega), de acuerdo con los protocolos establecidos por la compañía. El ADN total extraído fue cuantificado, utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop2000®, Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) y conservado a -20 °C hasta su posterior uso en las pruebas de PCR.

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Para el análisis molecular se amplificó una región del gen GItA (utilizado para la identificación de rickettsias que codifica para la enzima citrato sintasa) para *E. canis* y una región del gen MSP4 (complejo principal de superficie) para *A. phagocytophilum*. Se utilizó el kit GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI USA. Cat. Num: M7122) de acuerdo a los protocolos establecidos por la empresa. Para esto se utilizó 21 µl de solución del kit, 1 µl del cebador sentido, 1 µl del cebador antisentido y 2 µl del ADN de cada muestra para alcanzar un volumen final de 25 µl. Posteriormente las muestras fueron amplificadas en el termociclador (Applied Biosystems™ Num:2720) con el protocolo de amplificación que se muestra en la tabla 1. Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en 600 ml de TAE Buffer, 1X (Promega, Madison, WI USA. Cat. Num: V4271) a 120 V por 40 minutos utilizando el colorante de ácidos nucleicos Diamond Nucleic Acid Dye (Promega, Madison, WI USA. Cat.Num: H1181) y posteriormente visualizando bajo luz UV del transiluminador UVP (Productos Ultravioleta, Inc., California, USA. Cat. Num: TFM-30). Se utilizó como control positivo fragmentos de ADN de longitudes conocidas (*E. canis*, 200 pb; *A. phagocytophilum*: 980 pb) y un marcador de peso molecular de 100 bp DNA Ladder (Promega, Madison, WI USA. Cat. Num: G210A) como referencia.

**Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para cada patógeno, protocolo de amplificación y tamaño del amplificado**

Organismo y gen diana	Secuencia de oligonucleótidos (5'-3')	Programa de amplificación	Tamaño del amplificado (pb)	Referencia
<i>E. canis</i> (GltA)	<i>E. canis</i> Fw ATAAACACGCTGACTTTACTGTTCC <i>E. canis</i> Rev GTGATGAGATAGAGCGCAGTACC	95°C por 5 min 94°C por 30 s 60 °C por 30 s 72 °C por 1 min 72 °C por 7 min 35 ciclos	200	<a href="#">Stich et al., 2002</a>
<i>A. phagocytophilum</i> (Msp4)	MSP4AP5 ATGAATTACAGAGAATTGCTGTAGG MSP4AP3 TTAATTGAAAGCAAATCTTGCTCCTATG	94°C por 5 min 94°C por 30 s 50 °C por 30 s 72 °C por 30 s 72 °C por 7 min 35 ciclos	849	<a href="#">Yousefi et al., 2019</a>

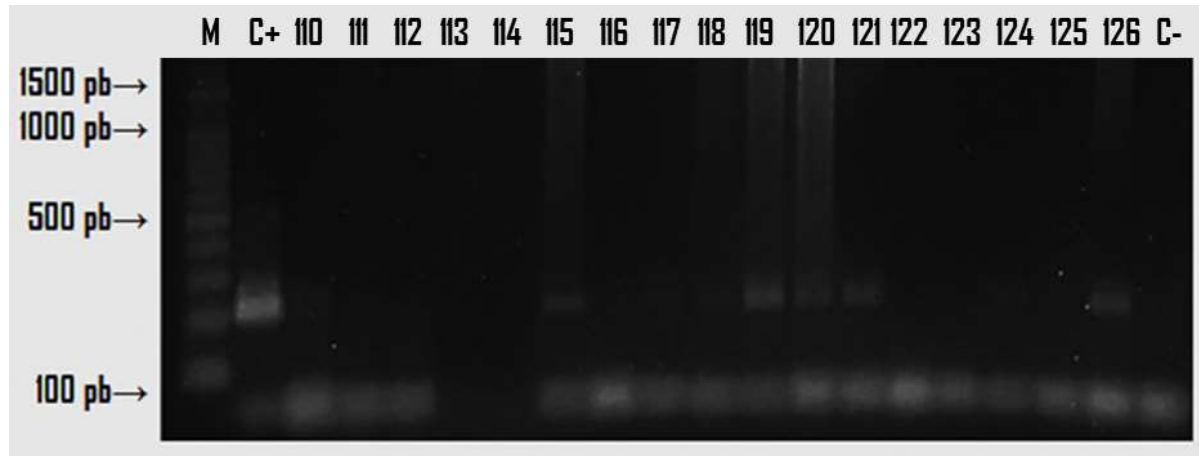
### Análisis estadísticos

Se representaron las frecuencias absolutas y porcentajes de casos positivos y hallazgos hematológicos. El grado de asociación entre la presencia de patógenos y las variables evaluadas (sexo, edad, raza, época del año y parámetros hematológicos); se analizaron mediante la prueba de independencia de Chi cuadrada con un nivel de significancia de 0.05; utilizando el programa estadístico MedCalc. V. 7.0.

## RESULTADOS

### Presencia de *E. canis* y *A. phagocytophilum*

Del número total de muestras analizadas (384) durante el periodo de estudio, 103 resultaron positivos a *E. canis* (frecuencia de 26.8 %) mediante la técnica de PCR, donde se amplificó el gen GltA con un tamaño molecular esperado de 200 pb, como se puede observar en la figura 1. De los frotis sanguíneos evaluados se logró identificar *E. canis* en sólo 41 de las muestras evaluadas (10.7%). Las mórulas se observaron en el citoplasma de linfocitos y monocitos como estructuras redondas, con un tamaño entre 4 a 6 µm de diámetro que se tiñeron fuertemente de un color basofílico; como se muestra en la figura 2. Por otro lado, ninguno de los perros evaluados por PCR o evaluación de frotis resultó positivo para *A. phagocytophilum* (figura 3).



(M) Marcador de peso molecular, (C+) control positivo con peso molecular de 200 pb, (115, 117, 118, 119, 120, 121, 126) muestras positivas, (C-) control negativo con agua bidestilada. Gel de agarosa al 2%, teñido con Diamond.

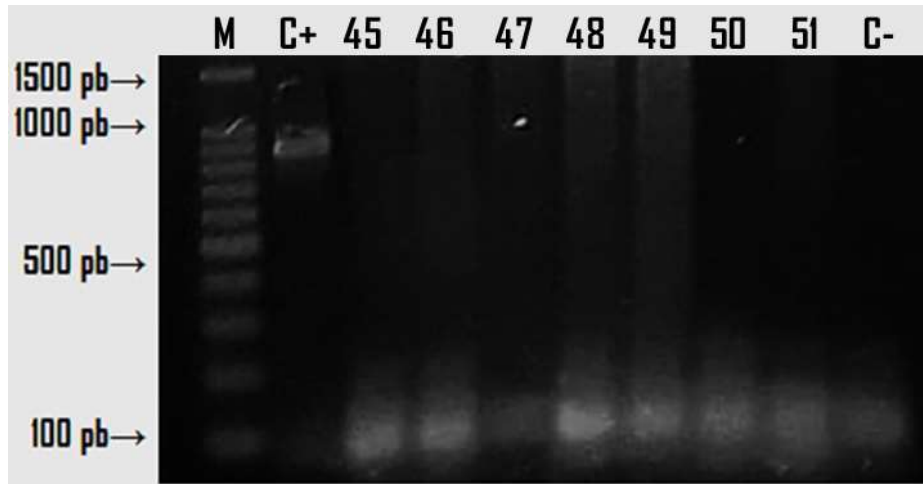
**Figura 1. Amplificación por PCR de *E. canis* en muestras de sangre tomada de caninos**

### **Características de la población canina**

Se evaluaron 192 hembras (50%) y 192 machos (50%), con edades comprendidas entre 3 meses hasta 20 años. Los resultados observados nos muestran que *E. canis* no distingue entre género; ya que dentro del grupo de infectados los porcentajes de hembras (29.7) y machos (24.0) no fueron estadísticamente significativos ( $p > 0.05$ ). Al evaluar la relación entre la edad del perro (cachorros, adultos o seniors) y el porcentaje de positivos a *E. canis*, se determinó que existe relación significativa entre ambas variables, donde la condición de adulto (1 a 7 años) está relacionada con la presencia de la enfermedad ( $p < 0.05$ ) (tabla 2).



**Figura 2. Linfocito en sangre periférica de un canino infectado con una mórula de *E. canis* (flecha). Tinción de Giemsa 10%**



(M) Marcador de peso molecular, (C+) control positivo con peso molecular de 849 pb, (45-51) muestras negativas, (C-) control negativo con agua bidestilada. Gel de agarosa al 2%, teñido con Diamond.

**Figura 3. Amplificación por PCR de *A. phagocytophilum* en muestras de sangre tomada de caninos**

Los perros de raza representaron el 81% (311/384) de la población de estudio y los mestizos constituyeron el 19% (73/384); sin embargo, la prueba de independencia de chi cuadrada no encontró diferencias estadísticas significativas entre el resultado positivo a *E. canis*, en relación con los grupos raciales definidos y los mestizos ( $p > 0.05$ ) (tabla 2). De la misma manera, no se encontraron diferencias significativas entre la presencia de Ehrlichiosis con la época del año (tabla 2).

**Tabla 2. Frecuencias y porcentajes de positivos y negativos a *E. canis* agrupados por característica del animal y época del año**

Variable	Presencia de <i>E. canis</i>				Valor de p
	Positivo		Negativo		
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	
<b>Sexo</b>					0.205
Macho	42	24.0	146	76.0	
Hembra	57	29.7	135	70.3	
<b>Edad</b>					0.016
Cachorro (0-12 meses)	16	22.2	56	77.8	
Adulto (1 a 7 años)	69	32.5	143	67.5	
Senior (>7 años)	18	18.0	82	82.0	
<b>Raza</b>					0.981
Mestizo	19	26.0	54	74.0	
De raza	84	27.0	227	73.0	
<b>Época del año</b>					0.816
Primavera-Verano	71	26.3	199	73.7	
Otoño-Invierno	32	28.1	82	71.9	

### **Variables hematológicas**

En relación con los hallazgos de laboratorio para los perros positivos a *E. canis* no existió diferencias significativas en aquellos que presentaban anemia, trombocitopenia o hiperproteinemia comparado con los animales negativos quienes muchos de ellos presentaban porcentajes parecidos al grupo de infectado ( $p > 0.05$ ). Por otro lado, sí se encontraron diferencias significativas para algunos parámetros de la serie blanca, como el recuento total de leucocitos y neutrófilos ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, para estos analitos, la mayor cantidad de perros infectados con *Ehrlichia* fueron los que resultaron con valores dentro de los rangos de referencia, en comparación con los animales que resultaron negativos en donde se muestra una gran cantidad de perros con leucocitosis o neutrofilia. Para el resto de los parámetros hematológicos evaluados la prueba estadística no encontró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), como se observa en la tabla 3.

### **DISCUSIÓN**

Hoy en día, la ehrlichiosis y anaplasmosis canina han ganado mayor importancia a nivel mundial, lo cual se atribuye principalmente a que su vector (*Rhipicephalus sanguineus*) es considerado como la especie de garrapata con mayor distribución geográfica (Aguar *et al.*, 2007; Parola *et al.*, 2013; Cabezas-Cruz *et al.*, 2019). En este trabajo de investigación se encontró que del número total de perros evaluados (384), 103 resultaron positivos a *E. canis* (26.8 %) mediante la técnica de PCR y solamente 41 (10.7%) a través de la evaluación del frotis sanguíneo. Esta discrepancia de los 2 métodos utilizados es similar a lo reportado por Happi *et al.*, (2018), quienes de un total de 116 muestras de perros sólo 10.3% resultaron positivas por microscopía, comparada con la técnica de PCR donde se obtuvo 42 resultados positivos (36.2%). Estos resultados eran de esperarse, ya que aunque el diagnóstico por visualización microscópica de las típicas inclusiones intracelulares o mórulas dentro del citoplasma de los monocitos o linfocitos en extendidos de sangre periférica (figura 3), ha sido de gran importancia; esta técnica presenta ciertas desventajas, como la falta de sensibilidad durante la fase temprana de la infección, cuando existe una baja bacteremia; o bien, cuando la bacteria se multiplica en microcolonias intracitoplasmáticas en órganos linfoides donde adquirirá mecanismos que aseguren la evasión de la respuesta inmune dentro de la célula del hospedero (Bai *et al.*, 2017; Manasa *et al.* 2017; McClure *et al.*, 2017; Tominello *et al.*, 2019; Franco-Zetina *et al.*, 2019). Además, se han reportado falsos negativos en casos crónicos o transitorios, debido a que las mórulas suelen desaparecer cinco a ocho días después de la infección, como se ha revelado en estudios experimentales en perros y ganado (Gal *et al.*, 2008; Stuen *et al.*, 2013).

En México, estas enfermedades frecuentemente son subdiagnosticadas, contando con pocos estudios que determinen su prevalencia. En el 2009 en Yucatán se registró una seroprevalencia de ehrlichiosis canina del 45% (Jiménez-Coello *et al.*, 2009) y en otra



investigación donde participaron 28 estados de la República Mexicana, donde se determinó la presencia de anticuerpos contra *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* y *E. canis*; registrándose una alta prevalencia para *E. canis* (55%) y moderada para *Anaplasma* spp (16,4%), para algunos estados del noreste como Coahuila y Nuevo León (Movilla *et al.*, 2016). Geográficamente los animales que participaron en este estudio pertenecen a la zona noreste de México; sin embargo, si comparamos la prevalencia obtenida en la zona centro de Tamaulipas para *E. canis* (26.8%) con estos dos estados, sería mucho menor. No obstante, es importante mencionar que en ese estudio se

**Tabla 3. Frecuencias y porcentajes de positivos y negativos a *E. canis* agrupados en serie roja y plaquetas**

Variable	Presencia de <i>E. canis</i>				Valor de p
	Positivo		Negativo		
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	
<b>Hematocrito</b>					0.280
Anemia (< 0.37 L/L)	49	24.3	153	75.7	
Sin anemia (≥0.37 L/L)	54	29.7	128	70.3	
<b>Proteínas Plasmáticas</b>					0.739
Sin hiperproteinemia (<75 g/L)	45	25.7	130	74.3	
Con hiperproteinemia (>75 g/L)	58	27.8	209	72.2	
<b>Plaquetas</b>					0.946
Trombocitopenia(<180X10 <sup>9</sup> /L)	6	28.6	15	71.4	
Sin trombocitopenia (≥180X10 <sup>9</sup> /L)	97	26.7	266	73.3	
<b>Leucocitos</b>					0.005
Leucopenia (<6x10 <sup>9</sup> /L)	3	15.8	16	84.2	
Normal (6-17x 10 <sup>9</sup> /L)	71	33.3	142	66.7	
Leucocitosis(>17x10 <sup>9</sup> /L)	29	19.1	123	80.9	
<b>Monocitos</b>					0.060
Sin Monocitosis (≤1.4x10 <sup>9</sup> /L)	31	21.1	116	78.9	
Monocitosis(>1.4x10 <sup>9</sup> /L)	72	30.4	165	69.6	
<b>Linfocitos</b>					0.235
Linfocitosis(>4.8x10 <sup>9</sup> /L)	12	18.5	53	81.5	
Normal (1.0-4.8x10 <sup>9</sup> /L)	72	28.1	184	71.9	
Linfopenia(<1.0x10 <sup>9</sup> /L)	19	30.2	44	69.8	
<b>Neutrófilos Segmentado</b>					0.004
Neutropenia (<3.0 x10 <sup>9</sup> /L)	30	18.4	133	81.6	
Normal (3.0-11.5x10 <sup>9</sup> /L)	70	33.8	137	66.2	
Neutrofilia(>11.5x10 <sup>9</sup> /L)	3	21.4	11	78.6	
<b>Eosinófilos</b>					0.575
Sin eosinofilia (<0.9x10 <sup>9</sup> /L)	90	26.2	253	73.8	
Con Eosinofilia (>0.9x10 <sup>9</sup> /L)	13	31.7	28	68.3	

utilizaron pruebas serológicas, las cuales pueden tener el inconveniente de presentar reacción cruzada con otros microorganismos estrechamente relacionados; sobrestimando los resultados de prevalencia y planteando la necesidad de realizar estudios con técnicas moleculares que permitan evidenciar con mayor exactitud el tipo de patógeno implicado (Cetinkaya *et al.*, 2016).

En el 2019, se realizó un estudio de detección molecular de *E. canis* en zonas rurales de Yucatán, encontrando un 29.26% de prevalencia (Ojeda-Chi *et al.*, 2019), lo cual es cercano a lo reportado en este trabajo (26.8%); pero mucho mayor comparada con la prevalencia encontrada en perros evaluados en la Comarca Lagunera (4%) (Almazán *et al.*, 2016).

En cuanto a las infecciones por *A. phagocytophilum*, se han diagnosticado cada vez más en animales de compañía y de granja a nivel mundial (McMahan *et al.*, 2016). En México, *A. phagocytophilum*, se ha detectado en zarigüeyas y perros del estado de Campeche, con una prevalencia de 3 y 27%, respectivamente (Rojero *et al.*, 2017); sin embargo, en este trabajo ninguno de los perros evaluados resultó positivo por PCR o frotis sanguíneo. Esto no es sorprendente, ya que *Ixodes spp.* y *Dermacentor spp.*, garrapatas poco frecuentes en la zona de estudio, han sido reconocidas como los vectores de mayor importancia en el ciclo de transmisión de esta bacteria, lo cual pudo contribuir a su nula presencia (Tinoco-García *et al.*, 2009; Guzmán-Cornejo *et al.*, 2016; Rodríguez-Vivas *et al.* 2019).

Los resultados observados en esta investigación muestran que *E. canis* no tiene predilección entre género, ya que dentro del grupo de los infectados los porcentajes de hembras (29.7) y machos (24.0) no fueron estadísticamente significativos ( $p > 0.005$ ). Esta misma variable ha sido estudiada por varios autores (Nuñez, 2003; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005), encontrando resultados similares. No obstante, esto discrepa de lo registrado por otros investigadores, donde sostienen que las hembras, especialmente durante el celo preñez o parto, favorecen el riesgo de contraer infecciones por *E. canis* (Salazar *et al.*, 2014; Abdelfattah *et al.*, 2021).

En relación con los hallazgos hematológicos asociados a la presencia de ehrlichiosis y anaplasmosis canina, se ha registrado que dichas alteraciones dependerán en qué fase de la enfermedad se encuentran (Afusat *et al.*, 2020). Durante la etapa aguda es común la presencia de anemia, la cual suele ser leve a moderada (usualmente normocítica, normocrómica, no regenerativa) (Eberts *et al.*, 2011).

En este trabajo, la presencia de anemia no se relacionó significativamente con ninguna de las enfermedades. La trombocitopenia ha sido un hallazgo hematológico que tradicionalmente ha sido asociado a la ehrlichiosis canina (Piratae *et al.*, 2019). Sin embargo, en este estudio la presencia de trombocitopenia ( $< 200,000$ ) no tuvo asociación con los animales positivos a *E. canis*. Diversos estudios han reportado una asociación entre el número de plaquetas y la presencia de *E. canis*, particularmente en animales con recuento celular plaquetario inferior a  $100 \times 10^9/L$  (Bulla *et al.*, 2004; Tngsahuan *et al.*,

2020). Aunque en este estudio se reportaron muchos animales con presencia de anemia e hiperproteïnemia, no existe asociación estadística significativa al compararlos con animales que resultaron negativos; lo anterior puede deberse a la posible presencia de otros hemoparásitos como *Ehrlichia ewingii* o *Anaplasma platys*, los cuales pueden producir grados de anemia e hiperproteïnemia similares a los reportados en perros infectados con *E. canis* (Piratae *et al.*, 2019).

Por otro lado, es posible que muchos de los individuos positivos a *E. canis* con resultados hematológicos sin alteraciones, hubieran estado en la fase subclínica de la enfermedad; esto último sería de gran importancia ya que si la enfermedad no se detecta durante esta fase podría progresar a una etapa crónica, produciendo graves daños irreversibles como trombocitopenia, leucopenia y anemia severa no regenerativa producto de una supresión de la médula ósea (Little *et al.*, 2014).

En cuanto a la evaluación de la serie blanca, se observa que a pesar de la existencia de diferencias significativas entre los casos negativos y positivos a *E. canis* para el conteo total de leucocitos, neutrófilos y monocitos; los resultados no eran lo esperado, ya que los perros negativos resultaron con más alteraciones en estas células (ya sea que estuvieran aumentadas o disminuidas), comparados con los positivos. Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos por Asgarali y colaboradores (2012), quienes reportaron que perros con Ehrlichiosis manifestaron niveles de neutrófilos y monocitos dentro de rangos de referencia; a diferencia de los animales negativos, los cuales tuvieron un aumento significativo en dichas células. Una posible explicación de por qué muchos de los perros positivos resultaran sin alteraciones en la serie blanca, es porque tal vez estos animales pudieron encontrarse en la fase subclínica de la enfermedad, donde la mayoría son asintomáticos y no presentan alteraciones hematológicas de consideración (de Castro *et al.*, 2004).

## CONCLUSIONES

El presente estudio evidenció que las alteraciones hematológicas evaluadas en perros con signología sospechosa a *Ehrlichia canis* resultaron no ser específicas, ya que una gran cantidad de estos animales no se encontraban infectados. Por otro lado, muchos de los perros que sí resultaron positivos, permanecieron sin cambios aparentes en sus hemogramas, lo cual es de gran relevancia, ya que estos individuos si no se diagnostican a tiempo podrían ser reservorios para otros hospedadores incluyendo el ser humano. Además, el clínico veterinario debería considerar que estas enfermedades pueden cursar por un cuadro subclínico sin signología o con la presencia de co-infecciones que produzcan signos similares, lo cual dificultarían su diagnóstico y por ende el tratamiento adecuado. Se sugieren realizar más investigaciones que incluyan la detección de otras especies de hemoparásitos en la región, debido a su importancia como agentes potencialmente zoonóticos.

## AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto PRODEP No. 511-6/2019.-13905 titulado “Evidencia molecular de patógenos transmitidos por garrapatas y su asociación con cambios hematológicos en caninos infectados naturalmente en Cd. Victoria, Tam., México” otorgado por el Fomento a la Generación y Aplicación Innovadora del Conocimiento (GAC) como parte del Apoyo a la reincorporación de Exbecario.

## LITERATURA CITADA

ABDELFATTAH S, Alanazi AD, Alireza S, Domenico O. 2021. Seroprevalence and associated risk factors for vector-borne pathogens in dogs from Egypt. *Parasit Vectors*. 14:175. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04670-0>

AFUSAT JJ, Obokparo GO, Oluwafemi AA, Latifat AA. 2020. Haematology and serum chemistry in clinical canine ehrlichiosis. *Vom Journal of Veterinary Science*. 15(1):61-66. <https://www.researchgate.net/publication/346785733>

AGUIAR DM, Cavalcante GT, Pinter A, Gennari SM, Camargo LMA, Labruna MB. 2007. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. *Journal of Medical Entomology*. 44:126-132. <https://doi.org/10.1093/jmedent/41.5.126>

ALLISON RW, Little SE. 2013. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. *Veterinary Clinical Pathology*. 42:127-144. <https://doi.org/10.1111/vcp.12040>

ALMAZÁN C, Gonzalez-Alvarez VH, de Mera IGF, Cabezas-Cruz A, Rodríguez-Martínez R, de la Fuente J. 2016. Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 7:276-283. <https://doi:10.1016/j.ttbdis.2015.11.002>

ASGARALI Z, Pargass I, Adam J, Mutani A, Ezeokoli. 2012. Haematological parameters in stray dogs seropositive and seronegative to *Ehrlichia canis* in North Trinidad. *Ticks and Tick Borne Diseases*. 3(4): 207-211. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.03.006>

BAI L, Goel P, Jhambh R, Kumar P, Joshi V G. 2017. Molecular prevalence and haemato-biochemical profile of canine monocytic ehrlichiosis in dogs in and around Hisar, Haryana, India. *J Parasit Dis*. 41(3): 647-54. <https://doi.org/10.1007/s12639-016-0860-8>

BATTILANI M, De Arcangeli S, Balboni A, Dondi F. 2017. Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. *Infection Genetics and Evolution*. 49:195-211. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017>

BEUGNET F, Chalvet-Monfray K. 2013. Impact of climate change in the epidemiology of vector-borne diseases in domestic carnivores. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 36:559–566. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2013.07.003>

BHADESIYA CM, Modi DV. 2015. Correlation of epidemiology of *Rhipicephalus sanguineus* and canine ehrlichiosis in nine different localities of middle Gujarat. *International Agricultural Science and Veterinary Medicine*. 3(1): 2320-3730. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.740.420&rep=rep1&type=pdf>

BULLA C, Kiomi R, Pessoa J, Trinca LA, Souza R, Wiedmeyer CE. 2004. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. *Veterinary Research*. 35:141-146. <https://doi.org/10.1051/VETRES:2003038>

CABEZAS-CRUZ A, Allain E, Ahmad AS, Saeed MA, Rashid I, Ashraf K, Estrada-Peña A. 2019. Low genetic diversity of *Ehrlichia canis* associated with high co-infection rates in *Rhipicephalus sanguineus* (sl). *Parasites & Vectors*. 12:12. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3194-9>

CETINKAYA H, Matur E, Akyazi I, Ekiz EE, Aydin L, Toparlak M. 2016. Serological and molecular investigation of *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. in ticks and blood of dogs, in the Thrace Region of Turkey. *Ticks and Tickborne Diseases*. 7:706-714. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.02.021>

DE CASTRO MB, Machado RZ, de Aquino LP, Alessi AC, Costa MT. 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 LA FUENTE J, Antunes S, Bonnet S, Cabezas-Cruz A, Domingos AG, Estrada-Peña A, *et al.* 2017. Tick-pathogen interactions and vector competence: identification of molecular drivers for tick-borne diseases. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 7:114. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00114>

DUMLER JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rurangirwa FR. 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*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51(6):2145-2165. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>

EBERTS MD, Vissotto de Paiva Diniz PP, Beall MJ, Stillman BA, Chandrashekar R, Breitschwerdt EB. 2011. Typical and atypical manifestations of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 47:86-94. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-5578>

FARHAN AA. 2015. *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: Rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. *Parasitol Res*. 114(11):3941-57. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4698-2>

FRANCO-ZETINA M, Adame-Gallegos J, Dzul-Rosado K. 2019. Effectivity of diagnostic methods for the detection of human and canine monocytic ehrlichiosis. *Rev. Chilena Infectol.* 36(5):650–655. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182019000500650>

GAL A, Loeb E, Yisaschar-Mekuzas Y, Baneth G. 2008. Detection of *Ehrlichia canis* by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Journal.* 175:212-217. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2007.01.013>

GUZMÁN-CORNEJO C, Robbins RG, Guglielmone AA, Montiel-Parra G, Rivas G, Pérez TM. 2016. The Dermacentor (Acari, Ixodida, Ixodidae) of Mexico: hosts, geographical distribution and new records. *ZooKeys.* 569:1-22. <https://doi.org/10.3897/zookeys.569.7221>

HAPPI AN, Toepp AJ, Ugwu CA, Petersen CA, Sykes JE. 2018. Detection and identification of blood-borne infections in dogs in Nigeria using light microscopy and the polymerase chain reaction. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 11: 55-60. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.12.002>

HARRUS S, Waner T. 2011. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *The Veterinary Journal.* 187:292-296. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.02.001>

IRWIN PJ. 2014. It shouldn't happen to a dog ... or a veterinarian: clinical paradigms for canine vector-borne diseases. *Trends Parasitology* 30:104–12. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.12.001>

ISMAIL N, McBride JW. 2017. Tick-borne emerging infections: ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clinics in Laboratory Medicine.* 37:317-340. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.01.006>

JIMÉNEZ-COELLO M, Pérez-Osorio C, Vado-Solís I, Rodríguez-Buenfil JC, Ortega-Pacheco A. 2009. Serological survey of *Ehrlichia canis* in stray dogs from Yucatan, Mexico, using two different diagnostic tests. *Vector Borne Zoonotic Diseases.* 9:209-212. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0039>

LITTLE E, Beall MJ, Bowman DD, Chandrashekar R, Stamaris J. 2014. Canine infection with *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma* spp., and *Ehrlichia* spp. in the United States, 2010-2012. *Parasites & Vectors.* 7:1-9. <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-7-257>

MAGGI RG, Krämer F. 2019. A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. *Parasitic Vectors.* 12:145. doi: [10.1186/s13071-019-3407-x](https://doi.org/10.1186/s13071-019-3407-x)

MANASA RK, Pritpal SD, Lachhman DS, Baljinder KB, and Sanjeev KU. 2017. Clinical and hematobiochemical response in canine monocytic ehrlichiosis seropositive dogs of Punjab. *Veterinary World*. 10(2): 255–261. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.255-261>

MCCLURE EE, Chávez ASO, Shaw DK, Carlyon JA, Ganta RR, Noh SM, Wood DO, Ba voil PMA, Brayton KA, Martinez JJ, McBride JW, Valdivia RH, Munderloh UG, Pedra JHF. 2017. Engineering of obligate intracellular bacteria: progress, challenges and paradigms. *Nat Rev Microbiol*. 15:544–558. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.59>

MCMAHAN CS, Wang D, Beall MJ, Bowman DD, Little SE, Pithua PO, Julia L, Sharp JL, Stich RW, Yabsley MJ, Lund RB. 2016. Factors associated with *Anaplasma* spp. seroprevalence among dogs in the United States. *Parasites & Vectors*. 9:169. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1431-7>

MOVILLA R, García C, Siebert S, Roura X. 2016. Countrywide serological evaluation of canine prevalence for *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* (sensu lato), *Dirofilaria immitis* and *Ehrlichia canis* in Mexico. *Parasites & Vectors*. 9:421. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1686-z>

NÚÑEZ OL. 2003. Estudio de la seroprevalencia de *Ehrlichia canis* en México. *Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Pequeñas Especies*. 14:83-85. <https://www.researchgate.net/publication/291003826>

OJEDA-CHI MM, Rodriguez-Vivas RI, Esteve-Gasent MD, Pérez de León A, Modarelli JJ, Villegas-Perez SL. 2019. *Ehrlichia canis* in dogs of Mexico: Prevalence, incidence, co-infection and factors associated. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 67:101351. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101351>

PAROLA P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, et al. 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin Microbiol Rev*. 26:657–702. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-13>

PIRATAE S, Senawong P, Chalermchat P, Harnarsa W, Sae-chue B. 2019. Molecular evidence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* and the association of infections with hematological responses in naturally infected dogs in Kalasin. *Thailand. Veterinary World*. 12:131. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.131-135>

RODRÍGUEZ-VIVAS RI, Albornoz REF, Bolio GME. 2005. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. *Veterinary Parasitology*. 127:75-79. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2004.08.022>

RODRÍGUEZ-VIVAS RI, Ojeda-Chi MM, Bolio-González ME, Rosado-Aguilar JA. 2019. Las garrapatas como vectores de enfermedades zoonóticas en México. *Bioagrocencias*. 12(1):19-26. <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/BAC/article/view/2993>

ROJERO-VÁZQUEZ R, Gordillo-Pérez G, Weber M. 2017. Infection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia* spp. in opossums and dogs in Campeche, Mexico: the role of tick infestation. *Frontiers in Ecology Evolution*. 5:161. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00161>

SALAZAR H, Edwin F, Buriticá EF, Echeverry DF, Barbosa I. 2014. Seroprevalencia de *Ehrlichia canis* y su relación con algunos parámetros clínicos y hematológicos en caninos admitidos en clínicas veterinarias de la ciudad de Ibagué (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencia Animal*. 7 (1):56-63. <http://revistas.ut.edu.co/index.php/ciencianimal/article/view/542>

STICH RW, Rikihisa Y, Ewing SA, Needham GR, Grover DL, Jittapalapong S. 2002. Detection of *Ehrlichia canis* in canine carrier blood and in individual experimentally infected ticks with a p30-based PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 40:540-546. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.2.540-546.2002>

STUEN S, Granquist EG, Silaghi C. 2013. *Anaplasma phagocytophilum* a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 3:31. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00031>

TINOCO-GRACIA L, Quiroz-Romero H, Quintero-Martinez MT, Renteria-Evangelista TB, Gonzalez-Medina Y, Barreras-Serrano A, et al. 2009. Prevalence of *Rhipicephalus sanguineus* ticks on dogs in a region on the Mexico-USA border. *Veterinary Record*. 164:59-61. <https://doi.org/10.1136/vr.164.2.59>

TOMINELLO TR, Oliveira ERA, Hussain SS, Wells AEJ, Golden B, Ismail N. 2019. Emerging roles of autophagy and inflammasome in ehrlichiosis. *Front Immunol*. 10:1011. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01011>

TNGSAHUAN S, Chethanond U, Wasiksiri S, Saechan V, Thongtako W, Musikacharoen T. 2020. Hematological profile of blood parasitic infected dogs in Southern Thailand. *Vet World*. 13(11): 2388-2394. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2388-2394>

VIEIRA RFDC, Vieira TSWJ, Nascimento, DDAG, Martins TF, Krawczak FS, Labruna MB, Vidotto O. 2013. Serological survey of *Ehrlichia* species in dogs, horses, and humans: zoonotic scenery in a rural settlement from southern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 55:335-340. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000500007>

WAYNE WD, Chad LC. 2013. *Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences*. 10th Edition Wiley. Pp. 191. ISBN 978-1-118-30279-8.

YOUSEFI A, Chaechi Nosrati MR, Golmohammadi A, Azami S. 2019. Molecular Detection of *Anaplasma Phagocytophilum* as a Zoonotic Agent in Owned and Stray Dogs in Tehran, Iran. *Archives of Razi Institute*. 74:33-38. <https://doi.org/10.22092/ARI.2018.114893.1142>